



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**SILENCIAMENTO DO GENE DE UMA v-ATPase DA MOSCA  
BRANCA (*Bemisia tabaci*) POR RNAi EM TOMATEIRO  
(*Solanum lycopersicum*)**

**CAROLINA SENHORINHO RAMALHO PIZETTA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA, DF**  
**FEVEREIRO DE 2018**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**SILENCIAMENTO DO GENE DE UMA v-ATPase DA MOSCA  
BRANCA (*Bemisia tabaci*) POR RNAi EM TOMATEIRO  
(*Solanum lycopersicum*)**

**CAROLINA SENHORINHO RAMALHO PIZETTA**

**ORIENTADOR: RICARDO CARMONA**  
**CO – ORIENTADOR: FRANCISCO JOSÉ LIMA ARAGÃO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA, DF**  
**FEVEREIRO DE 2018**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**SILENCIAMENTO DO GENE DE UMA v-ATPase DA MOSCA  
BRANCA (*Bemisia tabaci*) POR RNAi EM TOMATEIRO  
(*Solanum lycopersicum*)**

**CAROLINA SENHORINHO RAMALHO PIZETTA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE  
AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE  
BRASÍLIA – UnB, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À  
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM AGRONOMIA.**

**APROVADO POR:**

---

**RICARDO CARMONA (ORIENTADOR), PhD/ Universidade de Brasília**

**E-mail: rcarmona@unb.br**

---

**NARA OLIVEIRA SILVA SOUZA (EXAMINADOR INTERNO), Doutora/**

**Universidade de Brasília/ E-mail: narasouza@unb.br**

---

**THAÍS DE MOURA CIPRIANO (EXAMINADOR EXTERNO), Doutora/**

**Embrapa Cenargen/ E-mail: thais.cipriano@gmail.com**

**BRASÍLIA/DF, 28 de FEVEREIRO de 2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Pizetta, Carolina.

Silenciamento do gene de uma v-ATPase da mosca branca (*Bemisia tabaci*) por RNAi em tomateiro (*Solanum lycopersicum*). Carolina Senhorinho Ramalho Pizetta; Orientação: Ricardo Carmona. Brasília, 2018. 64 p.

Dissertação de Mestrado (M) - Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2018.

1. Micro-Tom, 2. *Agrobacterium*, 3. siRNA, 4. v-ATPase.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

PIZETTA, C.S.R. **Silenciamento do gene de uma v-ATPase da mosca branca (*Bemisia tabaci*) por RNAi em tomateiro (*Solanum lycopersicum*)**. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília-Brasília, 2018; 64 p. Dissertação de Mestrado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Carolina Senhorinho Ramalho Pizetta

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Silenciamento do gene de uma v-ATPase da mosca branca (*Bemisia tabaci*) por RNAi em tomateiro (*Solanum lycopersicum*).

GRAU: MESTRE.

ANO: 2018

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva os outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

---

Nome: Carolina Senhorinho Ramalho Pizetta

E-mail: carolsenhorinho@gmail.com

*Dedico a Deus e à minha família por terem me apoiado em todos os momentos. Amo muito vocês.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço a Deus por ser minha fortaleza e pelas oportunidades postas em meu caminho.*

*Aos pesquisadores Dr. Francisco José Lima Aragão e a Dra. Glaucia Barbosa Cabral pelos ensinamentos, pelo apoio e contribuição na minha formação como profissional e como pessoa.*

*Ao professor Dr. Ricardo Carmona pelo apoio para a realização desse trabalho e conclusão de mais uma etapa.*

*Ao meu pai Alexandre Garcia Ramalho e a minha mãe Roberta Laila Senhorinho Ramalho pelo amor, pelos cuidados, pelos ensinamentos e por terem apostado em mim. Às minhas irmãs, Ana Luísa, Isabella Cristina e Marina pelo carinho e apoio.*

*Ao meu marido, Pedro Henrique Luna S. Pizetta, pelo companheirismo, pela compreensão e por todo apoio e carinho.*

*Às minhas avós, aos meus tios e primos, pelo carinho e incentivo.*

*Aos meus amigos do Laboratório de Engenharia Genética Aplicada à Agricultura Tropical: Elsa, Kenny, Glaucia, Estela, Thaís, Jéssica, Natália, Tomas, Lídia, Pedro, Renato, Raquel, Diogo, Cristovan, Cristiane Citadin, Emanuel, Mirella, Angélica, Francielle, Abdul e Pabline pela amizade, ajuda e aprendizado proporcionado.*

*A todos os professores da pós-graduação, pelos ensinamentos e pela contribuição para minha formação como profissional.*

*Aos membros da banca examinadora Dra. Nara Oliveira Silva Souza, Dra. Thaís de Moura Cipriano e Dra. Natália Lima de Sousa, pela participação e contribuição na minha dissertação;*

*A todos meus amigos por sempre me apoiarem em todos os momentos.*

*E àqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.*

*Muito obrigada!*

## RESUMO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) apresenta importância econômica e alimentar, sendo uma das principais hortaliças produzidas no Brasil. O alto custo de produção e grandes perdas econômicas da cultura do tomateiro estão fortemente relacionados a problemas fitossanitários, dentre eles, a infestação de mosca branca *Bemisia tabaci* que além de causar danos como inseto sugador, atua como vetor de diferentes gêneros virais, o que torna fundamental manter populações baixas desse inseto vetor no campo. A mosca branca é responsável por causar grandes danos à agricultura, por possuir desenvolvimento rápido e ser adaptada a diversos hospedeiros. A natureza invasora da mosca branca e sua alta taxa de reprodução dificultam o controle e favorecem o desenvolvimento de resistência aos inseticidas utilizados no seu combate, evidenciando a necessidade de alternativas mais eficientes de controle. O silenciamento gênico pós-transcricional via RNA interferente (RNAi) é uma das estratégias da engenharia genética, que pode ser utilizada na busca da obtenção de plantas resistentes a pragas com maior especificidade. A estratégia de RNAi foi utilizada com o objetivo de obter plantas de tomateiro resistentes à mosca branca, pelo silenciamento do gene da v-ATPase de *Bemisia tabaci*, devido à expressão de siRNAs. Explantes cotiledonares de tomateiro da variedade Micro-Tom foram transformados via *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 contendo um plasmídeo, que possui um cassete de supressão para o silenciamento do gene da v-ATPase de mosca branca. Foram geradas 13 linhagens transgênicas, confirmadas por PCR pela detecção do transgene de 576 pb correspondente à região do gene da v-ATPase. A inserção do transgene no genoma em alguns eventos foi confirmada por meio da análise de *Southern blot*. Análise da progênie confirmou a presença do inserto na geração T<sub>1</sub>, segregando em proporção mendeliana 3:1 e 15:1. Um bioensaio realizado com folhas destacadas das plantas T<sub>0</sub> mostrou que a mortalidade de moscas brancas pode chegar próximo a 100% em cinco dias de interação com algumas linhagens.

Palavras-chaves: Micro-Tom, *Agrobacterium*, siRNA, v-ATPase.

## ABSTRACT

The tomato plant (*Solanum lycopersicum* L.) is economically important, being one of the main vegetables produced in Brazil. The high cost of production and huge economical losses in tomato cultivation are strongly related to phytosanitary problems, among them the whitefly *Bemisia tabaci*, besides causing damage as a sucking insect, acts as a vector of different viral genus, which needs keeping low populations in rural areas. The whitefly is responsible for a great damage to agriculture due its quick development and adaptation to several hosts. The invasive nature of the whitefly and its high reproduction rate hinder the control and favor the development of resistance to insecticides, which evidences the need for more efficient alternatives control. The post-transcriptional gene silencing via interfering RNA (RNAi) is one of the genetic engineering's strategies that should be used for obtaining resistant plants to plagues with greater specificity. The RNAi mechanism was utilized to obtaining tomato resistant plants to the whitefly by silencing the *v-ATPase* gene from *Bemisia tabaci*. Cotyledonary explants from Micro-Tom variety were transformed via *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 containing a suppression cassette for the whitefly's *v-ATPase* gene silencing. Thirteen transgenic lines were generated, confirmed by PCR, through the detection of a 576 pb transgene fragment corresponding to the *v-ATPase* gene. The transgene insertion into de genome of some events was confirmed by Southern blot analysis. Progeny analysis confirmed the presence of the transgene into the T<sub>1</sub> progeny, segregating in Mendelian proportion 3:1 e 15:1. A preliminary bioassay performed with detached leaves from T<sub>0</sub> plants showed a whiteflies' mortality around 100% in some lines after five days of interaction.

Key words: Micro-Tom, *Agrobacterium*, siRNA, *v-ATPase*.



## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Representação esquemática do vetor pC2300ATPase que contém as construções de RNAi para sequências específicas do gene <i>v-ATPase</i> de mosca branca, e o gene <i>npt II</i> , que codifica para a enzima NPTII (Neomicina Fosfotransferase tipo II) e confere resistência à canamicina e paramomicina.	30
<b>2</b>	Representação esquemática do vetor pCAMBIA3301 que contém o gene repórter <i>gus</i> e o gene de seleção <i>bar</i> , que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio (GA), sob o controle do promotor constitutivo CaMV35S.	32
<b>3</b>	Representação esquemática do vetor pCAMBIA2301 que contém o gene repórter <i>gus</i> e o gene de seleção <i>npt II</i> , que confere resistência à canamicina e à paramomicina, sob o controle do promotor constitutivo CaMV35S.	33
<b>4</b>	Estádios de maturação dos frutos da variedade Pepe agroinfiltrados.	37
<b>5</b>	Bioensaio com folhas de tomateiros transformados (T <sub>0</sub> ) para expressar siRNAs. (A) Sistema de monitoramento de mortalidade de moscas brancas. (B) Introdução de moscas brancas no sistema de monitoramento.	42
<b>6</b>	Curva de seleção de explantes cotiledonares de Micro-Tom cultivados em meio suplementado com diferentes concentrações de paramomicina: 0; 25; 50 e 100 mg/L, após 8 dias de cultivo.	43

- 7 Brotações: (A) Broto proveniente da indução de explante em meio com 0 mg/L de antibiótico; (B) Brotos em meio de alongamento com 0 mg/L de antibiótico. 44
- 8 Curva de seleção de explantes cotiledonares de Micro-Tom cultivados em meio suplementado com diferentes concentrações de canamicina: 0; 25; 50 e 100 mg/L, após 8 dias de cultivo. 44
- 9 Análise da emergência de gemas e brotos induzidos em diferentes concentrações de canamicina: 0; 25; 50 e 100 mg/L, após 5 semanas do cultivo. (A) Brotos emergentes em meio de indução sem canamicina; (B) Parte abaxial de explantes induzidos em meio com 25 mg/L de canamicina, apresentando gemas oxidadas, indicadas pelas setas; (C) Parte abaxial de explantes induzidos em meio com 50 mg/L de canamicina; e (D) Parte abaxial de explantes induzidos em meio com 100 mg/L de canamicina. 45
- 10 Regeneração de gemas e brotos resistentes à canamicina cocultivados com *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 que contém o vetor pC2300ATPase. (A, B) Gemas emergentes após cocultura, resistentes à canamicina; (C, D e E) Início da diferenciação de folhas; (F) Broto emergente em meio de indução com canamicina, 7 semanas após a cocultura. 47
- 11 Plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), provenientes de explantes cotiledonares transformados com o vetor pC2300ATPase, aclimatadas em casa de vegetação. (A e B) Plantas aclimatadas, mantidas em casa de vegetação para produção de frutos; (C e D) Plantas transformadas florescendo e produzindo frutos. 47

- 12 Análise de PCR de 14 plantas aclimatadas, provenientes de brotos emergidos de diferentes explantes transformados com o vetor pC2300ATPase, para amplificação da sequência de 576 pb do gene *v-ATPase*. O controle positivo (C+) corresponde a reação de PCR feita com o vetor pC2300ATPase, o controle negativo (C-) feito com uma planta não transformada e o branco (B) representa a reação de PCR sem DNA. 48
- 13 Análise de Imunoensaio de fluxo lateral e detecção da proteína NPTII em cinco linhagens transgênicas de tomate. Banda superior representa controle positivo interno e a banda inferior a presença da NPTII (seta). 48
- 14 Análise de *Southern blot* de DNA genômico de 11 plantas transgênicas de *Solanum lycopersicum* regeneradas a partir de 5 calos independentes, e uma planta de tomate não transgênica. 49
- 15 Avaliação de bioensaio com folhas de plantas transgênicas, após 4 dias da liberação das moscas brancas: (A) Mosca branca coberta por hifas de fungos; e (B) Mosca branca viva. 50
- 16 Percentual de mortalidade de moscas brancas analisadas no quinto dia do bioensaio com folhas de plantas transgênicas (T<sub>0</sub>), e uma planta controle negativo. 51
- 17 Plântulas provenientes de sementes de frutos agroinfiltrados. (A) Plântulas de sementes agroinfiltradas com o vetor pC3301 antes da aplicação do glufosinato de amônio, (C) e após 4 dias da aplicação de glufosinato de amônio; (B) Plântulas de sementes agroinfiltradas com o vetor pC2301 antes da aplicação de canamicina, (D) e após 4 dias da aplicação de canamicina. 53

- 18      Teste histoquímico do *gus* de folhas de plântulas provenientes das sementes de frutos agroinfiltrados. (A) Folhas extraídas de plântulas de sementes agroinfiltradas com o vetor pC2301, antes da aplicação de canamicina, (C) e após 4 dias da aplicação de canamicina; (B) Folhas de plântulas de sementes agroinfiltradas com o vetor pC3301, antes da aplicação de glufosinato de amônio, (D) e após 4 dias da aplicação de glufosinato de amônio. 54
-

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Análise de segregação da geração T <sub>1</sub> de 8 plantas transgênicas de tomateiro transformadas com o vetor pC2300ATPase.	50
<b>2</b>	Percentual de germinação de sementes provenientes de frutos agroinfiltrados.	52

## LISTA DE ABREVIACOES

AIA = cido indolacético;

ATP = Trifosfato de adenosina;

BAP = Benzilaminopurina;

BLAST = Basic Local Alignment Search Tool;

DNA = cido desoxirribonucleico;

dsRNA = Double-stranded RNA = RNA fita-dupla;

EHA105 = Linhagem de *Agrobacterium tumefaciens*;

Embrapa = Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária;

GA<sub>3</sub> = ácido giberélico;

GUS =  $\beta$ -glucuronidase;

IBA = cido indolbutírico;

LB = Luria Bertani;

MEGA5 = Molecular Evolutionary Genetics Analysis 5;

MES = cido morfolino etanosulfônico;

miRNA = MicroRNA;

mRNA = RNA mensageiro;

MS = Murashige e Skoog (1962);

NPTII = Neomicina Fosfotransferase tipo II;

PCR = Polymerase Chain Reaction;

pb = Pares de bases;

pH = Potencial hidrogeniônico;

PVP = Polivinilpirrolidona;

 = Marca registrada;

RNA = cido ribonucleico;

RNAi = RNA interferente;

rpm = Rotaes por minuto;

siRNA = Pequeños RNAs interferentes;

<sup>TM</sup> = Marca comercial.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	18
<b>3. HIPÓTESE CIENTÍFICA</b> .....	19
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	20
4.1 Objetivo geral.....	20
4.2 Objetivos específicos .....	20
<b>5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
5.1 A Cultura do Tomateiro ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	20
5.2 Mosca branca ( <i>Bemisia tabaci</i> ) .....	21
5.2.1 Classificação .....	21
5.2.2 Descrição morfológica .....	21
5.2.3 Reprodução e ciclo de vida.....	22
5.2.4 Dispersão geográfica e histórico.....	22
5.2.5 Danos causados à agricultura.....	24
5.2.6 Impacto na cultura do tomateiro .....	24
5.2.7 Controle .....	25
5.3 ATPase vacuolar H <sup>+</sup> .....	26
5.4 RNAi no controle de insetos.....	27
5.5 Transformação genética do tomateiro .....	28
<b>6. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
6.1 Vetores.....	30
6.1.1 pCAMBIA 2300ATPase .....	30
6.1.2 pCAMBIA 3301 .....	31
6.1.3 pCAMBIA 2301 .....	32
6.2 Transformação de bactérias .....	33
6.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	33
6.2.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa EHA-105.....	34
6.3 Obtenção de material vegetal.....	34
6.3.1 Germinação <i>in vitro</i> de sementes da variedade Micro-Tom .....	34
6.3.2 Obtenção de frutos da variedade Pepe .....	34
6.4 Curva de seleção com explantes cotiledonares .....	35
6.5 Transformação genética.....	35



6.5.1	Transformação de explantes cotiledonares mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	35
6.5.2	Agroinfiltração .....	36
6.6	Material vegetal transformado.....	37
6.6.1	Regeneração de explantes cotiledonares após transformação genética.....	37
6.6.2	Germinação de sementes provenientes de frutos agroinfiltrados e seleção de plântulas transformadas .....	38
6.7	Análises do material vegetal transformado .....	38
6.7.1	Ensaio de fluxo lateral .....	38
6.7.2	Extração de DNA e PCR .....	39
6.7.3	<i>Southern blot</i> .....	39
6.7.4	Ensaio histoquímico para detecção do gene <i>gus</i> .....	41
6.8	Análise das progênies .....	41
6.9	Cultura de moscas brancas .....	41
6.10	Bioensaios com folhas de plantas transgênicas .....	41
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
7.1	Curva de seleção de explantes cotiledonares.....	43
7.1.1	Curva de seleção com paramomicina .....	43
7.1.2.	Curva de seleção com canamicina.....	44
7.2	Transformação genética de explantes cotiledonares .....	46
7.2.1	Regeneração de explantes cotiledonares transformados e obtenção de plantas transgênicas.....	46
7.2.2	Análise das progênies .....	49
7.2.3	Bioensaio com folhas das plantas transgênicas obtidas .....	50
7.3	Agroinfiltração .....	52
7.3.1	Germinação e seleção de plântulas transformadas .....	52
7.3.2	Ensaio histoquímico para detecção do gene <i>gus</i> .....	54
7.3.3	Transformação genética por agroinfiltração .....	54
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>55</b>
<b>9.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>55</b>
<b>10.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de tomate apresenta grande importância na economia nacional, sendo uma das principais hortaliças produzidas no Brasil, o qual ocupa o nono lugar na produção mundial (ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA - AGRIANUAL, 2013). O custo de produção total de tomate é elevado devido a uma pluralidade de fatores. Especialmente, destaca-se o fato da cultura ser exigente em insumos, como fertilizantes e defensivos, utilizados no controle de distúrbios fisiológicos e pragas (CARVALHO et al., 2014). Entre as diversas pragas que afetam o cultivo do tomateiro, foram relatados problemas ocasionados pela infestação de mosca branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), que atua como vetor de diferentes gêneros virais, além de causar prejuízos diretos pela sucção de seiva e injeção de substâncias tóxicas nas plantas (BYRNE; BELLOWS JUNIOR, 1991; SALGUEIRO, 1993; LOURO, 2004; LI et al., 2011; CARVALHO et al., 2014). O controle da mosca branca é bastante complexo devido à natureza invasora e à elevada taxa de reprodução, tendo como um fator limitante a manifestação de resistência a inseticidas, que evidencia a necessidade do desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle desse vetor (HAJI et al., 2000; IBRAHIM et al., 2015).

