

VALIDAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA REPRODUÇÃO DA JOANINHA
PREDADORA *Eriopis connexa* (GERMAR) POR SILENCIAMENTO GÊNICO VIA

RNAi

por

IANNE CAROLINE DA SILVA NOBRE

(Sob Orientação do Professor José Dijair Antonino - UFRPE)

RESUMO

A reprodução dos insetos depende da síntese e captação de Vitelogenina pelos oócitos em desenvolvimento num processo conhecido como vitelogênese. Vitelogeninas (Vg) são glicolipoproteínas sintetizadas principalmente nas células do tecido gorduroso que, antes de serem excretadas na hemolinfa e internalizadas nos oócitos, passam por uma série de transformações que permitirão seu transporte e armazenamento. Os Receptores de Vitelogenina (VgRs) são proteínas de membrana dos oócitos responsáveis pela internalização de Vg e sua presença nos ovários é indispensável para a reprodução de fêmeas. Genes *Vg* e *VgR* de muitos insetos já foram identificados, caracterizado, e validados funcionalmente por RNA de interferência (RNAi). Como o RNAi permite inferir a função de genes a partir do fenótipo gerado pelo silenciamento, esta técnica pode ser utilizada para desvendar a função de *Vg* e *VgR* e outros genes em inimigos naturais, como as joaninhas, abrindo caminho para o desenvolvimento de metodologias que possam auxiliar na sua preservação ou até mesmo para produzi-los em grande escala para liberações em campo. Curiosamente, a expressão de *Vg* e *VgR* está sob forte influência de fatores nutricionais, que regula tanto as vias de sinalização de nutrição quanto as vias de síntese de hormônios indispensáveis à expressão

dos mesmos. Sabendo disto, este estudo buscou identificar e validar funcionalmente por RNAi, *Vgs* e *VgR* de *Eriopis connexa* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae), uma joaninha predadora que atua principalmente no controle de pulgões, bem como averiguar o efeito da alimentação preferencial para a expressão dos genes reprodutivos nesta espécie. Com isso, dois genes *Vgs* e um gene *VgR* foram identificados e caracterizados. O tipo de alimento influencia as taxas de expressão de *Vg*. Além disso, foram estabelecidas as condições para a injeção de dsRNA (indutor do silenciamento) na hemolinfa dos Insetos. O silenciamento por RNAi mostrou que, diferente de outros insetos, estes genes não influenciam na oviposição, mas são fundamentais para a viabilidade dos ovos em *E. connexa*. Além disso, os genes de *Vitelogenina* são redundantes, pois é necessário silenciar os dois para se ter um efeito na viabilidade dos ovos.

PALAVRAS-CHAVE: Coleoptera, Coccinelliade, vitelogenina, receptor de vitelogenina, clatrina, dsRNA.

VALIDATION OF GENES INVOLVED IN LADYBUG *Eriopis connexa* (GERMAR)

REPRODUCTION BY RNAi

por

IANNE CAROLINE DA SILVA NOBRE

(Under Direction of José Dijair Antonino - UFRPE)

ABSTRACT

Insect reproduction depends on the synthesis and uptake of vitellogenin by developing oocytes in a process known as vitellogenesis. In insects, Vitellogenins (Vg) are glycolipoproteins synthesized mainly in fatty tissue cells that, before being excreted in the hemolymph and internalized in the oocytes, undergo a series of transformations that will allow their transport and storage. Vitellogenin Receptors (VgRs) are oocyte membrane proteins responsible for the internalization of Vg and their presence in the ovaries is essential for female reproduction. *Vg* and *VgR* genes from many insects have already been identified, characterized and functionally validated by RNA interference (RNAi). As RNAi allows studying the function of genes within a given organism, the technique can be used to unravel the function of *Vg* and *VgR* in natural enemies, paving the way for the development of methodologies that can preserve them or even produce them in big scale. Interestingly, the expression of *Vg* and *VgR* is strongly influenced by nutrition, which regulates both the nutrition signaling pathways and the hormone synthesis pathways that are essential for their transcription. Knowing this, this study sought to identify and functionally validate *Vgs* and *VgR* of *Eriopis connexa* Germar, a predatory ladybug that acts mainly in the control of aphids, as well as to investigate the effect of preferential feeding on the expression of reproductive

genes in this species. Thus, two *Vgs* genes and one *VgR* gene were identified. Feeding seems to influence *Vg* rates and RNAi bioassays showed that these genes do not influence oviposition but are essential for egg viability in *E. connexa*.

KEY WORDS: Coleoptera, Coccinelliade, vitellogenin, vitellogenin receptor, dsNRA, siRNA, gene expression.

VALIDAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA REPRODUÇÃO DA JOANINHA
PREDADORA *Eriopis connexa* (GERMAR) POR SILENCIAMENTO GÊNICO VIA
RNAi

por

IANNE CAROLINE DA SILVA NOBRE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, da Universidade
Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre
em Entomologia.