Técnicas de engenharia genética podem ser utilizadas como ferramentas importantes no desenvolvimento de plantas resistentes. O silenciamento gênico pós-transcricional via RNA interferente (RNAi) é uma das estratégias da engenharia genética que pode ser utilizada para obter plantas resistentes a pragas com maior grau de especificidade (BONFIM et al., 2007; ARAGÃO et al., 2013; IBRAHIM et al., 2015). O silenciamento do gene *v-ATPase* em mosca branca, via mecanismo de RNAi, pode ser usado como alternativa para o controle de mosca branca e obtenção de plantas resistentes (UPADHYAY et al., 2011; THAKUR et al., 2014, IBRAHIM et al., 2015).

## 2. JUSTIFICATIVA

*B. tabaci* é uma praga responsável por causar grandes danos à agricultura em todo o mundo, pela sucção de seiva e, principalmente, por ser vetor de diferentes viroses, com destaque para as begomoviroses, que são responsáveis por graves epidemias e danos econômicos em diversas culturas. A manifestação de resistência da mosca branca a inseticidas evidencia a necessidade do desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle desse vetor. Avanços nos estudos e o desenvolvimento de diversas técnicas moleculares possibilitaram maior entendimento dos diversos processos bioquímicos em

vários organismos e como manipulá-los de forma precisa. Entre essas técnicas, o mecanismo de RNA de interferência (RNAi) pode ser utilizado para obtenção de plantas resistentes a diversas pragas (WANG et al., 2000; BONFIM et al., 2007; ARAGÃO et al., 2013).

Foram relatados o uso de RNAi no controle de insetos coleópteros, como de *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae), pelo silenciamento de alguns genes, dentre eles, genes das subunidades de v-ATPase,  $\alpha$ -tubulina, entre outros (BAUM et al., 2007). Também foram relatados em lepidópteros, como *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), pelo silenciamento do gene *CYP6AE14* mediado por plantas transgênicas (MAO et al., 2007).

Recentemente, foi liberado o milho transgênico MON 87411 tolerante ao herbicida glifosato, devido à expressão do gene *cp4 epsps*, e resistente à *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae), pela expressão da proteína endógena Cry3Bb1, e pelo silenciamento do gene *DvSnf7* nas larvas do inseto, devido à expressão de dsRNAs de *DvSnf7* (MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES – MCTIC/PARECER TÉCNICO Nº 5.162/2016)

No trabalho relatado por Upadhyay et al. (2011), foram observados diferentes graus de mortalidade de moscas brancas através da administração oral de siRNA e dsRNA, visando o silenciamento de cinco genes em mosca branca: actina, ADP/ATP translocase,  $\alpha$ -tubulina, proteína ribossomal L9 e a subunidade A da v-ATPase. A administração oral de siRNAs e dsRNAs, com destaque para dsRNAs para v-ATPase, demonstrou ser eficiente no controle do inseto (UPADHYAY et al., 2011). Trabalhos envolvendo *B. tabaci* e o gene que codifica para a v-ATPase, demonstraram resistência ao inseto em plantas de tabaco e alface, com consequente redução na população do inseto adulto (THAKUR et al., 2014, IBRAHIM et al., 2015). A inserção de um gene para silenciamento da v-ATPase de mosca branca em tomateiro via transformação por *Agrobacterium* tem como objetivo a obtenção de plantas resistentes à mosca branca pela expressão de um siRNA específico para o gene.

### 3. HIPÓTESE CIENTÍFICA

O uso de tomateiros resistentes modificados geneticamente, pelo silenciamento do gene da v-ATPase de *Bemisia tabaci* através da expressão de siRNAs, controlam a infestação de moscas brancas.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Obtenção de plantas de tomateiro resistentes à mosca branca pelo silenciamento do gene da v-ATPase da mosca branca devido à expressão de siRNAs.

### 4.2 Objetivos específicos

- Estabelecer uma criação massal de mosca branca para uso em experimentos.
- Gerar plantas de tomateiro modificadas geneticamente via *Agrobacterium*.
- Realizar bioensaios para analisar o efeito da alimentação de moscas brancas em plantas transgênicas de tomate.

## 5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 5.1 A Cultura do Tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma planta dicotiledônea da família Solanaceae, tipicamente autógama, com baixa taxa de polinização cruzada, comportando-se como cultura de ciclo anual (ALVARENGA, 2004). É uma das principais hortaliças produzidas no Brasil, com grande importância econômica e alimentar. O tomate é fonte de vitamina C, pró-vitamina A (betacaroteno) e antioxidantes (licopeno e outros carotenóides) (BOITEUX et al., 2012).

De acordo com levantamento realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2017, a área total colhida de tomate foi de 64,64 mil hectares (ha) e a produção total foi de 4.373.047 toneladas (t), com destaque para os estados de Goiás, Minas Gerais e São Paulo, que são os principais produtores. O Brasil ocupa o nono lugar na produção mundial (ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA - AGRIANUAL, 2013), sendo a China o maior produtor seguido dos EUA, Índia, Turquia e Egito (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAOSTAT, 2016).

No cultivo do tomateiro foram relatados diversas pragas e distúrbios fisiológicos afetando a cultura, o que eleva o custo de produção total devido a exigência a insumos, como fertilizantes e defensivos (CARVALHO et al., 2014). Entre as pragas que afetam o cultivo tomateiro, foram relatados problemas ocasionados pela infestação de mosca branca *Bemisia tabaci*, responsável por causar prejuízos pela sucção de seiva e pela

transmissão de viroses (BYRNE; BELLOWS JUNIOR, 1991; SALGUEIRO, 1993; LOURO, 2004; LI et al., 2011; CARVALHO et al., 2014).

## 5.2 Mosca branca (*Bemisia tabaci*)

### 5.2.1 Classificação

A mosca branca é um inseto da ordem Hemiptera da família *Aleyrodidae*, que contém aproximadamente 126 gêneros, com mais de 1.550 espécies identificadas (BYRNE; BELLOWS JUNIOR, 1991; SALGUEIRO, 1993), sendo a espécie *B. tabaci* a que representa maiores problemas para agricultura, considerada como a mais importante e amplamente distribuída (HAJI et al., 2000). Em 1991, foram constatados biótipos A e B entre as populações do gênero *Bemisia* (BROWN et al., 1995a), e posteriormente, com base em critérios biológicos e filogenéticos, as evidências sugeriram que pode haver um complexo de espécies com numerosos biótipos. Esses biótipos são populações com potenciais de elevar ao máximo suas atividades e aperfeiçoar o poder de virulência (BELLOWS et al., 1994; BROWN et al., 1995a; PERRING, 2001).

### 5.2.2 Descrição morfológica

Os adultos são pequenos insetos, medindo 1 a 2 mm de comprimento, possuem aparelho bucal picador-sugador e dois pares de asas membranosas, recobertas por uma substância pulverulenta de coloração branca. Quando em repouso, as asas são mantidas levemente separadas, com os lados paralelos formando uma espécie de teto sobre o abdome, que é de coloração amarela (HAJI et al., 2005).

As moscas brancas apresentam metamorfose incompleta, passando do estágio ovo para ninfa (Ínstares: I, II, III e VI) e depois para fase adulta. Os ovos têm o formato de pêra, coloração amarelada e são depositados na face inferior das folhas, presos por um pedúnculo curto. Quando os ovos estão próximos à eclosão ficam com coloração marrom. As ninfas são translúcidas de coloração amarela a amarelo-claro e apresentam aparelho bucal picador-sugador. Logo após a eclosão as ninfas, no primeiro ínstar (ínstar I), se locomovem sobre as folhas, fixam-se em um local pelo rostro e iniciam a sucção da seiva. Nos ínstars II e III permanecem fixadas no mesmo local e no último ínstar, tem a fase chamada de pupário (exúvia do último ínstar da ninfa) que antecede a emergência do adulto (HAJI et al., 2000; HAJI et al., 2005).

### 5.2.3 Reprodução e ciclo de vida

A reprodução pode ser sexuada ou partenogenética, ou seja, sem fecundação. O acasalamento ocorre após 12 a 48 horas da emergência do adulto e várias cópulas podem acontecer durante o ciclo de vida. O potencial reprodutivo da mosca branca depende do potencial do biótipo, nos aspectos de fecundidade, duração do ciclo biológico e razão sexual (HILJE, 1995). O desenvolvimento da mosca branca é influenciado pelo período seco, sendo que a precipitação contribui para a redução de sua população.

A temperatura é um dos fatores que mais influenciam na duração do ciclo de vida, sendo a duração média de 19 dias a uma temperatura de 32 °C e pode chegar até 73 dias a 15 °C (SALGUEIRO, 1993). Sob condições favoráveis a mosca branca pode ter de 11 a 15 gerações por ano e as fêmeas podem ovopositar de 100 a 300 ovos durante seu ciclo de vida (BROWN; BIRD, 1992). Na cultura do tomateiro, Salas e Mendoza (1995) relataram um ciclo de aproximadamente 22,3 dias, do ovo a fase adulta sob condições de 65% de umidade e 25 °C de temperatura. Estes resultados assemelham-se aos dados obtidos por Mizuno e Villas Bôas (1997) com *Bemisia tabaci* biótipo B, cujo ciclo de vida foi  $22,9 \pm 1,1$  dias à temperatura de  $25 \pm 2$  °C e ao trabalho realizado por Villas Bôas (2000) com *B. argentifolii*, cujo ciclo biológico foi  $22,4 \pm 0,4$  dias, a  $28 \pm 2$  °C com umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e um fotoperíodo de 14 horas. Nas condições do Submédio do Vale do São Francisco, o ciclo de *B. argentifolii* foi de  $20,49 \pm 1,14$  dias, sob temperatura de  $24,74 \pm 0,53$  °C e  $75,91 \pm 2,55\%$  de umidade relativa (MOREIRA et al., 1999).

De forma geral, os estudos apresentados sobre os aspectos biológicos da mosca branca em tomate demonstraram resultados similares, sendo as diferenças observadas devido às condições climáticas, principalmente de temperatura e umidade.

### 5.2.4 Dispersão geográfica e histórico

O provável centro de origem da *B. tabaci* é no Oriente, tendo sido introduzida na Europa, Bacia Mediterrânea, África, Ásia, América Central (Panamá, Costa Rica, Nicarágua, República Dominicana, Guatemala, El Salvador, Cuba e Honduras), América do Sul (Brasil, Argentina, Colômbia, Venezuela) e Bacia do Caribe pelo transporte de plantas ornamentais (BROWN et al., 1995a). A mosca branca já está distribuída mundialmente e causa prejuízos em várias culturas de importância econômica, devido a sua capacidade de se adaptar a diversos hospedeiros e condições climáticas, podendo ser

encontrada em áreas tropicais, subtropicais e temperadas (BROWN, 1993; SALGUEIRO, 1993).

*B. tabaci* tem sido capaz de desenvolver biótipos com características morfológicas similares, porém com diferentes hábitos, características reprodutivas e adaptabilidade a outras culturas e clima (SALGUEIRO, 1993).

No Brasil, em 1923 os primeiros relatos da *B. tabaci* foram feitos por Bondar (1928). No final da década de 60, diversos vírus transmitidos pela mosca branca já tinham sido identificados, mas todos considerados como causadores de doenças secundárias, sem importância econômica, em razão da baixa incidência com que ocorriam nas culturas (COSTA, 1975).

Em 1968 foi relatado mosca branca em algodão por Costa et al. (1973) e em 1972 foram relatadas populações elevadas de *B. tabaci* em algumas regiões do norte do Paraná e no sul de São Paulo nas culturas de soja, feijão, algodão, girassol e outras. Em 1975, também foi observada infestações de mosca branca no norte do Estado de São Paulo, em culturas de soja e algodão. Com o aumento da população da mosca branca foi observado um aumento na incidência de doenças causadas por geminivírus em algumas culturas, especialmente no feijoeiro com alta incidência do vírus do mosaico dourado do feijoeiro ("*Bean golden mosaic virus*" - BGMV), pelo fato das moscas brancas atuarem como vetores desses vírus (ATSUSHI, 2001).

No início da década de 90 foram constatados surtos elevados de mosca branca no Sudeste (São Paulo e Minas Gerais), Centro-Oeste (Goiás e Distrito Federal) e Nordeste (Pernambuco, Bahia, Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí e Paraíba), causando prejuízos em diversas culturas de importância econômica. O rápido aumento da população de mosca branca na olericultura e em culturas ornamentais em São Paulo levou à identificação de um novo biótipo de *B. tabaci*, denominado de biótipo B (MELO, 1992; LOURENÇÃO E NAGAI, 1994).

Em 1993, no Distrito Federal os primeiros surtos com o biótipo B se deram na cultura do tomate industrial e pepino (FRANÇA et al., 1996) e em Barreiras-BA no feijoeiro. Na região Nordeste do Brasil, no final de 1995, foram constatados altos níveis populacionais da mosca branca em hortaliças, fruteiras e plantas daninhas no Submédio do Vale do São Francisco, sendo que em 1996 a maioria dos estados do Nordeste tinha infestações ocasionando danos econômicos (HAJI et al., 1996a; HAJI et al., 1996b; HAJI et al., 1997, HAJI et al., 2000).

### 5.2.5 Danos causados à agricultura

A mosca branca é responsável por causar grandes danos à agricultura por possuir desenvolvimento rápido e ser adaptada a diversos hospedeiros, colonizando mais de 700 espécies de plantas, incluindo algumas das famílias cucurbitáceas (abóbora, melancia e melão), solanáceas (tomate e pimentão), brássicas (couve), fabáceas (soja e feijão), euforbiáceas (mandioca, leiteiro e marmeleiro), malváceas (algodão) e plantas ornamentais (crisântemo) (FERREIRA; AVIDOS, 1998; HAJI et al., 2004; LI et al., 2011).

Esses insetos podem causar danos diretos pela sucção da seiva, na parte abaxial das folhas, e pela injeção de toxinas e substâncias açucaradas responsáveis por reduzir a turgescência das plantas e favorecer o desenvolvimento de fumagina nas folhas. Como consequência, observam-se reduções tanto na capacidade fotossintética, quanto na produção e na qualidade dos frutos (BYRNE; BELLOWS JUNIOR, 1991; SALGUERO, 1993).

Além dos danos diretos, podem causar danos indiretos pela transmissão de vírus, principalmente os pertencentes ao grupo dos geminivírus. Entre os agentes virais transmitidos por *B. tabaci*, 90% pertencem ao gênero *Begomovirus* (Família *Geminiviridae*), 6% ao gênero *Crinivirus* (Família *Closteroviridae*) e os 4% restantes pertencem aos gêneros *Closterovirus* (Família *Closteroviridae*), *Ipomovirus* (Família *Potyviridae*), *Carlavirus* (Família *Betaflexiviridae*) e *Torradovirus* (OLIVEIRA et al., 2001; JONES, 2003; DE BARRO et al., 2011; LI et al., 2011; NAVAS-CASTILLO et al., 2011).

### 5.2.6 Impacto na cultura do tomateiro

A mosca branca é responsável por causar grandes danos à cultura do tomateiro, uma vez que age como vetor de diferentes gêneros virais, com destaque para os do gênero *Begomovirus* (BROWN et al., 1995b; SEAL et al., 2006). Nesse sentido, a literatura destaca graves epidemias de begomovirose que, em grande parte, decorrem da dificuldade de controle do seu inseto vetor, a mosca branca (GIORDANO et al., 2005; FERNANDES et al., 2008). Além das doenças viróticas causadas pelos *Begomovirus* tem as causadas por agentes virais do gênero *Crinivirus*, *Closterovirus* e *Ipomovirus* que atacam o tomateiro (OLIVEIRA et al., 2001; DE BARRO et al., 2011; LI et al., 2011).

Ademais, apontam-se para danos diretos causados pela sucção da seiva pela mosca branca, responsáveis por afetar a capacidade fotossintética e a qualidade dos frutos. Danos



causados nos frutos são evidenciados por anomalias ou desordens fitotóxicas, caracterizadas pelo amadurecimento irregular, dificultando o ponto de colheita e reduzindo a qualidade da pasta, no caso do tomate para indústria (LOURENÇÃO; NAGAI, 1994), e pela isoporização dos frutos, que ficam com aspecto esponjoso e esbranquiçado internamente (HAJI et al., 1996a).

Tais impactos sobrepesam no custo total de produção, uma vez que os inseticidas, de uma forma geral, encontram-se no rol de insumos que elevam o preço final, segundo o posicionamento de Carvalho et al. (2014).

### 5.2.7 Controle

O manejo da mosca branca é bastante complexo e constitui um grande desafio devido à sua natureza invasora, caracterizada pela alta taxa de reprodução, por possuir um grande número de hospedeiros, pela habilidade de desenvolver biótipos e adaptar-se a condições adversas, e pela capacidade de desenvolver resistência aos inseticidas (HAJI et al., 2000).

Danos causados pela mosca branca podem ser minimizados através da adoção de controle cultural, químico e biológico. Como controle cultural pode ser utilizado barreiras vivas evitando que os insetos cheguem nas plantas cultivadas, como demonstrado no trabalho de Salgueiro (1993) em experimento realizado em tomate na Guatemala com barreira constituída por plantas de sorgo, mostrando uma redução na população das moscas brancas e de plantas infectadas com viroses, além de evitar a perda de unidade e favorecer a produção de frutos. No Brasil, barreiras vivas com sorgo e milho foram utilizadas na prevenção da infestação de *B. tabaci* no Paraná e mostraram redução na incidência de mosaico em feijão de 40 e 60%, na época inicial da floração e na época de maturação, respectivamente (INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ - IAPAR, 1984).

Podem ser utilizadas também outras medidas de controle cultural como uso de plântulas sadias e isentas de vírus (HILJE, 1999), produção de mudas em telados e uso de plantas armadilhas, como pepino e berinjela, associadas à aplicação de inseticidas.

Em relação ao controle biológico da mosca branca vários estudos foram baseados, principalmente, na busca de inimigos naturais. No Brasil, alguns parasitóides foram descritos e encontrados entre as populações de *Bemisia* spp., entre eles a *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) em São Paulo e no norte do estado do Paraná, uma espécie de *Signiphora* (Hymenoptera: Signiphoridae) e setes espécies de *Encarsia*, com

destaque para *Encarsia porteri* (Hymenoptera: Aphelinidae) a mais comum (MENEZES JÚNIOR et al., 1996). No Submédio do Vale do São Francisco, foram registradas ocorrências do parasitóide *Encarsia lutea* (Hymenoptera: Aphelinidae), do hiperparasitóide *Signiphora aleyrodis* (Hymenoptera: Signiphoridae) (MOREIRA et al., 1999), dos predadores *Cyclonela* sp. (Coleoptera: Coccinellidae), *Orius* sp. (Hemiptera: Anthocoridae), *Chrysoperla* sp. (Neuroptera, Chrysopidae) e ácaros da família Phytoseiidae (HAJI et al., 2005).

O controle químico é o mais utilizado, porém a aplicação de inseticidas tem controlado inicialmente o inseto, porém a seleção de insetos resistentes tem sido um fator limitante. Outro ponto relevante a ser considerado é que os pesticidas geralmente utilizados são a base de neonicotinoides e, também, podem atingir a insetos benéficos (IBRAHIM et al., 2015).

Para o controle da infestação de mosca branca são feitas várias aplicações de inseticidas por ciclo da cultura, sendo considerado o nível de dano econômico de 1 a 3 insetos por planta, que já é suficiente para causar perda total de um cultivo, devido a transmissão de viroses pela mosca branca. Os danos causados à agricultura e a manifestação de mecanismos de resistência da mosca branca a inseticidas, evidenciam a necessidade do desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes (IBRAHIM et al., 2015).

O uso de plantas resistentes é um dos métodos mais recomendáveis para o controle de doenças e pragas, por possibilitar uma redução nos custos de produção, maior segurança e sustentabilidade, sendo de grande importância para a agricultura o desenvolvimento de plantas resistentes que apresentem características agrônomicas desejáveis (QUIRINO, 1998)

Técnicas de engenharia genética podem ser utilizadas como ferramentas importantes para obtenção de plantas resistentes modificadas geneticamente, pela inserção de genes até o momento indisponíveis na cultura, contribuindo para o aumento da variabilidade genética.

### 5.3 *ATPase vacuolar H<sup>+</sup>*

A ATPase H<sup>+</sup> vacuolar, também conhecida como v-ATPase, é uma enzima conservada que atua como uma bomba de prótons em células eucarióticas (FINBOW; HARRISON, 1997; NELSON et al., 1999, NELSON et al., 2000). A v-ATPase está presente nas membranas de compartimentos intracelulares, tais como vesículas,

lipossomas, endossomas, vacúolos, vesículas sinápticas, retículo endoplasmático, grânulos secretores e no complexo de Golgi (FINBOW; HARRISON, 1997; STEVENS; FORGAC, 1997). A sua função enzimática é conduzida pelo consumo de ATP, transformando a energia proveniente da hidrólise de ATP em diferentes potenciais eletroquímicos de prótons nas membranas biológicas pelo bombeamento de H<sup>+</sup> (BEYENBACH; WIECZOREK, 2006).

As v-ATPases possuem uma estrutura única composta de 14 subunidades de proteínas dispostas em dois complexos, designadas V0 e V1, sendo que V1 é um complexo citoplasmático que medeia a hidrólise de ATP e o complexo V0 transloca o H<sup>+</sup> pela membrana (BEYENBACH; WIECZOREK, 2006). A supressão da subunidade A do domínio V1, responsável pela hidrólise de ATP, é letal (BAUM et al., 2007; UPADHYAY et al., 2011).

#### 5.4 RNAi no controle de insetos

O silenciamento gênico pós-transcricional ou RNA interferente é uma das estratégias da engenharia genética, que pode ser utilizada para obtenção de plantas resistentes e/ou tolerantes a pragas (WANG et al., 2000; BONFIM et al., 2007; ARAGÃO et al., 2013). O mecanismo de RNAi envolve a ação de uma endonuclease RNase III, chamada DICER, que possui o papel importante de clivar moléculas de dsRNA, em siRNA (pequenos RNAs interferentes) e em miRNA (microRNA), de 21 a 25 nucleotídeos (ANGOJI et al., 2010). Os siRNAs após associarem-se ao complexo ribonucleoprotéico, denominado como RISC (RNA-induced Silencing complex), servirão de guia para detecção de sequências específicas complementares ao RNA mensageiro. Ao encontrar homologia, haverá a degradação, pela ação de proteínas associadas ao complexo RISC, denominadas argonautas, ou a não tradução, controlando a expressão gênica (JINEK E DOUDNA, 2009; KABIR et al., 2008).

Antes da descoberta dos mecanismos de RNAi, vários entraves limitavam os estudos da função de genes específicos de insetos (GARBUETT, 2011). O uso da proteína Cry de *Bacillus thuringiensis* permite um controle de pragas mastigadoras, como lepidópteros e coleópteros, porém alguns insetos sugadores, como a mosca branca, não são controlados por essas proteínas (DUTT, 2007; VIRLA et al., 2010; NELSON et al., 2000). Na busca de controlar insetos sugadores, podem ser utilizadas algumas proteínas, tais como quitinases, lectinas e inibidores de enzima, para proporcionar um certo grau de resistência. Entretanto, a maioria dessas proteínas apresentam baixa especificidade e

toxicidade, podendo levar a resistência de alguns insetos por adaptações fisiológicas. Além disso, algumas dessas proteínas, como inibidores enzimáticos e lectinas, possuem nutrientes que podem ser tóxicos aos mamíferos, inclusive aos humanos (GATEHOUSE et al., 1995; VAN DAMME et al., 1998; CARLINI; GROSSI-DE-SA, 2002).

A tecnologia de RNAi pode ser utilizada para o controle de pragas com maior especificidade. Foram relatados o uso de RNAi no controle de coleópteros, como *Diabrotica virgifera virgifera* (BAUM et al., 2007) e de *Diabrotica speciosa*, e de lepidópteros, como de *Helicoverpa armigera* pelo silenciamento do gene *CYP6AE14* mediado por plantas transgênicas (MAO et al., 2007). Essas novas estratégias de controle, com diferentes modos de ação, são importantes para evitar emergência de insetos resistentes às proteínas Cry (BAUM et al., 2007) e para controle de insetos de maneira mais específica.

Recentemente, foi liberado o milho transgênico MON 87411 resistente a *Diabrotica speciosa*, praga de raiz, e tolerante ao herbicida glifosato, utilizado para controle de plantas daninhas. A resistência à *D. speciosa* se dá pela expressão da proteína endógena Cry3Bb1 e pela expressão de dsRNAs *DvSnf7*. Os dsRNAs ao serem ingeridos pelas larvas da *D. speciosa* são reconhecidos pela maquinaria de RNAi das larvas, resultando na redução ou supressão da expressão do gene alvo *DvSnf7* (MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES – MCTIC/PARECER TÉCNICO N° 5.162/2016).

Para o controle de mosca branca, o desenvolvimento do método de administração de siRNA e dsRNA de *v-ATPase*, através da alimentação, mostrou-se eficiente no controle desse inseto (UPADHYAY et al., 2011). Trabalhos recentes relataram uma redução da população de moscas brancas, através do silenciamento do gene *v-ATPase*, em plantas transgênicas de tabaco (THAKUR et al., 2014) e alface (IBRAHIM et al., 2015), expressando siRNAs de *v-ATPase*. Os siRNAs ingeridos pelos insetos induzem o silenciamento da *v-ATPase*, aumentando assim a taxa de mortalidade e alteração do ciclo da mosca branca (THAKUR et al., 2014, IBRAHIM et al., 2015).

### 5.5 Transformação genética do tomateiro

O tomateiro é considerado uma planta modelo de transformação de plantas dicotiledôneas (MCCORMICK et al., 1986; LING et al., 1998). O primeiro relato de transformação de tomate foi feito por McCormick et al. (1986), e vários outros trabalhos de transformação foram relatados (CHYI AND PHILLIPS, 1987; FILLATTI et al., 1987;

FISCHHOFF et al., 1987; DELANNAY et al., 1989; DAVIS et al., 1991a; DAVIS et al., 1991b; VAN ROEKEL et al., 1993; HAMZA;CHUPEAU,1993; PATIL, 1994; AGHARBAOUI et al., 1995; FRARY, 1995; FRARY; EARLE, 1996; LING et al., 1998; TABAEIZADEH et al., 1999; VIDYA et al., 2000; COSTA et al., 2000; HU; PHILLIPS, 2001; PARK et al., 2003; RAJ et al., 2005; SUN et al., 2006, QIU et al., 2007).

No trabalho desenvolvido por Sun et al. (2006) foi relatado alta eficiência de transformação de tomate via *Agrobacterium*, utilizando a cultivar Micro-tom. A variedade Micro-tom é considerada como modelo para abordagens genômicas, por apresentar características vantajosas, tais como tamanho pequeno, ciclo curto (70 a 90 dias) e ser de fácil transformação genética (SUN et al., 2006; QIU et al., 2007).

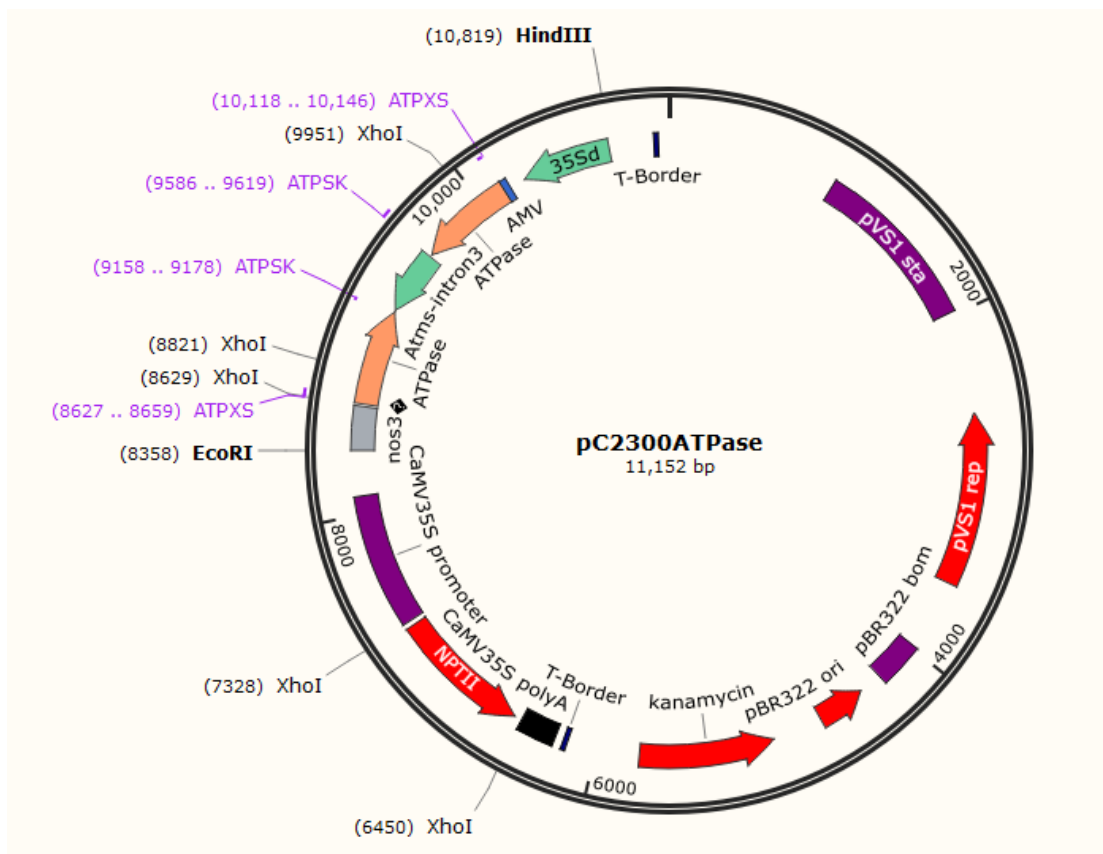
## 6. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos de laboratório foram executados na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília-DF, no Laboratório de Engenharia Genética Aplicada à Agricultura Tropical.

### 6.1 Vetores

#### 6.1.1 pCAMBIA 2300ATPase

O plasmídeo pC2300ATPase contém o cassete de supressão, envolvendo um fragmento de DNA com sequências repetidas invertidas *in tandem* com homologia a uma região do gene de *v-ATPase* de *Bemisia tabaci*, e o gene de seleção *npt II* que confere resistência à canamicina e à paramomicina, utilizado para selecionar as células transformadas (Figura1).



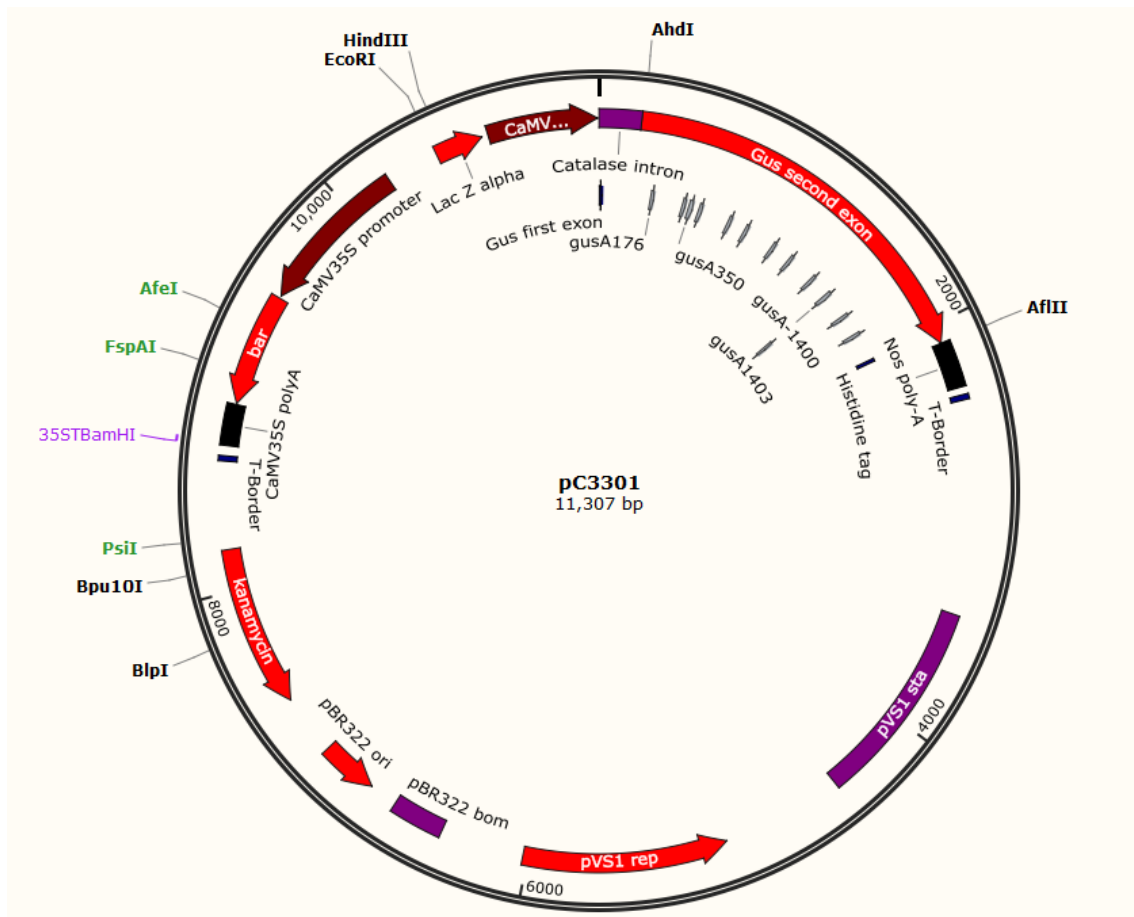
**Figura 1:** Representação esquemática do vetor pC2300ATPase que contém as construções de RNAi para sequências específicas do gene *v-ATPase* de mosca branca, e o gene *npt II*, que codifica para a enzima NPTII (Neomicina Fosfotransferase tipo II) e confere resistência à canamicina e paramomicina.