RECIFE - PE

Fevereiro - 2023

VALIDAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA REPRODUÇÃO DA JOANINHA
PREDADORA *Eriopis connexa* (GERMAR) POR SILENCIAMENTO GÊNICO VIA
RNAi

por

IANNE CAROLINE DA SILVA NOBRE

Comitê de Orientação:

José Dijair Antonino de Souza Júnior – UFRPE

Roberta Ramos Coelho – PNPd-UFRPE

VALIDAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA REPRODUÇÃO DA JOANINHA
PREDADORA *Eriopis connexa* (GERMAR) POR SILENCIAMENTO GÊNICO VIA
RNAi

por

IANNE CAROLINE DA SILVA NOBRE

Banca Examinadora:

José Dijair Antonino de Souza Júnior (Presidente) – UFRPE

Marcelo Henrique Santos Paiva – UFPE

Glaucilane dos Santos Cruz - UFRPE

Ianne Caroline da Silva Nobre
Mestre em Entomologia

Prof. José Dijair Antonino de Souza
Júnior – UFRPE
Orientador

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N754v

Nobre, Ianne Caroline da Silva

VALIDAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA REPRODUÇÃO DA JOANINHA PREDADORA *Eriopis connexa* (GERMAR) POR SILENCIAMENTO GÊNICO VIA RNAi / Ianne Caroline da Silva Nobre. - 2023.
77 f. : il.

Orientador: Jose Dijair Antonino de Souza Junior.

Coorientadora: Roberta Ramos Coelho.

Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, Recife, 2024.

1. Coleoptera. 2. Coccinellidae. 3. Vitelogenina. 4. Receptor de vitelogenina. 5. Clatrina. I. Junior, Jose Dijair Antonino de Souza, orient. II. Coelho, Roberta Ramos, coorient. III. Título

CDD 632.7

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, *Maria Sogna Marta da Silva Nobre* e *Francisco do Carmo Nobre*, e a
minha tia *Maria de Fátima Nobre*.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia (PPGE).

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela concessão de bolsa.

Ao meu orientador, José Dijair Antonino de Souza Júnior, por todas as orientações, conversas e ensinamentos que foram cruciais para o meu desenvolvimento na ciência. Agradeço ainda pela paciência e sabedoria em conduzir meus erros e corrigi-los sempre da melhor forma possível.

A minha coorientadora, Roberta Ramos Coelho, pela paciência, ensinamentos e por ter me ensinado a engatinhar no mundo da biologia molecular.

A minha família, em especial aos meus pais - Francisco do Carmo Nobre e Maria Sogna Marta da Silva Nobre – e a minha tia, Maria de Fátima Nobre, por todo amor, confiança e suporte. Vocês são a minha fortaleza e o motivo de todos os meus esforços!

Ao meu amigo, Elton John Oliveira Galdino, por toda amizade, suporte, companheirismo e por tornar as batalhas da vida um pouco mais leves.

Aos professores, Jorge Torres (UFRPE), Hebert Siqueira (UFRPE), Manoel Guedes (UFRPE), Paschoal Grossi (UFRPE) e Marcelo Paiva (UFPE) pela disponibilidade de uso em seus respectivos laboratórios.

A todos do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos (LIMB^o), em especial aos amigos Felipe Coutinho, Manoely Abreu e Jamilly Araújo, por todo carinho e suporte.

Aos companheiros do PPGE-UFRPE, em especial, Natália Bermudez, Deividy Nascimento, Raquel Soares, Rogério Lira, Lídia Almeida e Aline Lira que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

A todos os amigos do PPGE-UFRPE, que tornaram a caminhada mais leve ao compartilhar tantos momentos de descontração.

A Izabely Silva, pelo carinho, suporte e por ter acreditado nesse sonho antes mesmo que eu pudesse fazê-lo.

A todos que, ao longo dessa jornada em Recife, tornaram os dias mais leves mesmo diante de tantas atribulações. Amo vocês!

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	ix
LISTA DAS FIGURAS	19 e 55
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
LITERATURA CITADA.....	11
2 O SILENCIAMENTO POR RNAi DE <i>EcVgR</i> E DE AMBAS AS VITELOGENINAS (<i>EcVg1</i> e <i>EcVg2</i>) DIMINUEM A VIABILIDADE, MAS NÃO A QUANTIDADE DE OVOS DEPOSITADOS PELA JOANINHA <i>Eriopsis connexa</i>	24
RESUMO	25
ABSTRACT	27
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS	31
RESULTADOS.....	37
DISCUSSÃO	40
LITERATURA CITADA	47
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	66

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Os insetos, ao longo de sua história evolutiva, provaram de diversas modificações que permitiram não apenas seu sucesso evolutivo, mas também a colonização dos mais variados ecossistemas (Gullan e Craston 2019). Grande parte deste sucesso se deu em virtude das estratégias reprodutivas desenvolvidas pelos mesmos, que envolvem tanto a oviparidade quanto a viviparidade e partenogênese (Nation 2016b). Independente da estratégia reprodutiva, as estruturas do aparelho reprodutivo feminino, que está localizado dorsoventralmente ao intestino, são comuns e constituídas por um par de ovários (meroítico ou panoísta), ovidutos laterais, oviduto comum, spermateca e glândulas acessórias ([Fig. 1a](#)) (Engelman 1970, Hoffmann 1995, Nation 2016b).