O cassete de supressão, contendo sequências repetidas invertidas *in tandem* com homologia a uma região do gene de *v-ATPase* de *Bemisia tabaci*, foi retirado do vetor pBtATPaseC3300 desenvolvido por Ibrahim et al. (2015), pela digestão com as enzimas de restrição Hind III e EcoRI. O fragmento obtido foi ligado nos sítios Hind III e EcoRI no vetor pCAMBIA2300, resultando no vetor pC2300ATPase. O vetor pC2300ATPase foi utilizado para transformar explantes cotiledonares de tomate da variedade Micro-Tom via *Agrobacterium tumefaciens* EHA105.

Segundo Ibrahim et al. (2015), para a obtenção da sequência *v-ATPase* foi feita uma busca no banco de dados NCBI realizada a partir de seis sequências relacionadas de *Helicoverpa armigera*, *Bombyx mori*, *Culex quinquefasciatus*, *Ostrinia furnacalis*, *Manduca sexta* e *Spodoptera litralis*, que foram identificadas e alinhadas usando o programa MEGA5. A região conservada do alinhamento foi utilizada para conceber os primers que amplificam a região *v-ATPase*, e esses primers foram utilizados para amplificar um fragmento de *v-ATPase* do DNA genômico extraído de *Bemisia tabaci*. O fragmento obtido foi clonado no vetor pGEM-T Easy® (Promega) e, posteriormente, sequenciado pela empresa Macrogen (Coréia). A sequência obtida de 576 pb foi clonada no vetor pSIU, desenvolvido por Tinoco et al. (2010), no sentido sense e antisense separado por intron para assegurar a formação de grampo (IBRAHIM et al., 2015).

### 6.1.2 pCAMBIA3301

O vetor binário pCAMBIA3301 possui o gene repórter *gus* ( $\beta$ -glucuronidase) e o gene marcador de seleção *bar*, que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio (GA), sob o controle do promotor constitutivo CaMV35S (Figura 2). O vetor pC3301 foi utilizado para agroinfiltração de frutos da variedade Pepe.

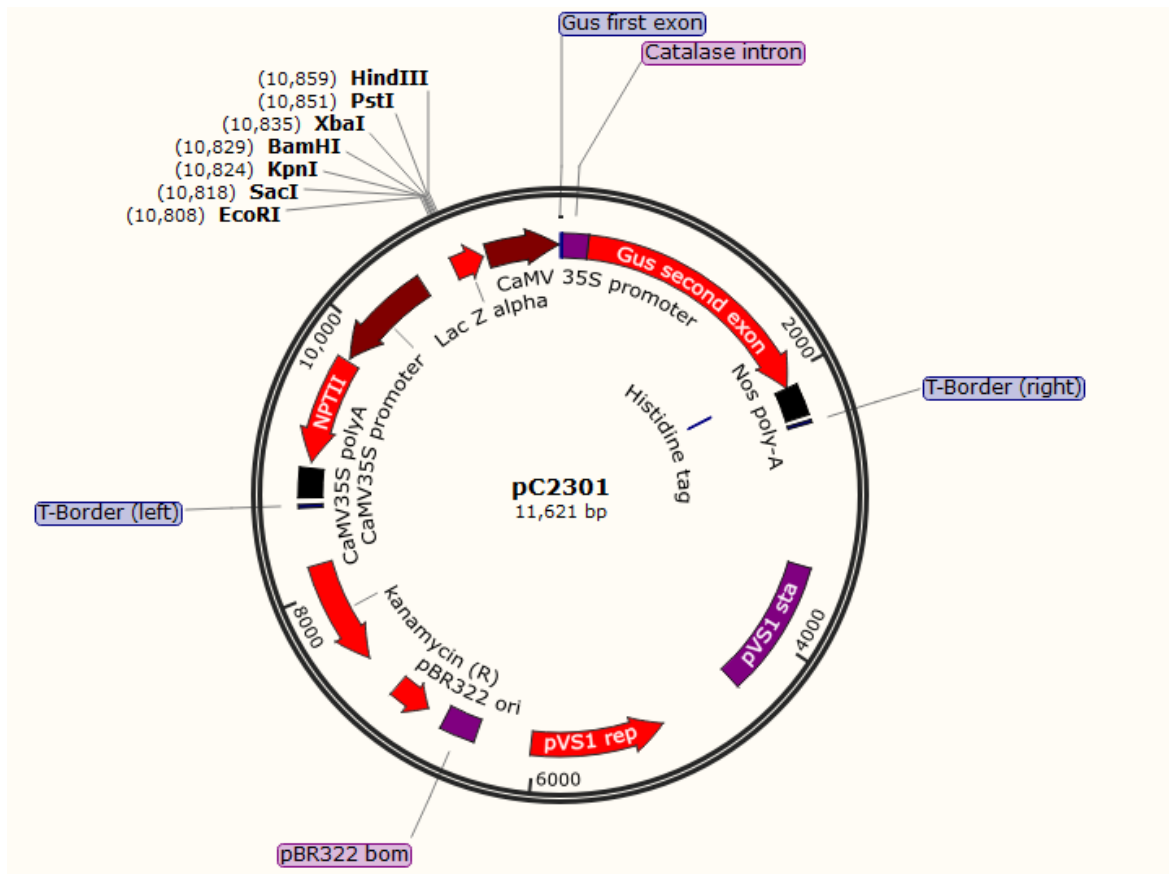


**Figura 2:** Representação esquemática do vetor pCAMBIA3301 que contém o gene repórter *gus* e o gene de seleção *bar*, que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio (GA), sob o controle do promotor constitutivo CaMV35S.

### 6.1.3 pCAMBIA2301

O vetor binário pCAMBIA 2301 contém o gene repórter *gus* ( $\beta$ - glucuronidase) e o gene de seleção *npt II* que confere resistência à canamicina e à paramomicina (Figura 3). O vetor pC2301 foi utilizado para agroinfiltração de frutos da variedade Pepe.





**Figura 3:** Representação esquemática do vetor pCAMBIA2301 que contém o gene repórter *gus* e o gene de seleção *npt II*, que confere resistência à canamicina e à paramomicina, sob o controle do promotor constitutivo CaMV35S.

## 6.2 Transformação de bactérias

### 6.2.1 *Escherichia coli*

Células eletrocompetentes de *E. coli* foram transformadas por eletroporação com cada plasmídeo de interesse. As amostras foram plaqueadas em meio LB (Luria-Bertani) sólido, contendo canamicina (100 mg/L) para seleção, e foram incubadas *overnight* a temperatura de 37 °C. Clones selecionados foram multiplicados em 3 mL de meio LB líquido, contendo canamicina, e após crescimento, por 16 horas a 37 °C, foram feitas mini-preps para purificação do DNA, de acordo com protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001). As clonagens foram confirmadas, por análise de restrição com diferentes enzimas, e os clones de cada transformação foram selecionados de acordo com o perfil de restrição esperado.

### 6.2.2 *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA-105

*Agrobacterium tumefaciens* cepas EHA-105 desarmadas, que possuem gene de resistência à rifampicina, foram transformadas por eletroporação, para formação de três linhagens de *A.tumefaciens* diferentes, contendo o DNA dos plasmídeos de interesses pC2300ATPase, pCAMBIA2301 e pCAMBIA3301 (LACORTE; ROMANO, 1998). Amostras de 100 µL de cada transformação foram plaqueados em meio LB sólido, contendo canamicina (100 mg/L) e rifampicina (100 mg/L) para seleção, e incubadas a 28 °C por 2 dias. Clones obtidos foram multiplicados em meio LB líquido com os antibióticos seletivos por 3 dias a 28 °C e 180 rpm. Dos clones crescidos em meio LB líquido foram preparadas diferentes alíquotas das *A.tumefaciens* transformadas, com acréscimo de glicerol autoclavado. As alíquotas foram armazenadas em freezer -80 °C, com concentração final de 25% de glicerol.

### 6.3 Obtenção do material vegetal

#### 6.3.1 Germinação *in vitro* de sementes da variedade Micro-Tom

Sementes de tomate da variedade Micro-Tom foram esterilizadas para germinação *in vitro*, para isso, sementes foram submersas em solução de etanol 70% durante um minuto. Logo após, a solução de etanol 70% foi retirada e as sementes foram submersas em uma solução de hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos, seguido de cinco enxágues com água destilada autoclavada, com auxílio de uma peneira de alumínio previamente autoclavada. As sementes foram secas em papel filtro autoclavado e transferidas para frascos contendo 30 mL de meio de germinação, composto por ½ MS com vitamina, 1,5% de sacarose e 0,7% ágar, com pH ajustado para 5.7. A germinação foi conduzida por um período de 8 a 10 dias em câmara de cultura a  $25 \pm 2$  °C. Inicialmente os frascos foram mantidos no escuro por volta de 6 dias e após foram transferidos para luz sob fotoperíodo de 16 h.

#### 6.3.2 Obtenção de frutos da variedade Pepe

Sementes de tomate da variedade Pepe, foram inicialmente germinadas em vermiculita. Após 2 a 3 semanas, as plântulas germinadas foram transferidas para vasos com substrato e solo, na proporção de 1:1, e mantidas em casa de vegetação para produção de frutos.

#### 6.4 Curva de seleção com explantes cotiledonares

Foi realizada uma curva de seleção com canamicina e paramomicina, nas concentrações de 0; 25; 50 e 100 mg/L para cada antibiótico, visando definir o agente seletivo mais adequado e a respectiva concentração que permita a seleção de células transformadas, de explantes cotiledonares, e a regeneração das mesmas.

Para estabelecimento da curva de seleção, foram utilizados explantes cotiledonares provenientes das plântulas de Micro-Tom germinadas *in vitro*. Em câmara de fluxo laminar, os cotilédones foram removidos, com auxílio de pinça e bisturi estéreis, e cortados ao meio de forma transversal, retirando também as extremidades, partes proximais e distais das folhas, originando dois explantes por folha. Os explantes cotiledonares obtidos foram inoculados com a parte abaxial virada para baixo, em contato com o meio de indução contendo diferentes concentrações dos antibióticos, canamicina ou paramomicina. Para cada tratamento foram feitas duplicatas.

O meio de indução foi composto por sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose 2%, PVP 200 mg/L, MES 200 mg/L, nitrato de prata 2 mg/L, zeatina 5 µM, AIA 0,1 µM, vitamina B5, Timentin 100 mg/L, cefotaxima 200 mg/L e ágar 0,6%, pH 5,7.

#### 6.5 Transformação genética

##### 6.5.1 Transformação de explantes cotiledonares mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Para a transformação genética, alíquotas de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o plasmídeo pC2300ATPase foram plaqueadas em meio AB sólido (CHILTON et al., 1974), contendo os antibióticos rifampicina (100 mg/L) e canamicina (100 mg/L), e incubadas por 2 a 3 dias, a 28 °C. Em seguida, parte da cultura bacteriana crescida no meio AB sólido foi coletada com auxílio de uma espátula e ressuspendida em um tubo de 50 mL tipo Falcon com meio de cocultura líquido, composto por sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose 3%, PVP 200 mg/L, MES 200 mg/L, BAP 5 µM, AIA 0,1 µM, acetoseringona 200 µM, cisteína 400 mg/L e vitamina B5, com pH ajustado para 5,2.

A suspensão bacteriana foi homogeneizada, em agitador tipo Vortex™, e diluída até a obtenção de uma OD600 = 0,5, mensurada em espectrofotômetro

(BioPhotometerplus - Eppendorf). Os cotilédones provenientes de plântulas de Micro-Tom germinadas *in vitro*, por 8 a 10 dias, foram retirados e colocados em uma placa Petri contendo a suspensão bacteriana. Com auxílio de pinça e bisturi estéreis, os cotilédones foram cortados ao meio, de forma transversal, e nas extremidades distais e proximais das folhas, em contato com a *Agrobacterium*. Explantes cotiledonares obtidos ficaram imersos na suspensão bacteriana por 30 minutos. Alguns cotilédones foram cortados apenas em meio de cocultura líquido, sem a presença da bactéria, e também permaneceram imersos no meio por 30 minutos, para compor o controle do experimento. Em seguida, os explantes foram secos, em papel filtro autoclavado, e inoculados, com a superfície abaxial voltada para baixo, em meio de cocultura sólido, durante 48 horas no escuro a  $25 \pm 2$  °C. Para meio de cocultura sólido foi utilizada a mesma composição do meio de cocultura líquido com adição de 0,6% de ágar.

Após dois dias em cocultura sólida, os explantes foram transferidos para meio de indução contendo o agente seletivo para regeneração de explantes transformados. Parte dos explantes do controle foram transferidos para meio de indução sem antibiótico para análise da regeneração *in vitro*, e a outra parte foi transferida para meio com o agente seletivo para análise da seleção. Os explantes foram inoculados com a superfície abaxial em contato com o meio e as placas foram vedadas com micropore. A cada 15 dias, os explantes foram transferidos para novo meio de indução com seleção.

### 6.5.2 Agroinfiltração

Alíquotas das linhagens transformadas de *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105, uma contendo o plasmídeo pCAMBIA2301 e a outra contendo o plasmídeo pCAMBIA3301, foram plaqueadas separadamente em meio AB sólido (CHILTON et al., 1974), contendo os antibióticos rifampicina (100 mg/L) e canamicina (100 mg/L). As placas foram incubadas por 2 dias, à 28 °C. Em seguida, a cultura bacteriana crescida no meio AB sólido foi raspada, com auxílio de uma espátula, e ressuspensa em meio de agroinfiltração, composto por ½ sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose 5%, MES 0,05%, Silwet L-77 0,02%, acetoceringona 100 µM e pH 5,7. Após a homogeneização da suspensão bacteriana, em agitador tipo Vortex™, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm e a densidade ótica (OD) da suspensão bacteriana foi ajustada para 0,1.

Frutos em diferentes estádios de maturação, provenientes de plantas de tomate da variedade Pepe, foram agroinfiltrados com as suspensões bacterianas preparadas. Para

representar o controle, foi injetado somente o meio de agroinfiltração. Foram utilizados frutos em 6 estádios diferentes, representados na figura 4, e as suspensões bacterianas foram injetadas com auxílio de seringa e agulha de insulina.



**Figura 4:** Estádios de maturação dos frutos da variedade Pepe agroinfiltrados.

Após o completo desenvolvimento dos frutos agroinfiltrados, foram coletadas as suas sementes. As sementes coletadas foram desidratadas em papel filtro a temperatura ambiente e, após, foram armazenadas em câmara fria, devidamente identificadas de acordo com o tratamento.

## 6.6 Material vegetal transformado

### 6.6.1 Regeneração de explantes cotiledonares após transformação genética

Após a transformação genética via *Agrobacterium*, os explantes foram cultivados em meio de indução na presença do agente seletivo, canamicina. Gemas resistentes ao antibiótico foram repicadas, até a diferenciação dos tecidos. Brotos emergentes permaneceram na seleção e foram transferidos para meio de alongamento composto por sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose 3%, vitamina B5, Timentin 100 mg/L, cefotaxima 200 mg/L, canamicina 25 mg/L e ágar 0,6%, pH 5,7.

Brotos bem desenvolvidos foram transferidos para um meio de enraizamento com o agente seletivo. O meio de enraizamento foi composto de sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose 3%, IBA 1 mg/L, vitamina B5, Timentin 100 mg/L, cefotaxima 200 mg/L, canamicina 25 mg/L e ágar 0,6%, com pH ajustado para 5,7. Alguns brotos enraizaram em meio de alongamento, não necessitando a transferência para o meio de enraizamento.

Com o desenvolvimento pleno das raízes, as plantas foram aclimatadas em casa de vegetação, em substrato (solo e vermiculita na proporção de 1:1), inicialmente cobertas com um saco plástico.

As plantas aclimatadas foram transferidas para vasos maiores e permaneceram em casa de vegetação para produção de frutos. Os frutos maduros foram colhidos e as sementes foram coletadas, identificadas e armazenadas a 4 °C.

#### *6.6.2 Germinação de sementes provenientes de frutos agroinfiltrados e seleção de plântulas transformadas*

Sementes de tomate provenientes dos frutos agroinfiltrados foram lavadas com água destilada e, após, submersas em solução de etanol 70% durante dois minutos, seguida de três enxágues com água destilada. Em seguida, as sementes lavadas foram tratadas com o fungicida Orthocide 500<sup>TM</sup> e colocadas para germinar em vermiculita. Para fornecimento de nutriente, visando o desenvolvimento das plântulas germinadas, foi adicionado adubo e borrifado uma solução 1X de sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

Para seleção das plântulas transformadas, foi pulverizada, após 1 mês, uma solução de 0,3% de glufosinato de amônio (GA) em plântulas provenientes dos tratamentos agroinfiltrados com *Agrobacterium*, contendo o vetor pC3301, que possui o gene de seleção *bar*, e uma solução de 0,3% de canamicina em plântulas provenientes dos tratamentos agroinfiltrados com *Agrobacterium*, contendo o vetor pC2301, que possui o gene de seleção *npt II*. Foram realizadas duas aplicações da solução, com espaçamento de 2 dias entre as mesmas.

### *6.7 Análises do material vegetal transformado*

#### *6.7.1 Ensaio de fluxo lateral*

Algumas plantas transgênicas, regeneradas a partir de explantes cotiledonares, foram analisadas utilizando o método de imunoenensaio de fluxo lateral (Lateral FlowStrip) que detecta a proteína NPTII (Neomicina Fosfotransferase tipo II). O teste foi realizado com pedaços de folhas maceradas na presença do tampão comercial fosfato-salino (PBS) 1X. Após obter o macerado, tiras foram inseridas para detectar a expressão de proteína.

### 6.7.2 Extração de DNA e PCR

O DNA das plantas regeneradas a partir de explantes cotiledonares foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987), com modificações. O material vegetal coletado foi macerado em tubos de centrifuga tipo Eppendorf na presença do tampão CTAB 2% (Cetyltrimethylammonium bromide) e incubados a 65 °C por 20 minutos. Para desnaturação e solubilização das proteínas foi adicionado clorofórmio-álcool isoamílico 24:1, e os tubos contendo a mistura foram homogeneizados em agitador do tipo Vortex<sup>TM</sup> e centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa formada na parte superior, que contém o DNA, foi coletada e transferida para um novo tubo, devidamente identificado. O DNA foi precipitado em isopropanol gelado, sendo homogeneizado e mantido por 10 minutos a temperatura ambiente, e logo após, centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com adição de etanol 70%, que foi novamente centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos. Por fim, o sobrenadante foi descartado e após secagem o sedimento foi ressuspenso em água milli-Q autoclavada.

O DNA extraído foi submetido a uma reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se a enzima Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen), conforme recomendado pelo fabricante. Para amplificar um fragmento de 576 pb do gene *v-ATPase* utilizou-se o par de iniciadores: ATPSX (5'CTGACTTCTAGAGCTCGCATCCGAAA GCGCCGGGAATG3') e ATPSK (5'ACGTACGGGTACCACTAGTCGGCGACC CTGTACAGCGAAC3') (Ibrahim et al., 2015). Em um termociclador, a reação foi submetida à 95 °C, por 5 minutos para desnaturação, e amplificada por 35 ciclos (95 °C por 1 min, 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos) com um ciclo final à 72 °C por 7 minutos.

Os produtos da PCR foram visualizados em transiluminador (Bio Rad Laboratories) após eletroforese em gel de agarose 1%, corrido em tampão TBE (Tris – borato - EDTA) 0,5X e corados com SYBR green.

### 6.7.3 Southern blot

Para visualizar as cópias do transgene no genoma de plantas transformadas, foi utilizada a técnica de *Southern blot*, conforme descrito por Sambrook e Russell (2001). O DNA genômico do tomateiro foi previamente extraído de folhas pelo método CTAB 2%, conforme descrito por Doyle e Doyle (1987), com modificações. Para a extração foram maceradas em nitrogênio líquido, com auxílio de um almofariz, 2 gramas de tecido

vegetal fresco, ou, aproximadamente, 1 grama de tecido vegetal seco, previamente congelado. O pó resultante da maceração foi transferido para um tubo de polipropileno contendo 15 mL de tampão CTAB 2% preaquecido a 65° C em banho-maria, com adição de 200 mg de PVP e 300 µL de β-mercaptoetanol (2%). Os tubos foram incubados a 65 °C em banho-maria, por 30 minutos, agitando manualmente a cada 10 minutos para homogeneizar. Logo após, foram adicionados um volume de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 (15 mL) e os tubos foram agitados manualmente por 10 minutos. Após, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 12.000 rpm a 4 °C. A fase aquosa (fase superior) foi transferida para novos tubos, devidamente identificados, e o processo foi repetido a partir da adição de um volume de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1. Após a segunda extração, foi adicionado 0,6 volume de isopropanol gelado, para precipitação dos ácidos nucléicos. A amostra foi homogeneizada pela inversão dos tubos e mantida por 30 minutos no freezer. Após, a amostra foi centrifugada por 20 minutos a temperatura de 4 °C a 12.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com, aproximadamente, 5mL de etanol 70% gelado e centrifugado novamente por 3 min. a 12.000 rpm a temperatura de 4°C. Por fim, o etanol foi descartado cuidadosamente e após secagem o sedimento foi ressuspensionado em 400 µL de água milli-Q autoclavada.

Aproximadamente 10 µg de DNA genômico foram digeridos com a enzima de restrição Hind III a 37 °C, *overnight*. Para separação dos fragmentos, os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corrido em tampão TBE (Tris – borato - EDTA) 0,5X. Após eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio e analisados em transiluminador (Bio Rad Laboratories). Logo após, o gel foi incubado por 10 min em solução de despurinação (0,25 M HCl), seguido de incubação por 30 min em solução de desnaturação, e mais 30 min em solução de neutralização. Após as lavagens, o DNA foi transferido por capilaridade em solução SSC 20X, para uma membrana de nitrocelulose carregada positivamente (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech). Após a transferência, a membrana foi exposta por 5 min a luz ultravioleta para fixação do DNA em equipamento UV crosslinking. A hibridização foi realizada utilizando um fragmento de 576 pb do gene *v-ATPase*, amplificado por PCR, marcado com [<sup>32</sup>P] dCTP. A membrana foi exposta à radioatividade (aos filmes de raio X) e após as bandas foram visualizadas com um analisador de imagem fluorescente.



#### 6.7.4 Ensaio histoquímico para detecção do gene *gus*

Algumas folhas de plântulas provenientes das sementes de frutos agroinfiltrados foram analisadas histoquimicamente para detecção da atividade enzimática da  $\beta$  – glucuronidase (GUS). Amostras foliares foram coletadas, aleatoriamente, antes da pulverização realizada para seleção das plântulas, e após a seleção foram coletadas amostras foliares de plantas sobreviventes. Amostras coletadas foram colocadas no X-Glu e incubadas a 37 °C *overnight*, para posterior análise.

#### 6.8 Análise das progênies

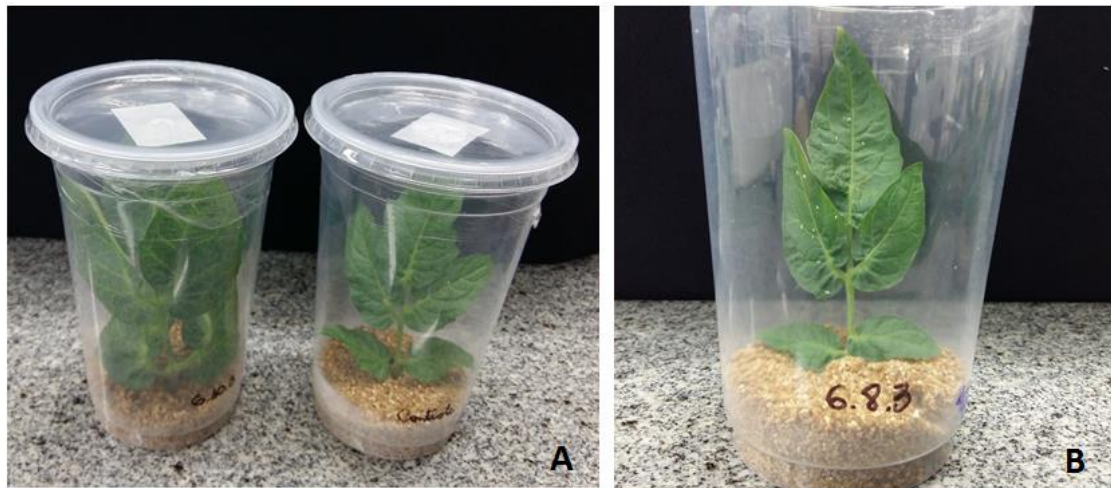
Das plantas transgênicas obtidas (geração T<sub>0</sub>), foram recolhidas as sementes de primeira geração (T<sub>1</sub>) de autofecundação, considerando que há baixa taxa de polinização cruzada. As sementes foram germinadas em terra: substrato e analisadas para a presença da v-ATPase por PCR. Para determinar se a taxa de segregação observada foi consistente com uma razão Mendeliana (3: 1 ou 15:1), ao nível de confiança de 95%, foi usado o teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson, com utilização do fator de correção de Yates, para os casos em que uma das frequências fossem menor que 5, ou quando o valor total de plantas avaliadas fosse menor que 20.

#### 6.9 Cultura de moscas brancas

As moscas brancas foram fornecidas pelo Dr. Josias Correa de Faria, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão. As moscas brancas foram liberadas em gaiolas contendo vasos com plantas de couve (*Brassica oleracea* L.) em casa de vegetação na Embrapa - Cenargen.

#### 6.10 Bioensaios com folhas de plantas transgênicas

Foi realizado um bioensaio com folhas destacadas de tomateiros transgênicos para análise preliminar da mortalidade de moscas brancas após se alimentarem das folhas transgênicas. Foram coletadas folhas de onze plantas transgênicas e de uma planta não transgênica para o controle. As folhas foram colocadas em pote plástico transparente contendo vermiculita umedecida. O pote foi fechado com uma tampa perfurada, e o furo foi selado por uma fita micropore, que permite a circulação de ar e não permite a saída das moscas (Figura 5 A). Quarenta e três moscas foram introduzidas em cada pote (Figura 5 B) e a população foi monitorada diariamente até o quinto dia. O sistema foi mantido em fotoperíodo de 16 horas a 25 ± 2 °C durante os cinco dias.



**Figura 5:** Bioensaio com folhas de tomateiros transformados ( $T_0$ ) para expressar siRNAs. (A) Sistema de monitoramento de mortalidade de moscas brancas. (B) Introdução de moscas brancas no sistema de monitoramento.

## 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

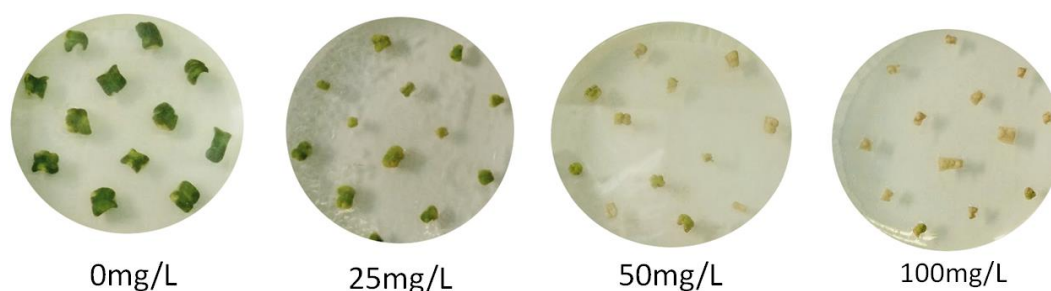
### 7.1 Curva de seleção de explantes cotiledonares

#### 7.1.1 Curva de seleção com paramomicina

Após 8 dias de cultivo, foi observada a morte de 64% e 80% dos explantes em meio de indução com concentrações de 50 ou 100 mg/L de paramomicina, respectivamente (Figura 6), e após 3 semanas todos explantes estavam mortos.

Inicialmente, diferenças entre os explantes inoculados em meio com concentração de 0 mg/L e 25 mg/L eram visíveis (Figura 6), sendo que em 25 mg/L de paramomicina os explantes, cresceram e entumeceram menos, além de apresentarem coloração mais amarelada e ausência da formação de gemas. Aproximadamente após 1 mês, a maioria dos explantes em meio com 25 mg/L de paramomicina não desenvolveu e morreu.

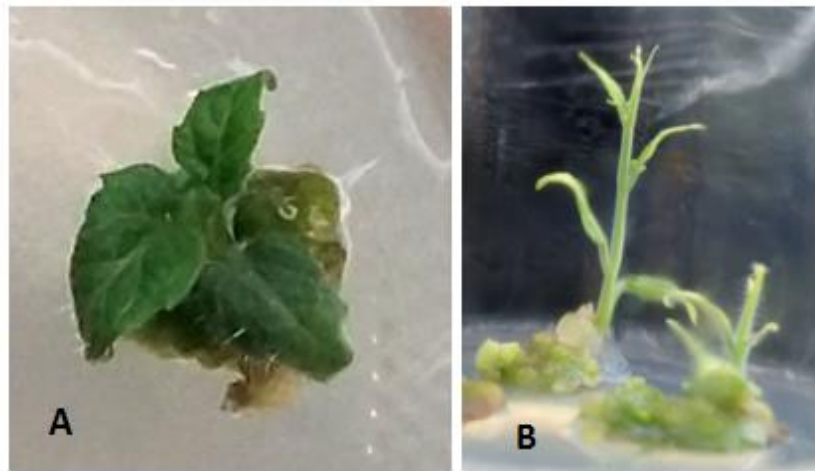
O uso de paramomicina foi relatado no trabalho Grover et al. (2015), que utilizou a concentração de 400 ppm de paramomicina para seleção de sementes transformadas, com vetor contendo o gene de seleção *npt II*, através de agroinfiltração de frutos da variedade Pusa Ruby. Para os explantes cotiledonares de tomate da variedade Micro-Tom, a paramomicina mostrou-se altamente tóxica, com mortalidade de 100% dos explantes após um mês de cultivo nos meios com concentrações de 25, 50 e 100 mg/L.



**Figura 6:** Curva de seleção de explantes cotiledonares de Micro-Tom cultivados em meio suplementado com diferentes concentrações de paramomicina: 0; 25; 50 e 100 mg/L, após 8 dias de cultivo.

Explantes na concentração 0 mg/L de antibiótico desenvolveram brotações após 5 semanas (Figura 7 A e 9A). Com objetivo de favorecer a alongação, os brotos foram

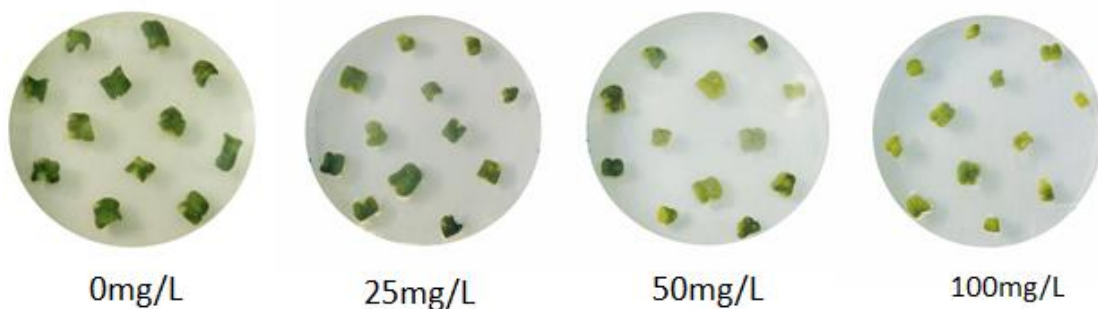
transferidos para meio de alongamento, a fim de analisar a regeneração *in vitro* a partir de explantes cotiledonares de tomate (Figura 7 B).



**Figura 7:** Brotações: (A) Broto proveniente da indução de explante em meio com 0 mg/L de antibiótico; (B) Brotos em meio de alongamento com 0 mg/L de antibiótico.

#### 7.1.2 Curva de seleção com canamicina

O uso do antibiótico canamicina apresentou ser menos drástico aos explantes, quando comparado ao uso da paramomicina. Diferenças entre o uso dos antibióticos foram observadas a partir do oitavo dia de cultivo (Figuras 6 e 8).

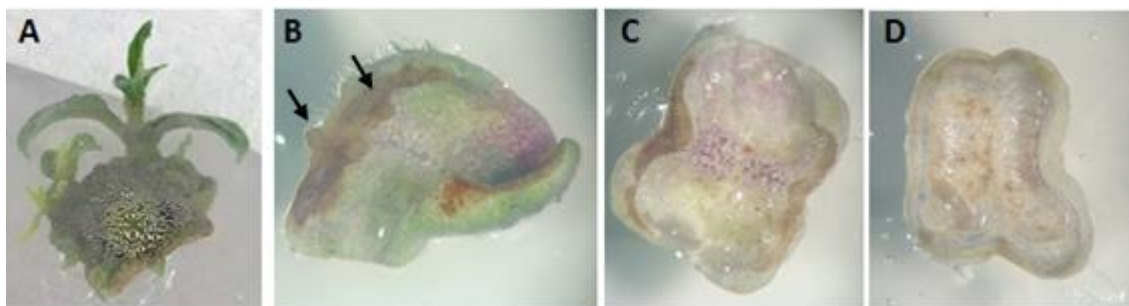


**Figura 8:** Curva de seleção de explantes cotiledonares de Micro-Tom cultivados em meio suplementado com diferentes concentrações de canamicina: 0; 25; 50 e 100 mg/L, após 8 dias de cultivo.

Ao final do experimento, conduzido por 2 meses, foi possível observar a inibição no desenvolvimento de brotações nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/L de canamicina.

Contudo, as concentrações de 50 e 100 mg/L de canamicina, além de inibir o desenvolvimento de gemas (Figura 9 C e D), provocaram a morte dos explantes após 5 semanas.