A nível molecular, a principal proteína envolvida na reprodução é a Vitelogenina (Vg) (Tufail *et al.* 2014). Sua produção (vitelogênese) e captação pelos oócitos em desenvolvimento, bem como a produção de uma casca do ovo (córion) que permite trocas gasosas estão entre as principais adaptações que permitiram o sucesso reprodutivo neste grupo (Hoffman 1995). Contudo, a produção efetiva de novos indivíduos depende não apenas da vitelogênese, mas da ação coordenada de diferentes fatores que tangem a reprodução, como a regulação hormonal, vitelogênese, ovogênese, embriogênese, nutrição, comportamento sexual, acasalamento e oviposição (Hoffman 1995, Poels *et al.* 2004, Smykal & Raikhel 2015, Nation 2016a, Heifetz & Tram 2018, Roy *et al.* 2018). Entre estes fatores, a regulação hormonal e a nutrição são pontos críticos. Geralmente, a regulação hormonal é guiada principalmente pelos hormônios juvenil (HJ), ecdisteróides e neuropeptídeos (Poels *et al.*

2004, Roy *et al.* 2018). Mas, os meios pelos quais estes hormônios guiam a reprodução nos diferentes grupos de insetos podem variar (Roy *et al.* 2018, Wu *et al.* 2021). A importância de HJ e ecdisteróides para a reprodução foi identificado para pelo menos sete grandes ordens de Insecta: Orthoptera (Luo *et al.* 2017), Diptera (Attardo, Hansen & Raikhel 2005) Blattodea (Marchal *et al.* 2014), Hemiptera (Gujar & Palli, 2016), Coleoptera (Parthasarathy *et al.* 2010a, b), Lepidoptera (Shpigler *et al.* 2014) e Hymenoptera (Swevers & Iatrou 2009) e revisões mais detalhadas para como estes funcionam nos diferentes grupos são fornecidas por Roy *et al.* (2018) e Wu *et al.* (2021).

Em linhas gerais, a transcrição de genes de *Vitelogenina* (*Vg*) está sob o controle de hormônios e dependem essencialmente da formação de um complexo hormônio-receptor (Tufail *et al.* 2014). Um estudo desenvolvido utilizando *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) como modelo mostrou como HJ e seu receptor (tolerante a metopreno - Met) são essenciais desde a promoção da replicação do DNA até a síntese maciça de Vg (Guo *et al.* 2014). Da mesma maneira, a atuação do complexo HJ-receptor é crítica para a ativação da transcrição do gene *Cdc6*, que é essencial para a formação do complexo pré-replicação, e posterior expressão de Vg no corpo gorduroso, maturação oocitária e crescimento ovariano (Wu *et al.* 2016). Além disso, o silenciamento de *Met* em *Schistocerca gregária* (Orthoptera: Acrididae) promoveu uma diminuição significativa da expressão de *Vgs* identificadas em fêmeas adultas (Ahmed & Haunerland 2022), comprovando mais uma vez a importância dos hormônios para a produção efetiva de Vg. Em Coleoptera, HJ é o principal regulador da reprodução, enquanto os ecdisteróides parecem atuar principalmente na maturação dos oócitos (Parthasarathy *et al.* 2010a, b).

O outro ponto regulatório de extrema importância para a reprodução é a nutrição e a sinalização nutricional, pois influenciam diretamente a síntese de hormônios reprodutivos

(Smykal & Raikhel 2015, Roy *et al.* 2018). Segundo Dixon (2000), a qualidade e a quantidade de nutrientes adquiridos são fundamentais para que o crescimento e a reprodução ocorram. Junto a isso, o reconhecimento de nutrientes mediado pela via “amino acid-Target of Rapamycin” AA/TOR e a via da insulina tornam a nutrição um dos principais pontos de regulação reprodutiva ao atuarem diretamente sobre as vias de síntese de HJ e ecdisteróides (Smykal & Raikhel 2015, Roy *et al.* 2018). Em 1975, Bell e Bohm (1975) já haviam proposto que o estresse nutricional poderia provocar a degeneração de folículos além de promover o retardo ou bloqueio da oviposição. Bonte *et al.* (2010), mostraram que a composição nutricional é um fator crucial não só para a reprodução, mas também para o desenvolvimento de *Adalia bipunctata* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae). Em *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae), Parthasarathy & Palli (2011) sugerem que a sinalização nutricional influencia tanto a regulação hormonal quanto a reprodução desta espécie, já que a fome interrompe a vitelogênese e a alimentação pós jejum permite a retomada de produção de Vg e a maturação oócitaria. Zhang *et al.* (2019), trabalhando com *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae), constataram que uma dieta artificial para criação em laboratório pode afetar a reprodução ao reduzir a fecundidade, assim como demonstrado por Adams (2000) quando estudou o efeito de uma dieta artificial no hemíptero *Perillus bioculatus* (Hemiptera: Pentatomidae). Por fim, mais recentemente Chen *et al.* (2022) observou que o estresse nutricional pode reduzir a expressão de Vg em *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae).