Em concentrações de 25 mg/L de canamicina, foi observado o início do desenvolvimento de algumas gemas, porém essas gemas oxidaram e não desenvolveram (Figura 9 B). As brotações provenientes de explantes em concentração 0 mg/L continuaram a ser repicados para regeneração (Figura 9 A).



**Figura 9:** Análise da emergência de gemas e brotos induzidos em diferentes concentrações de canamicina: 0; 25; 50 e 100 mg/L, após 5 semanas do cultivo. (A) Brotos emergentes em meio de indução sem canamicina; (B) Parte abaxial de explantes induzidos em meio com 25 mg/L de canamicina, apresentando gemas oxidadas, indicadas pelas setas; (C) Parte abaxial de explantes induzidos em meio com 50 mg/L de canamicina; e (D) Parte abaxial de explantes induzidos em meio com 100 mg/L de canamicina.

Em outros trabalhos de transformação de tomate com a variedade Micro-Tom, foi relatado o uso de canamicina como agente seletivo na concentração inicial de 100 mg/L (SUN et al., 2006; QIU et al., 2007). Porém, foi encontrada uma dificuldade de regeneração de brotos em meio com canamicina a 100 mg/L. Devido aos resultados iniciais da curva, a concentração de canamicina foi reduzida, inicialmente, para 50 mg/L, pois foi verificado a inibição de gemas nesta concentração. Após resultado final da curva de seleção, a concentração de 25 mg/L foi escolhida, pois apesar da formação de gemas iniciais, as gemas oxidaram e não foi visualizado regeneração de brotos.

Algumas coculturas iniciaram com a seleção de 50 mg/L de canamicina, com redução da concentração para 25 mg/L, após 3 semanas, e outras coculturas foram selecionadas na concentração constante de 25 mg/L. Não foram visualizadas diferença

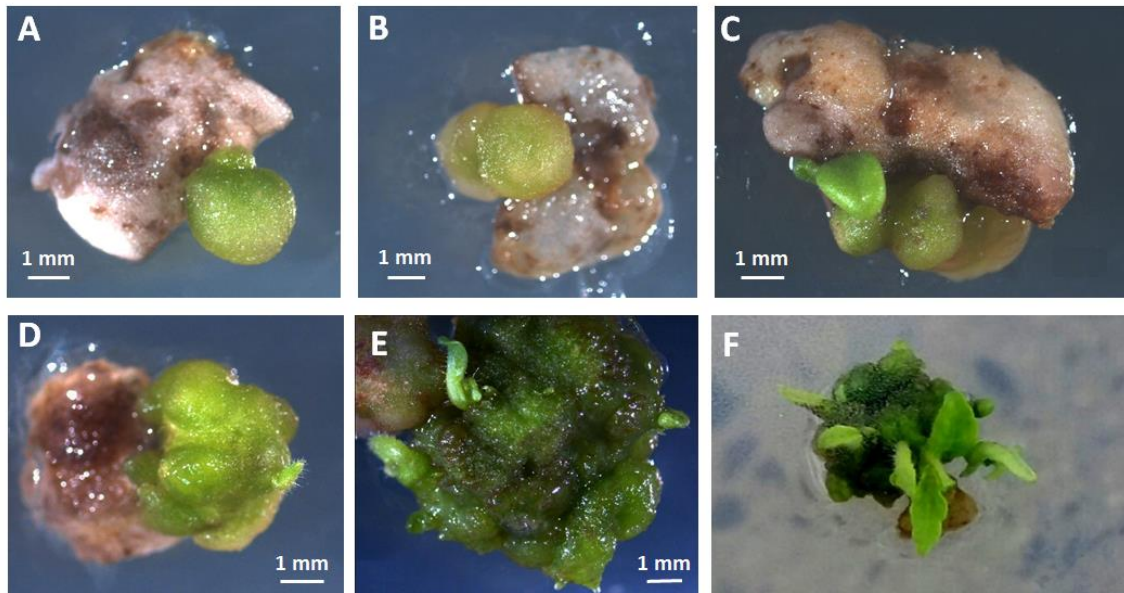
entre o tratamento iniciando com 50 mg/L de canamicina, com redução para 25 mg/L; do tratamento com concentração fixa de canamicina a 25 mg/L. Porém, acredita-se ser mais vantajoso iniciar a seleção com 50 mg/L, e após 3 semanas, reduzir para 25 mg/L, visando evitar possíveis escapes. A redução de canamicina para 25 mg/L, após a formação de gemas resistentes, foi fundamental para possibilitar a regeneração de brotos e enraizamento das plantas.

No trabalho descrito por Sun et al. (2006) a concentração de canamicina foi reduzida de 100 mg/L para 50 mg/L no estágio de enraizamento dos brotos e, no trabalho descrito por Qiu et al. (2007), a concentração de canamicina foi reduzida para 30 mg/L, para seleção e enraizamento de brotos.

## *7.2 Transformação genética de explantes cotiledonares*

### *7.2.1 Regeneração de explantes cotiledonares transformados e obtenção de plantas transgênicas*

Um total de 1242 explantes foram submetidos a transformação via *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105, contendo o vetor pC2300ATPase. Explantes cocultivados produziram gemas resistentes à canamicina (Figura 10 A e B), que foram repicadas, até a diferenciação dos tecidos, com o aparecimento de brotos após 6 a 8 semanas de cultivo (Figura 10 C, D, E e F), apresentando resultado similar ao reportado por Qiu et al. (2007). Os brotos alongaram e enraizaram, e as plantas geradas foram aclimatadas (Figura 11 A e B). As plantas aclimatadas apresentaram fenótipo normal, floresceram e produziram frutos com sementes viáveis (Figura 11 C e D).



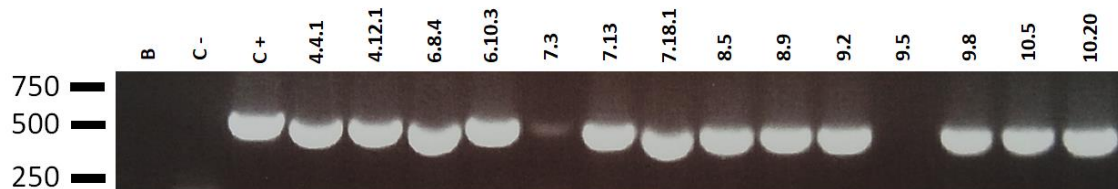
**Figura 10:** Regeneração de gemas e brotos resistentes à canamicina cocultivados com *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 que contém o vetor pC2300ATPase. (A, B) Gemas emergentes após cocultura, resistentes à canamicina; (C, D e E) Início da diferenciação de folhas; (F) Broto emergente em meio de indução com canamicina, 7 semanas após a cocultura.



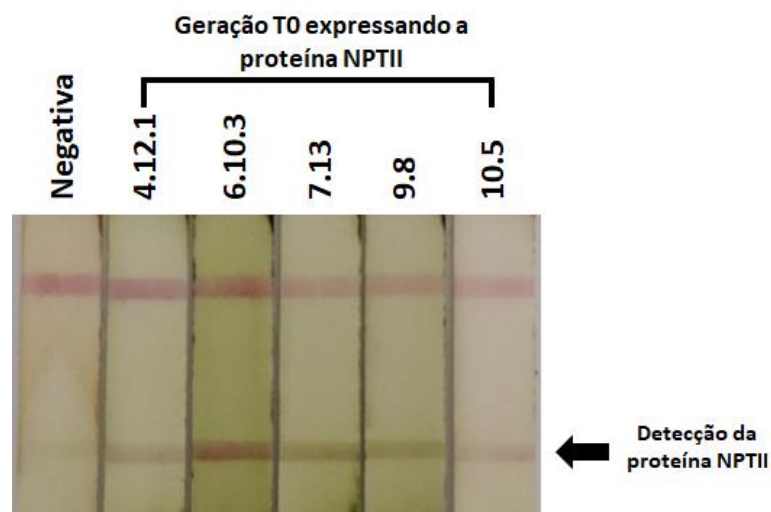
**Figura 11:** Plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), provenientes de explantes cotiledonares transformados com o vetor pC2300ATPase, acimatadas em casa de vegetação. (A e B) Plantas acimatadas, mantidas em casa de vegetação para produção de frutos; (C e D) Plantas transformadas florescendo e produzindo frutos.

Ao todo foram acimatadas 31 plantas, sendo que dessas, 30 foram positivas para a presença do transgene. As plantas acimatadas foram provenientes de brotos emergidos de 14 explantes diferentes, transformados com o vetor pC2300ATPase. Das 14 linhagens foram obtidas 13 linhagens transgênicas, confirmadas por PCR, pela detecção da presença

do fragmento de 576 pb correspondente à região do gene de *v-ATPase* (Figura 12). A expressão da proteína NPTII foi detectada pelo imunoenensaio de fluxo lateral realizado com algumas das linhagens transgênicas obtidas (Figura 13).



**Figura 12:** Análise de PCR de 14 plantas aclimatadas, provenientes de brotos emergidos de diferentes explantes transformados com o vetor pC2300ATPase, para amplificação da sequência de 576 pb do gene *v-ATPase*. O controle positivo (C+) corresponde a reação de PCR feita com o vetor pC2300ATPase, o controle negativo (C-) feito com uma planta não transformada e o branco (B) representa a reação de PCR sem DNA.



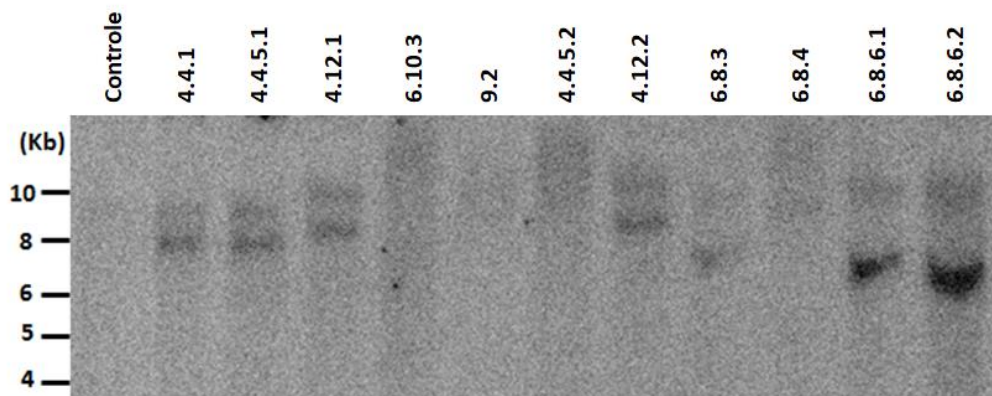
**Figura 13:** Análise de Imunoensaio de fluxo lateral e detecção da proteína NPTII em cinco linhagens transgênicas de tomate. Banda superior representa controle positivo interno e a banda inferior a presença da NPTII (seta).

No trabalho de Sun et al. (2006), foi relatada a possibilidade de brotos enraizados originados do mesmo calo serem provenientes de eventos distintos de transformação genética. Através da análise de *Southern blot*, eles observaram que de doze plantas analisadas, selecionadas aleatoriamente de cinco calos diferentes, oito plantas foram



provenientes de eventos de transformação distintos, aumentando assim a eficiência percentual de transformação considerada.

Considerando essa hipótese, inicialmente foram aclimatadas plantas provenientes do mesmo calo. A análise de *Southern blot* foi realizada com onze plantas transgênicas aclimatadas, provenientes de cinco calos distintos, e uma planta controle. A inserção do transgene de *v-ATPase* no genoma de algumas plantas positivas foi confirmada (Figura 14). No *Southern blot*, foram observadas algumas plantas, com os mesmos padrões de inserção, como visualizado entre as plantas 4.4.1 e 4.4.5.1, e entre as plantas 6.8.6.1 e 6.8.6.2. Em tese, isso pode indicar que as plantas provenientes do mesmo calo também podem ser resultantes do mesmo evento de transformação; porém para confirmar seria necessário realizar outras análises, com diferentes enzimas de restrição ou com a utilização de outra sonda.



**Figura 14:** Análise de *Southern blot* de DNA genômico de 11 plantas transgênicas de *Solanum lycopersicum* regeneradas a partir de 5 calos independentes, e uma planta de tomate não transgênica.

Com o enraizamento de novas plantas, passou-se a aclimatar apenas as plantas provenientes de calos independentes, garantindo que fossem eventos diferentes de transformação genética.

### 7.2.2 Análise das progênies

As progênies (Geração T<sub>1</sub>) de 8 plantas transgênicas (Geração T<sub>0</sub>) foram analisadas por PCR, para a detecção do gene de *v-ATPase*. E a análise dessas progênies pelo teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson demonstrou que o transgene segregou em proporção mendeliana 3:1 e 15:1 (Tabela 1).

**Tabela 1:** Análise de segregação da geração T<sub>1</sub> de 8 plantas transgênicas de tomateiro transformadas com o vetor pC2300ATPase.

Geração T <sub>0</sub>	Geração T <sub>1</sub> <sup>(a)</sup>		Segregação <sup>(b)</sup>	$\chi^2$ <sup>(c)</sup>	P <sup>(d)</sup>
	Positivas	Negativas			
4.4.1	15	5	3:1	0,0000	1,0000
4.4.5.1	16	4	3:1	0,4667	0,6056
4.4.5.2	11	4	3:1	0,0667	0,8815
4.12.1	15	4	3:1	0,3333	0,6911
4.12.2	13	7	3:1	1,0666	0,3017
6.8.4	16	4	3:1	0,4667	0,6056
6.8.6.2	11	6	3:1	0,7647	0,3270
6.10.3	8	1	15:1	0,1111	0,5469

(a) Dados baseados em análise de PCR para detecção do gene de *v-ATPase*.

(b) Foram testados os padrões de segregação 3:1 e 15:1, sendo considerado a proporção mais provável e com menor valor de qui-quadrado.

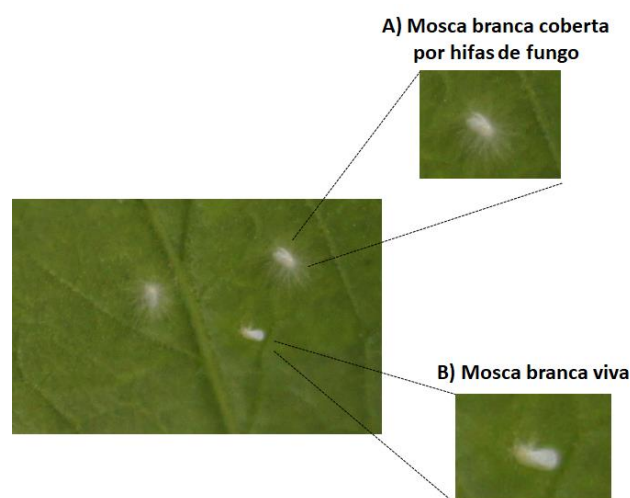
(c) A correção de Yates foi utilizada quando uma das frequências era menor que 5, ou quando o valor total de plantas avaliadas era menor que 20.

(d) Probabilidade que os valores observados reflitam a segregação esperada de 3:1 ou 15:1.

$\alpha = 0,05$

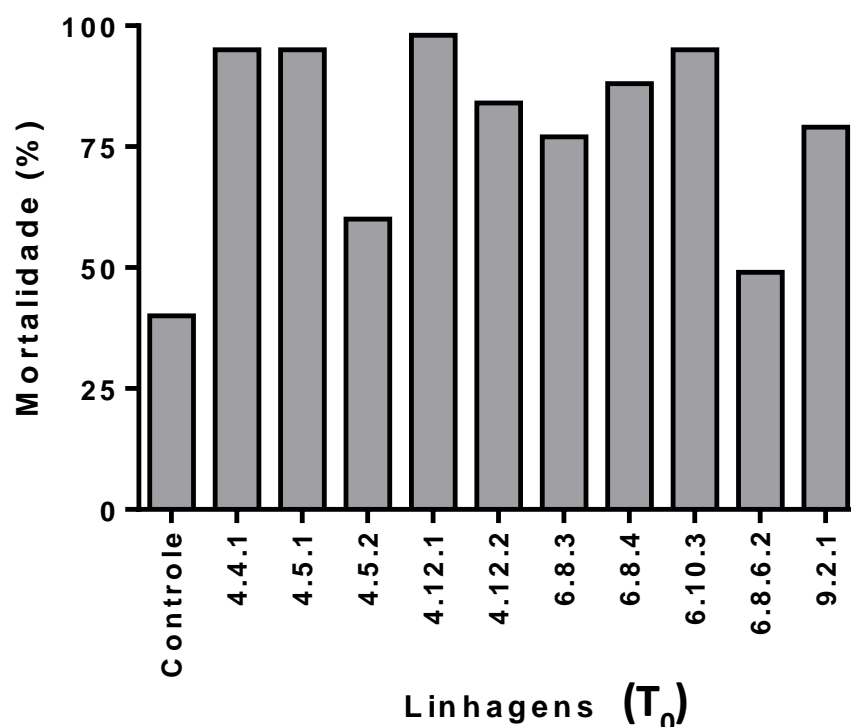
### 7.2.3 Bioensaio com folhas das plantas transgênicas obtidas

Nos três primeiros dias do bioensaio realizado com folhas de tomateiros transgênicos (T<sub>0</sub>), não foram visualizadas mortalidade elevada de moscas brancas, porém no quarto dia foi visualizado o crescimento de micélio de fungos em volta das moscas, indicando que possivelmente as moscas já estavam mortas e permaneceram nas folhas, não tendo sido contabilizadas (Figura 15).



**Figura 15:** Avaliação de bioensaio com folhas de plantas transgênicas, após 4 dias da liberação das moscas brancas: (A) Mosca branca coberta por hifas de fungos; e (B) Mosca branca viva.

No quinto dia de interação com algumas linhagens, o sistema foi aberto, permitindo a contabilização total de moscas vivas e mortas. Foi visualizado uma mortalidade elevada para a maioria dos tratamentos com folhas de plantas transgênicas, após cinco dias de interação. De dez tratamentos avaliados, oito apresentaram uma mortalidade de moscas brancas superior a 75%, e 4 dessas apresentaram mortalidade acima de 90 %, com alguns aproximando a 100% de mortalidade (Figura 16).



**Figura 16:** Percentual de mortalidade de moscas brancas analisadas no quinto dia do bioensaio com folhas de plantas transgênicas (T<sub>0</sub>), e uma planta controle negativo.

O resultado desse ensaio preliminar aponta uma estratégia viável de obtenção de plantas de tomateiro transgênicas resistentes à mosca branca devido a potencial expressão de siRNAs, para silenciamento do gene da v-ATPase de *B.tabaci*, sendo necessário a realização de outros bioensaios com as progênes transgênicas das linhagens obtidas.

Em outros trabalhos, também foram verificadas altas taxas de mortalidade de moscas brancas em apenas alguns dias de interação com plantas transgênicas expressando siRNAs, para silenciamento do gene da v-ATPase de *B.tabaci* (THAKUR et al., 2014; IBRAHIM et al., 2015). No trabalho desenvolvido por Thakur et al. (2014) foram feitos ensaios com discos foliares e bioensaios *in vivo* com plantas transgênicas de tabaco. Nesse

trabalho, o autor observou uma mortalidade de moscas brancas de até 83%, no sexto dia de ensaio com discos foliares, e uma redução significativa na população de moscas brancas em bioensaios realizados com plantas transgênicas, restando apenas 10 a 15% da população inicial, enquanto nas plantas controle foi verificado um aumento na população. No trabalho de Ibrahim et al. (2015), foi observado um aumento na mortalidade de insetos, com uma redução de 75% da população de moscas brancas, quando comparado com o controle ( $p < 0,05$ ), após três dias de alimentação em plantas transgênicas de alface, sendo verificada também alterações significativas no ciclo de desenvolvimento de insetos que se alimentaram de plantas transgênicas ( $p < 0,05$ ).

### 7.3 Agroinfiltração

#### 7.3.1 Germinação e seleção de plântulas transformadas

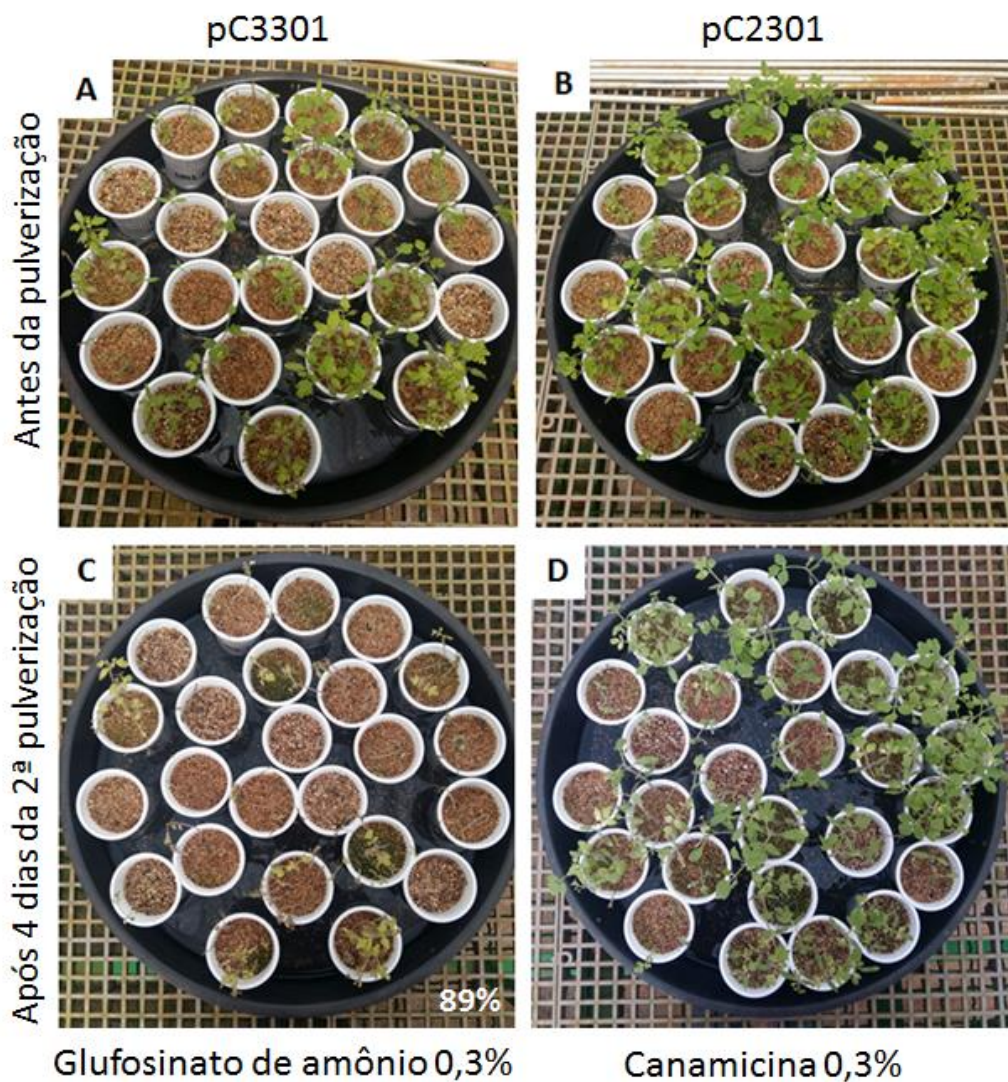
Sementes de frutos agroinfiltrados foram analisadas quanto ao percentual de germinação, tendo variado de 7% a 96%, nos diferentes tratamentos realizados, e uma média total de 41,5% de germinação, conforme demonstrado na Tabela 2. O percentual médio de germinação foi baixo devido à contaminação de fungo nas sementes.

**Tabela 2:** Percentual de germinação de sementes provenientes de frutos agroinfiltrados.

Tratamento	Vetor	Estágio do fruto	% de germinação	% média de germinação
1	pC3301	1	47%	36%
2	pC3301	2	7%	
3	pC3301	3	36%	
4	pC3301	4	42%	
5	pC3301	5	48%	
6	pC2301	1	15%	42%
7	pC2301	2	34%	
8	pC2301	3	48%	
9	pC2301	4	53%	
10	pC2301	5	60%	
11	Controle	1	51%	59%
12	Controle	2	96%	
13	Controle	3	52%	
14	Controle	4	25%	
15	Controle	5	70%	
16	Controle não agroinfiltrado	4	32%	32%

Após aplicação de glufosinato de amônio em plântulas, provenientes de frutos agroinfiltrados com o vetor pC3301, que contém o gene de seleção *bar*, foi visualizado uma seleção prévia de plantas resistentes ao herbicida. Foi avaliada a mortalidade de 89% das plantas e a diferença foi visível 4 dias após a segunda aplicação (Figura 17).

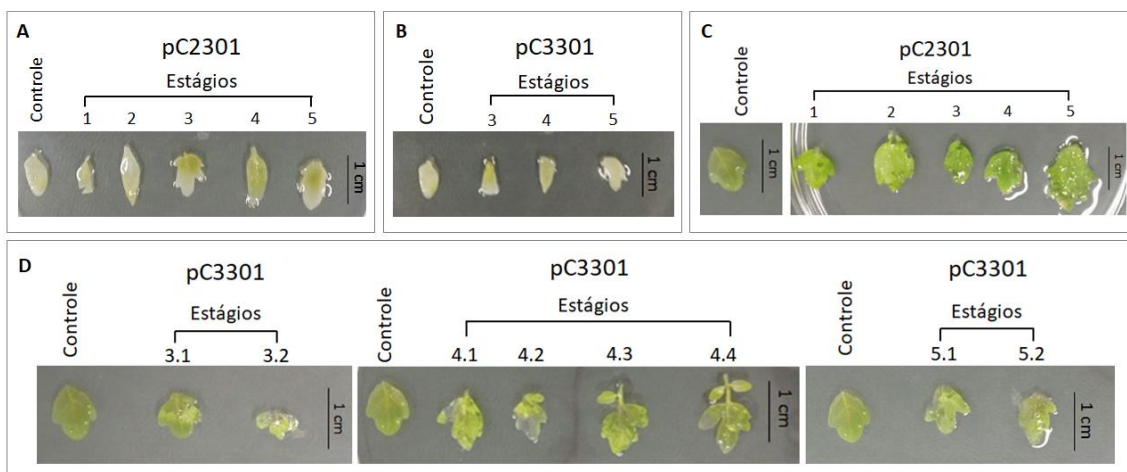
Em plântulas provenientes de frutos transformados com o vetor pC2301, que contém o gene de seleção *npt II*, não foram visualizadas diferenças relevantes após a aplicação de canamicina (Figura 17), sendo necessário realizar outras aplicações de canamicina para seleção de plântulas resistentes.



**Figura 17:** Plântulas provenientes de sementes de frutos agroinfiltrados. (A) Plântulas de sementes agroinfiltradas com o vetor pC3301 antes da aplicação do glufosinato de amônio, (C) e após 4 dias da aplicação de glufosinato de amônio; (B) Plântulas de sementes agroinfiltradas com o vetor pC2301 antes da aplicação de canamicina, (D) e após 4 dias da aplicação de canamicina.

### 7.3.2 Ensaio histoquímico para detecção do gene *gus*

A expressão do gene *gus* não foi detectada nos testes histoquímicos realizados com amostras foliares de plântulas, provenientes das sementes de frutos agroinfiltrados, colhidas antes da pulverização para seleção. Da mesma forma, não foi detectado a expressão do *gus* em amostras foliares extraídas de plantas sobreviventes após a seleção (Figura 18).



**Figura 18:** Teste histoquímico do *gus* de folhas de plântulas provenientes das sementes de frutos agroinfiltrados. (A) Folhas extraídas de plântulas de sementes agroinfiltradas com o vetor pC2301, antes da aplicação de canamicina, (C) e após 4 dias da aplicação de canamicina; (B) Folhas de plântulas de sementes agroinfiltradas com o vetor pC3301, antes da aplicação de glufosinato de amônio, (D) e após 4 dias da aplicação de glufosinato de amônio.

### 7.3.3 Transformação genética por agroinfiltração

Não foram obtidas plantas transgênicas através da agroinfiltração de frutos com o vetor pC3301. Das plantas provenientes de sementes transformadas com o gene pC2301, não foram identificadas plantas transgênicas pelas análises realizadas, sendo necessárias mais análises para detecção.

No trabalho desenvolvido por Grover et al. (2015) foi relatado a obtenção de 39 plantas transgênicas, confirmadas por PCR em tempo real, da avaliação de 80 plantas obtidas de sementes de frutos agroinfiltrados da variedade Pusa Ruby.

Porém, considerando os resultados obtidos neste trabalho, até o momento, não foi possível comprovar a viabilidade da transformação genética por agroinfiltração de frutos da variedade Pepe.

## 8. CONCLUSÕES

O mecanismo de RNA de interferência (RNAi) foi utilizado como uma estratégia para produção de plantas de tomateiro resistentes à mosca branca, pelo silenciamento do gene da v-ATPase devido à presença potencial de siRNAs. O método de transformação de explantes cotiledonares da variedade Micro-Tom via *Agrobacterium tumefaciens* se mostrou viável, e treze linhagens transgênicas foram obtidas, possuindo uma ou duas cópias do transgene de v-ATPase de mosca branca. O bioensaio preliminar realizado com folhas de plantas transgênicas mostrou que a mortalidade de moscas brancas pode chegar próximo a 100% em cinco dias de interação, apontando ser uma estratégia viável para obtenção de plantas de tomateiro resistentes, sendo necessário a realização de outros bioensaios com as progênes transgênicas.

## 9. PERSPECTIVAS

A mosca branca é um problema crescente na agricultura, afetando várias culturas. O uso de plantas resistentes é fundamental para controle e redução de danos causados pela praga. Para validar a estratégia do uso de RNAi na obtenção de tomateiros resistentes transformados geneticamente para expressar siRNAs de v-ATPase, será necessário a realização de bioensaios com as progênes das plantas transgênicas obtidas. Também devem ser realizados ensaios de *Northern blot* com as plantas transgênicas, visando à detecção de moléculas de siRNAs específicos da sequência da v-ATPase, para a confirmação do efetivo mecanismo baseado em RNAi. Outras avaliações interessantes seriam a validação da tecnologia em campo, a avaliação de efeitos em organismos não alvo (efeito *off-target*), e análise do impacto do uso de plantas transgênicas na transmissão de viroses.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHARBAOUI, Z.; GREER, A.F.; TABAEIZADEH, Z. Transformation of the wild tomato *Lycopersicon chilense* Dun. by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v. 15, n. 1, p. 102–105, 1995.
- AGRIANUAL 2013. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Agro informativos, 2013. p. 546.
- ALVARENGA, M.A.R.; TEIXEIRA, A.S.; CHALFUN, N.N.J. **Produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia**. Lavras: UFLA, 2004. 400p.
- ANGAJI, S.A.; HEDAYATI, S.; HOSEIN POOR, R.; SAMAD POOR, S.; SHIRAVI, S.; MADANI, S. Application of RNA interference in plants. **Plant Omics**, v. 3, n. 3, p.77-84, 2010.
- ARAGÃO, F.J.L.; IBRAHIM, A.B.; TINOCO, M. L. P. RNA interferente. In: BORÉM, A.; FRITSCH NETO, R. **Ômicas 360º: aplicações e estratégias para o melhoramento de plantas**. Viçosa: Suprema, 2013. p. 69-94.
- ATSUSHI, V. Mosca branca: histórico dos surtos e medidas de controle como praga e vetora de vírus. **O Agrônomo**, Campinas, v.53, n.1, p. 22-25, 2001.
- BAUM, J.A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G.R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T.; ROBERTS, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1322–1326, 2007.
- BELLOWS JUNIOR, T.S.; PERRING, T.M.; GILL, R.J.; HEADRICK, D.H. Description of a Species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, n. 2, p. 195-206, 1994.
- BEYENBACH, K.W.; WIECZOREK, H. The V-type H<sup>+</sup> ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 577–589, 2006.
- BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; VIERA, J.V.; CARVALHO, R.C.P. Melhoramento para resistência a doenças virais. In: BORÉM, A.; FRITSCH-NETO, R. **Melhoramento de Plantas para Condições de Estresses Bióticos**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2012. p. 89-119.
- BONDAR, G. **Aleyrodídeos do Brasil: 2. contribuição**. Bahia: Secretaria da Agricultura, 1928. p. 27-34 (Boletim do Laboratório de Pathologia Vegetal, 5).
- BONFIM, K.; FARIA, J.C.; NOGUEIRA, E.O.P.L.; MENDES, E.A.; ARAGÃO, F.J.L. RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 6, p. 717–726, 2007.



LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium* spp. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-Cenargen, 1998. p. 63-65.

BROWN, J.; BIRD, J. Whitefly – Transmitted Geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. **Plant Disease**, v.76, n.3, p. 220-225, 1992.

BROWN, J. Evaluación crítica sobre los biotipos de mosca blanca en América, de 1989 a 1992. In: HILJE, L.; ARBOLETA, O. **Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe**. Turrialba, Costa Rica: CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza), 1993. p. 1-9.

BROWN, J.K.; FROHLICH, D.R.; ROSELL, R.C. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex?. **Annual Review Entomology**, v. 40, p. 511-534, 1995a.

BROWN, J.K.; BIRD, J.; BANKS, G.; SOSA, M.; KIESLER, K.; CABRERA, I.; FORNARIS, G. First report of an epidemic in tomato caused by two whitefly-transmitted geminiviruses in Puerto Rico. **Plant Disease**, v. 79, n. 12, p. 1250, 1995b.

BYRNE, D.N.; BELLOWS JUNIOR, T.S. Whitefly Biology. **Annual Review of Entomology**, v. 36, p. 431-457, 1991.

CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 1515-1539, 2002.

CARVALHO, R.C.P.; TOBAR, L.L.M.; DIANESE, E.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S. Melhoramento genético do tomateiro para resistência a doenças de etiologia viral: Avanços e perspectivas. **Revisão Anual de Patologia de plantas**, v. 22, p.280-361, 2014.

CHILTON, M.D.; CURRIER, T.C.; FARRAND, S.K.; BENDICH, A.J.; GORDON, M.P.; NESTER, E.W. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, n. 9, p. 3672–3676, 1974.

CHYI, Y.S.; PHILLIPS, G.C. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lycopersicon* based on conditions favorable for regeneration. **Plant Cell Reports**, v. 6, n. 2, p. 105–108, 1987.

COSTA, A.S.; COSTA, C.L.; SAUER, H.F.G. Surto de mosca-branca em culturas do Paraná e São Paulo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.2, n.1, p.20-30, 1973.

COSTA, A.S. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat of widespread virus infection of legume crops in Brazil. In: BIRD, J.; MARAMOROSCH, K. **Tropical Diseases of Legumes**. New York: Academic Press, 1975. p. 27- 49.