Para os embriões de todos os insetos e demais organismos que se desenvolvem dentro de ovos, a principal e mais importante fonte alimentar é a Vitelina (Vn), forma cristalizada da Vitelogenina (Vg) que é armazenada nos oócitos durante os processos de vitelogênese (Wahli 1988, Tufail & Takeda 2008). Vgs são glicolipoproteínas de 400 a 600kDa sintetizadas

principalmente no tecido gorduroso de fêmeas adultas (Nation *et al.* 2016b) sob regulação transcricional de hormônios específicos (Wahli 1988, Tufail & Takeda 2008). As Vgs, antes de serem secretadas na hemolinfa e absorvidas pelos ovários, passam por uma série de transformações de glicosilação, lipidação, fosforilação e clivagem de proteínas que ajudarão no seu posterior transporte e absorção (Raikhel & Dhadilla 1992, Wahli 1988, Tufail & Takeda 2008).

A importância de Vg para reprodução dos insetos já foi evidenciada em *Cimex lectularius* (L.) (Hemiptera: Cimicidae) (Mariyama *et al.* 2016), *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (Han *et al.* 2022a), *S. gregária* (Ahmed & Haunerland 2022) e *T. castaneum* (Parthasathy *et al.* 2010). Entretanto, alguns estudos demonstraram que a expressão de Vg não ocorre exclusivamente em fêmeas adultas, nem tampouco unicamente em células do tecido gorduroso. Brennan *et al.* (1982) já haviam demonstrado que as células do tecido folicular do ovário de *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Diptera: Drosophilidae) são o local específico e majoritário da síntese de Vg. Em *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) Vg também é transcrito no corpo gorduroso de fêmeas no estágio transicional de ecdise entre larva e pupa (Yano *et al.* 1994).

No inseto subsocial, *Nicrophorus vespilloides* (Herbst) (Coleoptera: Silphidae), a síntese de Vg foi registrada no cérebro tanto de machos quanto de fêmeas (Roy-Zakan *et al.* 2015). Já no cupim *Reticulitermes speratus* (Kolbe) (Blattodea: Rhinotermitidae), uma das Vgs identificadas estava sendo expressa na cabeça e no abdome de operárias (Yaguchi *et al.* 2022). Desta forma, Vgs nem sempre estão associados exclusivamente à reprodução e a sua presença em tecidos de outras partes do corpo pode conferir funções diferentes a este gene. A exemplo disto, os estudos Nelson *et al.* (2007), Ray-Zokan *et al.* (2015), Salmela & Sundström (2018) e Yaguchi *et al.* (2022) propõem que, em insetos sociais, a quantidade de Vg no corpo de

adultos ou a presença de transcritos de *Vg* no cérebro de insetos pode influenciar a diferenciação de castas e o comportamento social nestes insetos.

Vitelogeninas são altamente conservadas entre insetos, artrópodes não-inseto, nematóides, vertebrados (Wahli 1988, Sappington & Raikhel 1998, Zhenhui *et al.* 2022). A estrutura proteica de *Vg* já foi identificada e caracterizada para diversas espécies de insetos e, em algumas, apenas uma versão para o gene *Vg* foi identificado, como em *Bemisia tabaci* (Upadhyay *et al.* 2016), *C. lectularius* (Mariyama *et al.* 2016) e *S. frugiperda* (Han *et al.* 2022a). Contudo, duplicações gênicas em *Vg* são comuns (Wahli 1988, Sappington & Raikhel 1998) e já foi identificada em *Periplaneta americana* (Tufail *et al.* 2000 e 2001), *Leucophaea maderae* (Tufail *et al.* 2002 e 2007) e *S. gregaria* (Ahmed & Haunerland 2022). Surpreendentemente, três *Vgs* foram identificados em *D. melanogaster* (Brennan *et al.* 1982), quatro em *R. speratus* (Yaguchi *et al.* 2022), quatro em *Z. cucurbitae* (Chen *et al.* 2022) e cinco em *Aedes aegypti* (Chen *et al.* 1994, Romans *et al.* 1995). Em Coleoptera, o primeiro registro e caracterização de *Vg* foi feito para o bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* (Trewitt *et al.* 1992).

Quanto a arquitetura da proteína traduzida, a presença dos domínios proteicos Vitellogenin_N (região amino-terminal da lipoproteína), DUF1943 (domínio de função desconhecida) e domínio de tipo D do fator de von Willebrand (VWD) são comuns e bem conservados, como discutido por Sun *et al.* 2013. Comumente, Vitellogenin_N está associado ao transporte de lipídeos (Anderson, Levitt & Banaszak 1998). No peixe-zebra, *Danio rerio* (Buchanan-Hamilton), DUFs e VWD foram associados tanto a fatores reprodutivos quanto a mecanismos que levam ao reconhecimento de padrões de patógenos (Sun *et al.* 2013). Em abelhas, Leipart *et al.* (2022) presume que VWD provavelmente contribui para a imunidade. Já no camarão oriental *Macrobrachium nipponense* De Haan, a identificação e o estudo de

VWD indicou fortemente que este domínio pode ter função crítica na maturação dos oócitos (Zhang *et al.* 2011). Além disto, a caracterização funcional destes três domínios no coral não-bilateral, *Euphyllia ancora*, sugere que Vg também pode desempenhar funções imunológicas interagindo com bactérias Gram-positivas e negativas, bem como aumentando a fagocitose por macrófagos (Du *et al.* 2017).

Considerando os processos reprodutivos em organismos onde a vitelogenina é sintetizada principalmente nos trofócitos (células do tecido gorduroso) com a função de nutrir os embriões, uma fase pré-vitelogênica, marcada pela ativação dos nucléolos, proliferação de ribossomos e retículo endoplasmático rugoso, desenvolvimento de complexos golgienses e extensas invaginações da membrana plasmática é observada nesse tecido (Raikhel & Lea 1983). Posterior a isso, condições específicas para cada organismo faz com que a fase vitelogênicase inicie. No mosquito *Aedes aegypti*, a condição crucial que desencadeia essa fase é a detecção de rastros sanguíneos após o repasto (Raikhel & Lea 1983).

Para que a Vg produzida nos trofócitos sejam internalizadas nos oócitos em desenvolvimento, e conseqüentemente possam nutrir os futuros embriões, é necessário que o HJ atue como um receptor de membrana promovendo uma patência (alargamento) nos espaços entre as células do epitélio folicular que revestem os oócitos ([Fig. 1b](#)) (Nation *et al.* 2016b). Diante disto, a Vg secretada do tecido gorduroso e transportada até os ovários pela hemolinfa consegue ser exposta à superfície do oócito, onde poderá se ligar ao seu receptor (Receptor de Vitelogenina - VgR) presente na membrana (Engelman 1970, Hoffmann 1995). Uma vez que o complexo Vg-VgR foi formado, estes invaginam para o interior do oócito em um revestimento de proteínas clatrina (Tufail & Takeda 2008 e 2009, Nation *et al.* 2016b). Segundo estes mesmos autores, após a completa internalização do complexo Vg-VgR, a acidificação por transporte de H⁺ para o interior da vesícula formado por clatrina, faz com

que o arranjo Vg-VgR-Clatrina se dissolva e, dessa forma, a Vg internalizada fique disponível para os processos de cristalização e armazenamento no formato de Vitelina (Vn). Ainda segundo os mesmos, VgR e Clatrina que mediarão a internalização dos dímeros de Vg são reciclados e retornam à membrana do oócito ([Fig. 1c](#)).

A caracterização molecular de VgRs mostrou que estes configuram-se como proteínas transmembrana indispensáveis à reprodução, que pertencem a superfamília de receptores de lipoproteína de baixa densidade e que possuem os seguintes domínios proteicos bem conservados em sua arquitetura: LDL α e LDL β (Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade – *Low Density Lipoprotein Receptor*); precursores do fator de crescimento epidermal (EGF); domínio de açúcar O-ligado; domínio transmembrana; e domínio citoplasmático (Tufail & Takeda 2009, Upadhyay *et al.* 2016, Huo *et al.* 2019, Yang *et al.* 2021, Han *et al.* 2022a, b). O domínio dos LDL α normalmente se divide em dois clusters e a quantidade de repetições presente em cada cluster dita o tipo de VgR: Tipo I possui cinco repetições no primeiro cluster e 8 no segundo e o Tipo II é formado por um arranjo 4 + 8 (Tufail & Takeda 2009). Estes domínios são fundamentais para um desempenho adequado de VgR pois permitem a interação receptor-Vg (LDLR), promovem a dissociação de complexo Vg-VgR no endossoma acidificado (EGF), mantêm o receptor estável na membrana do oócito (domínio transmembrana), direcionam os receptores por sinais de internalização (domínio citoplasmático) e proporcionam estabilidade à região da proteína que se estende além da membrana ou até mesmo protegem contra desnaturação enquanto VgR está sendo reciclado (domínio de açúcar ligado à O) (Tufail & Takeda 2009).

O Receptor de Vitelogenina já foi estudado em Diptera (Sappington *et al.* 1996), Blattaria (Tufail & Takeda 2007), Lepidoptera (Husain *et al.* 2020, Han *et al.* 2022a), Orthoptera (Xiang *et al.* 2019), Hemiptera (Huo *et al.* 2019) e mais recentemente em

Coleoptera (Han *et al.* 2022b). Normalmente, VgRs são encontrados associados aos ovários e por isso sua expressão é considerada tecido/específica (Tufail & Takeda 2009). Contudo, a expressão deste gene já foi relatada em glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* (Amdam *et al.* 2003), no cérebro de machos e fêmeas de *N. vespilloides* (Roy-Zokan *et al.* 2015), bem como no intestino médio, glândulas salivares e hemócitos de *Laodelphax striatellus* (Huo *et al.* 2019).