COSTA, M.G.C.; NOGUEIRA, F.T.S.; FIGEIRA, M.L.; OTONI, W.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; CECON, P.R. Influence of the antibiotic Timentin on

plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 3, p. 327–332, 2000.

DAVIS, M.E.; LINEBERGER, R.D.; MILLER, A.R. Effects of tomato cultivar, leaf age, and bacterial strain on transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 24, n. 2, p. 115-121, 1991a.

DAVIS, M.E.; MILLER, A.R.; LINEBERGER, R.D. Temporal competence for transformation of *Lycopersicon esculentum* (L. Mill.) cotyledons by *Agrobacterium tumefaciens*: relation to wound-healing and soluble plant factors. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, n. 3, p. 359-364, 1991b.

DE BARRO, P.J.; LIU, S.S.; BOYKIN, L.M.; DINSDALE, A.B. *Bemisia tabaci*: A statement of species status. **Annual Review of Entomology**, v.56, p. 1–19, 2011.

DELANNAY, X.; LAVALLE, B.J.; PROKSCH, R.K.; FUCHS, R.L.; SIMS, S.R.; GREENPLATE, J.T.; MARRONE, P.G.; DODSON, R.B.; AUGUSTINE, J.J.; LAYTON, J.G.; FISCHHOFF, D.A. Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* insect control protein. **Nature Biotechnology**, v. 7, p. 1265–1269, 1989.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1987.

DUTT, U. Mealy bug infestation in Punjab: Bt. Cotton Falls Flat. **Environment News Service**, 2007. Disponível em: <https://www.countercurrents.org/dutt210807.htm>. Acessado em: 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO, 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data> [Online]. Acessado em: 2018.

FERNANDES, F.R.; DE ALBUQUERQUE, L.C.; DE BRITTO GIORDANO, L.; BOITEUX, L.S.; DE ÁVILA, A.C.; INOUE-NAGATA, A.K. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite *Begomovirus* species associated to tomatoes. **Virus Genes**, v. 36, n. 1, p. 251–258, 2008.

FERREIRA, T.L.; AVIDOS, M.F.D. Mosca-branca, presença indesejável no Brasil. **Biociência – Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 4, p. 22-26, 1998.

FILLATTI, J.J.; KISER, J.; ROSE, R.; COMAI, L. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. **Nature Biotechnology**, v. 5, p. 726–730, 1987.

FINBOW, M.E.; HARRISON, M.A. The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. **Biochemical Journal**, v. 324, p. 697 – 712, 1997.

FISCHHOFF, D.A.; BOWDISH, K.S.; PERLAK, F.J.; MARRONE, P.G.; MCCORMICK, S.M.; NIEDERMAYER, J.G.; DEAN, D.A.; KUSANO-KRETZMER, K.; MAYER, E.J.; ROCHESTER, D.E; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Nature Biotechnology**, v. 5, p. 807–813, 1987.

FRARY, A. **The use of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in the map-based cloning of tomato genes and an analysis of factor affecting transformation efficiency.** Ithaca, NY: Cornell University, 1995. 165 p. Tese de Pós doutorado.

FRARY, A.; EARLE, E.D. An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. **Plant Cell Reports**, v. 16, n. 3-4, p. 235-240, 1996.

GARBUTT, J.S. **RNA interference in insects: persistence and uptake of double-stranded RNA and activation of RNAi genes.** Reino Unido: University of Bath, 2011. 188p. Tese de Doutorado.

GATEHOUSE, A.M.; POWELL, K.S.; PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M.; GATEHOUSE, J.A. Insecticidal properties of plant lectins: Their potential in plant protection. In: PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S. **Lectins: Biomedical perspectives.** London: Taylorand Francis, 1995. p. 35 – 58.

GIORDANO, L.B.; FONSECA, M.E.N.; SILVA, J.B.C.; INOUE-NAGATA, A.; BOITEUX, L. Efeito da infecção precoce por *Begomovirus* com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 815–818, 2005.

GROVER, A.; SINGH, S.; PANDEY, P.; YADAV, P.V.; GUPTA, S.M.; YADAV, A.; JADON, A.; BHATT, H.; PRAKASH, O.; BHATT, B.B.; NASIM, M. Efficient tissue culture independent *Agrobacterium* mediated genetic transformation protocols for *Solanum lycopersicum*. **Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology**, v. 16, p. 20 - 28, 2015.

HAJI, F. N. P.; DE ALENCAR, J. A.; LIMA, M. F. **Mosca branca: danos, importância econômica e medidas de controle.** Petrolina: Embrapa-CPATSA, 1996a. 9 p. (Embrapa-CPATSA. Documentos, 83).

HAJI, F.N.P.; LIMA, M.F.; TAVARES, S.C.C.; DE ALENCAR, J.A.; PREZOTTI, L. **Recomendações fitossanitárias para a cultura do tomate industrial nos perímetros irrigados do Submédio São Francisco – ano agrícola 1996.** Petrolina: Embrapa - CPATSA, 1996b. 8 p. (Embrapa -CPATSA. Comunicado Técnico, 65).

HAJI, F.N.P.; DE ALENCAR, J.A.; LIMA, M.F.; MATTOS, M.A. DE A.; HONDA, O.T.; HAJI, A.T. **Avaliação de produtos para o controle da mosca-branca (*Bemisia spp.*) na cultura do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.).** Petrolina: Embrapa - CPATSA, 1997. 6 p. (Embrapa -CPATSA. Pesquisa em Andamento, 84)

HAJI, F.N.P.; MATTOS, M.A. DE A.; DE ALENCAR, J. A.; MOREIRA, A.N. **Aspectos biológicos, danos e estratégias de controle da mosca branca.** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000. 38 p. (Embrapa Semi- Árido. Circular Técnica, 55)

HAJI, F.N.P.; FERREIRA, R.C.F.; MOREIRA, A.N. Descrição morfológica, aspectos biológicos, danos e importância econômica. In: HAJI, F.N.P.; BLEICHER, E. **Avanços**

**no manejo da mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae).** Petrolina: Embrapa SEMI- ÁRIDO, 2004. p. 21-30.

HAJI, F.N.P.; MATTOS, M.A. DE A.; DE ALENCAR, J.A.; BARBOSA, F.R.; PARANHOS, B.J. **Manejo da mosca branca na cultura do tomate.** Petrolina: Embrapa SEMI- ÁRIDO, 2005. 14 p. (Embrapa SEMI- ÁRIDO. Circular Técnica, 81)

HAMZA, S.; CHUPEAU, Y. Re-evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Journal of Experimental Botany**, v. 44, n. 2, p.1837–1845, 1993.

HILJE, L. Aspectos bioecológicos de *Bemisia tabaci* en Mesoamerica. Bioecological aspects of *Bemisia tabaci* in Mesoamerica. **Manejo Integrado de Pragas**, n. 35, p. 46-54, 1995.

HILJE, L. Un enfoque preventivo para el manejo sostenible del complejo mosca blanca-*geminivirus* en tomate. In: **VIII Encontro Latino-Americano e do Caribe sobre Moscas Brancas e Geminivirus**. Recife: Anais Recife: IPA, 1999. p. 27-44.

HU, W.; PHILLIPS, G.C. A combination of overgrowth-control and antibiotics improves *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation efficiency for cultivated tomato (*L. esculentum*). **In Vitro Cellular & Biology – Plant**, v. 37, n. 1, p. 12–18, 2001.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ - IAPAR. Programa feijão. In: **Relatório técnico anual 1982**. Londrina, PR: IAPAR, 1984. p. 119-157.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2017. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>[Online]. Acessado em: 2018.

IBRAHIM, A.B. **Resistência a mosca branca (*Bemisia tabaci*) em plantas transgênicas expressando siRNA do gene de uma *v-ATPase*.** Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2015. 99 ou 191p. Tese de Doutorado.

JINEK, M.; DOUDNA, J.A. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. **Nature**, v. 457, n.7228, p. 405-412, 2009.

JONES, D.R. Plant viruses transmitted by whiteflies. **European Journal of Plant Pathology**, v.109, n. 3, p. 195–219, 2003.

KABIR, M.H.; QADIR, S.A.; HASSAN, S.H.A.; AHN, J.; WANG, M-H. RNAi: An emerging field of molecular research. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 25, p. 4784-4788, 2008.

LI, S.J.; XUE, X.; AHMED, M.Z.; REN, S.X.; DU, Y.Z.; WU, J.H.; CUTHBERTSON, A.G.S.; QIU, B.L. Host plants and natural enemies of *Bemisia tabaci* (Hemiptera:Aleyrodidae) in China. **Insect Science**, v.18, n.1, p. 101–120, 2011.

LING, H.-Q.; KRISELEIT, D.; GANAL, M. Effect of ticarcillin potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium* mediated transformation of

tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Plant Cell Reports**, v. 17, n. 11, p. 843–847, 1998.

LOURO, D. A emergência de vírus transmitidos por moscas brancas, uma ameaça para a horticultura. In: **Actas do 4º Congresso da Sociedade Portuguesa de Fitopatologia**. Faro: Portugal, 2004. p. 4-6.

LOURENÇÃO, A.L.; NAGAI, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no estado de São Paulo. **Bragantia**, v.53, n.1, p. 53–59, 1994.

MAO, Y.B.; CAI, W.J.; WANG, J.W.; HONG, G.J.; TAO, X.Y.; WANG, L.J.; HUANG, Y.P.; CHEN, X.Y. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature Biotechnology**, v. 25. p.1307–1313, 2007.

MCCORMICK, S.; NIEDERMEYER, J.; FRY, J.; BARNASON, A.; HORSCH, R.; FRALEY, R. Leaf disc transformation of cultivated tomato *L. esculentum* using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v. 5, n. 2, p. 81–84, 1986.

MELO, P.C.T. **Mosca branca ameaça produção de hortaliças**. Campinas: Asgrow do Brasil Sementes, 1992. 2p. (Informe Técnico).

MENEZES JUNIOR, A.O.; SUGAWARA, L.M.; PEREIRA, R.A.S.; GALLEGOS, D. M.N. Parasitismo da mosca branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Homoptera: *Aleyrodidae*) em diferentes plantas hospedeiras, na região de Londrina - PR. In: **5º SICONBIOL - Simpósio de Controle Biológico**. Foz do Iguaçu: Anais do 5º SICONBIOL, 1996. p. 34-34.

MIZUNO, A.C.R.; VILAS BÔAS, G.L. **Biologia da mosca-branca (*Bemisia argentifolii*) em tomate e repolho**. Brasília: Embrapa -CNPB, 1997. 5 p. (Embrapa - CNPB. Pesquisa em Andamento da Embrapa Hortaliças).

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES MCTIC/ PARECER TÉCNICO N° 5162-2016. Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/documents/566529/2076057/Parecer+T%C3%A9cnico+n%C2%BA%205162-2016/b72051e6-edc7-4dee-a59b-2995d6fcc532?version=1.1>. Acessado em: 2018.

MOREIRA, A.N.; HAJI, F.N.P.; SANTOS, A. P. dos; HAJI, A. T.; BARBOSA, F.R.; ALENCAR, J.A. de. Aspectos biológicos de *Bemisia argentifolii* em tomateiro no Submédio do Vale do São Francisco. In: **VIII Encontro Latino-Americano e do Caribe sobre Moscas Brancas e Geminivírus**. Recife: Anais e mini-resumos. Recife: IPA, 1999. 75p.

MOUND, L.A.; HALSEY, S.H. **Whitefly of the world: a systematic catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with host plant and natural enemy data**. London: British Museum (Natural History) and Wiley, 1978. 340p.

MURASNIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 4, p. 473–497, 1962.

- NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVÉ, E.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, n. 15, p. 219-248, 2011.
- NELSON, N.; HARVEY, W.R. Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 361–385, 1999.
- NELSON, N.; PERZOV, N.; COHEN, A.; HAGAI, K.; PADLER, V. e NELSON, H. The cellular biology of proton-motive force generation by v-ATPases. **The Journal of Experimental Biology**, v. 203, p. 89-95, 2000.
- OLIVEIRA, M.R.V; HENNEBERRY, T.J.; ANDERSON, P. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. **Crop Protection**, v.20, n.9, p. 709–723, 2001.
- PARK, S.H.; MORRIS, J.L.; PARK, J.E.; HIRSCHI, K.D.; SMITH, R.H. Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, n. 10, p. 1253–1257, 2003.
- PATIL, R.S. **Genetic manipulation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) for crop improvement**. Nottingham: University of Nottingham, 1994. 253 p. Tese de Pós Doutorado.
- PERRING, T.M. The *Bemisia tabaci* species complex. **Crop Protection**, v.20, n.9, p. 725-737, 2001.
- QIU, D.; DIRETTO, G.; TAVARZA, R.; GIULIANO, G. Improved protocol for *Agrobacterium* mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene *CsZCD*. **Scientia Horticulturae**, v.112, n.2, p. 172–175, 2007.
- QUIRINO, T.R. Agricultura e meio ambiente: tendência. In: SILVEIRA, M. A.; VILELA, S. L. O. **Globalização e sustentabilidade da agricultura**. Jaguariúna, SP: Embrapa - CNPMA, Documento, 15, 1998. p. 109-138
- RAJ, S.K.; SINGH, R.; PANDEY, S.K.; SINGH, B.P. *Agrobacterium*-mediated tomato transformation and regeneration of transgenic lines expressing *Tomato leaf curl virus* coat protein gene for resistance against TLCV infection. **Current Science**, v. 88, n. 10, p. 1674–1679, 2005.
- SALAS, J.; MENDOZA, O. Biology of the sweetpotato whitefly (Homoptera: *Aleyrodidae*) on tomato. **The Florida Entomologist**, v. 78, n.1, p. 154-160, 1995.
- SALGUERO, V. Perspectivas para el manejo del complejo mosca blanca - virosis. In: HILJE, L.; ARBOLEDA, O. **Las moscas blancas (Homoptera: *Aleyrodidae*) en America Central y Caribe**. Turrialba: CATIE, 1993. p.20-26. (CATIE. Informe Técnico, 205).
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning, A Laboratory Manual**. New York: 4th Edition, Edited Cold Spring Harbor Protocols, v. 1, 2 e 3, 2001.

SEAL, S.E.; VANDENBOSCH, F.; JEGER, M.J. Factors influencing *Begomovirus* evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, p. 23–46, 2006.

STEVENS, T.H.; FORGAC, M. Structure, function and regulation of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 13, p. 779-808, 1997.

SUN, H.J; UCHII, S.; WATANABE, S.; EZURA, H. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. **Plant Cell Physiology**, v. 47, n. 3, p. 426–431, 2006.

TABAEIZADEH, Z.; AGHARBAOUI, Z.; HARRAK, H.; POYSA, V. Transgenic tomato plants expressing a *Lycopersicon chilense* chitinase gene demonstrate improved resistance to *Verticillium dahliae* race 2. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 2, p. 197–202, 1999.

THAKUR, N.; UPADHYAY, S.K.; VERMA, P.C.; CHANDRASHEKAR, K.; TULI, R.; SINGH, P.K. Enhanced whitefly resistance in transgenic tobacco plants expressing double stranded RNA of *v-ATPase* A gene. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 9 p., 2014.

TINOCO, M.L.P.; DIAS, B.B.A.; DALL'ASTTA, R.C.; PAMPHILE, J.A.; ARAGÃO, F.J.L. In vivo trans-specific gene silencing in fungal cells by in planta expression of a double-stranded RNA. **BMC Biology**, v. 8, n. 27, p. 27. 2010.

UPADHYAY, S.K.; CHANDRASHEKAR, K.; THAKUR, N.; VERMA, P.C.; BORGIO, J.F.; SINGH, P.K.; TULI, R. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. **Journal of Biosciences**, v. 36, n. 1, p. 153–161, 2011.

UPADHYAY, S.K.; DIXIT, S.; SHARMA, S.; SINGH, H.; KUMAR, J.; VERMA, P.C.; CHANDRASHEKAR, K. SiRNA machinery in whitefly (*Bemisia tabaci*). **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; ROUGE, P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575–692, 1998.

VAN ROEKEL, J.S.; DAMM, B.; MELCHERS, L.S.; HOEKEMA, A. Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Cell Reports**, v. 12, n. 11, p. 644–647, 1993.

VIDYA, C.S.S.; MANOHARAN, M.; KUMAR, C.T.R.; SAVITHRI, H.S.; SITA, G.L. Agrobacterium-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* var. Pusa Ruby) with coat-protein gene of *Physalis mottle tymovirus*. **Journal of Plant Physiology**, v. 156, n. 1, p. 106–110, 2000.

VILLAS BÔAS, G. L. **Caracterização molecular da mosca-branca *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring, 1994 (Homoptera: Aleyrodidae) e determinação do potencial biótico às plantas hospedeiras: abobrinha (*Cucurbita pepo*); feijão**

**(*Phaseolus vulgaris*); mandioca (*Manihot esculenta*); milho (*Zea mays*); poinsetia (*Euphorbia pulcherrima*); repolho (*Brassica oleracea*) e tomate (*Lycopersicon esculentum*).** São Carlos, SP: Universidade Federal de São Carlos, 2000. 170 p. Tese de Doutorado.

VIRLA, E.G.; CASUSO, M.; FRIAS, E.A. A preliminary study on the effects of a transgenic corn event on the non-target pest *Dalbulus Maiid* (Hemitera: Cicadeliidae). **Crop Protection**, v. 29, n. 6, p. 635–638, 2010.

WANG, M. B.; ABBOTT, D. C.; WATERHOUSE, P. M. A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus. **Molecular Plant Pathology**, v. 1, n. 6, p. 347-356, 2000.