Muitos dos estudos realizados com estes genes voltam-se para espécies consideradas praga ou insetos sociais (Nelson *et al.* 2007, Ray-Zokan *et al.* 2015, Upadhyay *et al.* 2016, Salmela & Sundström 2018, Huo *et al.* 2019, Han *et al.* 2022a, Yaguchi *et al.* 2022). Todavia, estudar os padrões moleculares de expressão de *Vg* e *VgR* em inimigos naturais é fundamental para a produção de novas metodologias que possibilitem sua manipulação e produção massal (Han *et al.* 2022b). Os coccinelídeos, vulgarmente conhecidos como joaninhas (Hodek & Honěk 1996), são um dos principais grupos de predadores que possuem grande potencial de uso em programas de controle biológico pois se alimentam ativamente de pulgões, cochonilhas, psilídeos e moscas brancas (Hodek & Honěk 2009), ácaros (Biddinger *et al.* 2009), ovos e imaturos de coleópteros e lepidópteros (Evans 2009) e outros alimentos que não são presa (Lundgren 2009). No Brasil, as principais espécies de joaninhas predadoras são *Cycloneda sanguinea* (L.), (Araujo-Siqueira & Almeida 2006), *Eriopis connexa* (Germar), *Hippodamia convergens* (Guérin-Méneville), *Coleomegilla maculata* (DeGeer), *Olla v-nigrum* (Mulsant), *Harmonia axyridis* (Pallas), entre outras (Gassen 1986, Gravena 2005, Torres *et al.* 2009). Dentre estas joaninhas predadoras, a espécie *E. connexa* é observada frequentemente em diversas culturas (Rodrigues *et al.* 2013) tendo como presas preferenciais os pulgões (Queiroz *et al.* 2005, Oliveira *et al.* 2005, Sarmiento *et al.* 2007). No Brasil, sua

distribuição é registrada para os estados de Pernambuco, São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina (Almeida *et al.* 2023).

O desenvolvimento de indivíduos desta espécie é característico de insetos holometábolos. Os ovários são classificados como meroístico telotrófico, comum aos polyphaga (Nation 2016). O ciclo de vida dura em média 21 dias e se inicia com a postura de ovos que dão origem a larvas que passam por quatro ínstares de desenvolvimento antes de se tornarem pupas e, posteriormente, emergirem como adultos (Silva *et al.* 2006) ([Fig. 2](#)). Durante sua história de vida, as fêmeas podem chegar a pôr, em média, 940 ovos (Lira *et al.* 2016) com uma viabilidade média de 45 a 50% (Lira *et al.* 2016, Santos *et al.* 2016).

Uma vez que a presença deste inimigo natural em determinada cultura pode promover o controle de espécies indesejadas, *E. connexa* é vista como um importante agente de controle biológico que auxilia na diminuição do uso de inseticidas (Fogel *et al.* 2016). Contudo, apesar das benesses proporcionadas por este inimigo natural, alguns trabalhos têm demonstrado que o uso de inseticidas, por mais que seletivos, geram um custo adaptativo que influencia diretamente na reprodução deste inimigo natural (Ferreira *et al.* 2013, Fogel 2013, Lira *et al.* 2016, Santos *et al.* 2016, D'Ávila *et al.* 2018). Em concordância a isto, estudos do impacto de inseticidas sobre a biologia reprodutiva de um coccinelídeo e um thysanóptero mostram como alguns compostos podem interferir na expressão de *Vg*. Em *Frankliniella occidentalis* resistente a spinosad, o custo adaptativo gera diminuição na fecundidade e ovariolos encurtados (Hua *et al.* 2022). Em *Coccinella septempunctata*, doses subletais de Sulfoxaflor foram capazes de reduzir a expressão de *Vg* tanto na geração F₀ quanto na progênie (F₁) (Wang *et al.* 2023).

Além disso, Sarmiento *et al.* (2004) ainda demonstrou que o tipo de alimentação pode influenciar fatores reprodutivos de *E. connexa*. Neste trabalho, os autores observaram que uma

alimentação baseada em afídeos fez com que as células do tecido gorduroso fossem 3 vezes maiores do que a de indivíduos mantidos com outro tipo de alimento. Sendo assim, faz-se necessário entender os mecanismos moleculares dos processos reprodutivos em *E. connexa*. Neste contexto, a tecnologia do RNA de interferência ou RNA interferente (RNAi) apresenta-se como uma excelente ferramenta, visto que possibilita a realização de estudos de validação funcional de genes de maneira rápida e eficiente.

RNAi é um mecanismo molecular que usa RNA de fita dupla (dsRNA) para guiar o silenciamento de genes a partir da atuação de duas enzimas principais: Dicer (Dcr) e Argonata (Ago) (Wynant, Santos & Broeck 2014). Nesse processo, moléculas de RNA mensageiro (mRNA) que possuam identidade ao dsRNA são drasticamente reduzidas e, como consequência, a síntese de proteínas específicas é restringida (Fire *et al.* 1998). Em virtude disso, este instrumento logo se configurou como uma técnica de genômica funcional que auxilia a desvendar a função de vários genes em diversos organismos (Wynant, Santos & Broeck 2014). A maquinaria de RNAi é conservada em todos os eucariotos e pode ser dividida em três vias de acordo com sua origem e função: via dos microRNAs (miRNAs); dos pequenos RNAs interferentes (siRNAs) e RNA de interação com PIWI (piRNAs) (Jin *et al.* 2009, Kobayashi & Tomari 2016). Estes pequenos RNAs não-codificantes (ncRNAs) (Eddy 2001) atuam regulando a expressão de genes endógenos e exógenos (Meister & Tuschl 2004); fornecendo imunidade contra patógenos (Zhao, Kong & Wu 2021), proteção contra produtos de transposons (Tabara *et al.* 1999) e entre outros. Para qualquer uma destas vias, tanto a endonuclease da família III (Dicer RNase III) quanto o Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC) são componentes essenciais ao controle da transcrição (Wynant, Santos & Broeck 2014). Segundo estes autores, após a chegada de um dsRNA de cadeia longa ao citoplasma celular, a Dcr cliva essa molécula em pequenos fragmentos (siRNA e miRNA) que

se associam ao Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC) que, por sua vez, utiliza a fita antiparalela para identificar o mRNA alvo e interrompem a expressão proteica por degradação ou inibição do mRNA correspondente (Fig. 3). Tanto a degradação de mRNA quanto a inibição transcricional se dão pela atividade do sítio catalítico do RISC, que é denominado de Argonauta (Ago) (Kobayashi & Tomari 2016).

A identificação e validação de *Vgs* e *VgR* de várias espécies de insetos têm sido realizadas por RNAi, demonstrando-se o potencial uso desta técnica tendo *Vg* e *VgR* como genes-alvo para o silenciamento e controle de organismos indesejados, como no caso de *Bemisia tabaci* (Hemiptera) (Upadhyay *et al.* 2016) e *Frankliniella occidentalis* (Hua *et al.* 2022). Adicionalmente, RNAi oferece uma possibilidade de entender os mecanismos moleculares que tangem a reprodução e utilizar tais informações para a otimização das técnicas para produção massal de inimigos naturais (Han *et al.* 2022b) além de proporcionar uma melhor compreensão de mecanismos fisiológicos e ecológicos. Por isso, este trabalho buscou identificar os genes *Vg* e *VgR* em transcriptoma de *E. connexa* (dados não publicados) e validá-los funcionalmente por RNAi para estabelecer e otimizar a técnica de RNAi nesta espécie. Além disso, demonstramos a influência do tipo de alimento consumido por *E. connexa* na expressão de *Vgs*.

Literatura Citada

- Adams, T. S. 2000.** Effect of diet and mating status on ovarian development in a predaceous stink bug *Perillus bioculatus* (Hemiptera: Pentatomidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 93, 529–535.
- Ahmed, A.S. & N.H. Haunerland. 2022.** Primary structure and expression of vitellogenin A and vitellogenin B in the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). Can. Entomol., 145:e43.

- Almeida L.M, P.B. Santos, C.F. Castro-Guedes & J.M. Churata-Salcedo. 2023.** Coccinellidae in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. PNUD. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/121559>>.
- Amdam, G.V.Z., L.P. Simões, K.R. Guidugli, K. Noberg & S.W. Omholt. 2003.** Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybee by intra-adenal injection of double-stranded RNA. BMC Biotechnol., 3:
- Anderson, T.A., D.G. Levitt & L.J. Banaszak. 1998.** The structural basis of lipid interactions in lipovitellin, a soluble lipoprotein. Curr. Biol., 6:895-909.
- Araújo-Siqueira, M. & L.M. Almeida. 2006.** Estudos das espécies brasileiras de *Cycloneda* Crotch (Coleoptera, Coccinellidae). Rev. Bras. Zool. 23: 550-568.
- Attardo G.M., I.A. Hansen & A.S. Raikhel. 2005.** Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. Insect. Biochem. Mol. Biol. 35:661–75
- Bell, W J & M K Bohm. 1975.** Oosorption in insects. Biol. Rev. 50: 373–396.
- Biddinger, D.J., D.C. Weber & L.A. Hull. 2009.** Coccinellidae as predators of mites: Stethorini in biological control. Biol. Control., 51: 268-283
- Bonte, M., M.A. Samih & P.D. Clercq. 2010.** Development and reproduction of *Adalia bipunctata*, on factitious and artificial foods. Bio. Control., 55, 485–491.
- Brennan, M.D., A.J. Weiner, T.J. Goralski & A.P. Mahowald. 1982.** The follicle cells are a major site of vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. Dev. Biol., 89:225-236.
- Chapman, R. 1998.** Nutrition. In The Insects: Structure and Function. Cambridge University Press, p. 69-93.
- Chen, D., H-L. Han, W-J. Li, J-J. Wang & D. Wei. 2022.** Expression and role of *Vitellogenin* gene in ovarian development of *Zeugodacus cucurbitae*. Insects, 13:
- Chen, J.-S., W.-L. Cho, & A.S. Raikhel. 1994.** Analysis of mosquito vitellogenin Cdna similarity with vertebrate phosvitins and arthropod serum proteins. J. Mol. Biol., 237: 641-647.
- D’ávila, V.A., W.F. Barbosa, L.C. Reis, B.S.A. Gallardo, J.B. Torres & R.N.C. Guedes. 2018.** Lambda-cyhalothrin exposure, mating behavior and reproductive output of pyrethroid-susceptible and resistant lady beetles (*Eriopis connexa*). Crop Prot. 107:41–47.
- Dixon, A.F.G. 2000.** Insect Predator–Prey Dynamics: Ladybird Beetles and Biological Control. Cambridge University Press.

- Du, X., X. Wang, S. Wang, Y. Zhou, Y. Zhang & S. Zhang. 2017.** Functional characterization of vitellogenin N domain, domain of unknown function 1943, and von Willebrand factor type D domain in vitellogenin of the non-bilaterian coral *Euphyllia ancora*: Implications for emergence of immune activity of vitellogenin in basal metazoan. *Dev. Comp. Immunol.*, 67:485-494.
- Eddy, S.R. 2001.** Non-coding RNA genes and the modern RNA word. *Nat. Rev. Gen.*, 2:919-929.
- Engelmann, F. 1970.** Gonadal development in The physiology of insect reproduction. International series of monographs in Pure and Applied Biology, Zoology Division, 44:
- Evans, E.W. 2009.** Lady beetles as predators of insects other than Hemiptera. *Biol. Control.*, 51:255-267.
- Ferreira, E.S., A.R. Rodrigues, C.S. Silva-Torres & J.B. Torres. 2013.** Life-history costs associated with resistance to lambda-cyhalothrin in the predatory ladybird beetle *Eriopis connexa*. *Agric. For. Entomol.* 15: 168–177.
- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery & et al. 1998.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nat.*, 391: 806-811.
- Fogel M.N., M.I. Schneider, F. Rimoldi, L.S. Ladux, N. Desneux & A.E. Ronco. 2016.** Toxicity assessment of four insecticides with different modes of action on pupae and adults of *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae), a relevant predator of the Neotropical Region. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 23:14918-14926.
- Fogel M.N., M.I. Schneider, N. Desneux, B. González & A.E. Ronco. 2013.** Impact of the neonicotinoid acetamiprid on immature stages of the predator *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ecotoxicology*. 6:1063-71.
- Gassen, D.N. 1986.** Parasitos, patógenos e predadores e insetos associados à cultura do trigo. Passo Fundo, Embrapa Trigo, Circular Técnica, 186p.
- Gravena, S. 2005.** Manual Prático de manejo ecológico de pragas dos citros. Jaboticabal, Gravena Ltda, 372p.
- Gujar H. & S.R. Palli. 2016.** Juvenile hormone regulation of female reproduction in the common bed bug, *Cimex lectularius*. *Sci. Rep.* 6:35546
- Guo, W., Z. Wu, J. Song, F. Jiang, Z. Wang, S. Deng, V.K. Walker & S. Zhou. 2014.** Juvenile Hormone Receptor complex acts on Mcm4 and Mcm7 to promote polyploidy and vitellogenesis in the migratory locust. *PLoS Genet.*, 10: e1004702.

- Han, S., D. Wang, P. Song, S. Zhang & Y. He. 2022a.** Molecular Characterization of Vitellogenin and Its Receptor in *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797), and Their Function in Reproduction of Female. *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 11972
- Han, H., S. Han, Q. Qin, J. Chen, D. Wang & Y. He. 2022b.** Identification and functional characterization of Vitellogenin Receptor from *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *J. Econ. Entomol.*, 115:325-333.
- Heifetz, Y. & Y. Tram. 2018.** Oogenesis, final oocyte maturation and ovulation, *Insects*. Encyclopedia of Reproduction, 2nd edition, 6:239-245.
- Hodek, I. & A. Honěk. 1996.** The ecology of Coccinellidae. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 480p.
- Hodek, I. & A. Honěk. 2009.** Scale insects, mealybugs, whiteflies and psyllids (Hemiptera, Sternorrhyncha) as prey of ladybirds. *Biol. Control.*, 51: 232–243.
- Hoffmann, K.H. 1995.** Oogenesis and the female reproductive system in *Insect Reproduction*. Leather, S.R. & Hardie, J. CRC Press, 1995.
- Hua, D., X. Li, J. Yuan, M. Tao, K. Zhang, X. Zheng, Y. Wan, L. Gui, Y. Zhang & Q. Wu. 2022.** Fitness cost of spinosad resistance related to vitellogenin in *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Pest. Manag. Sci.*, 79: 771-780.
- Hu, K., P. Tian, Y. Tang, L. Yang, L. Qiu, H. He, W. Ding, Z. Li, & Y. Li. 2019.** Molecular characterization of vitellogenin and its receptor in *Sogatella furcifera*, and their function in oocyte maturation. *Front. Physiol.* 10: 1532.
- Huo, Y., Y. Yu, Q. Liu, D. Liu, M. Zhang, J. Liang, X. Chen, L. Zhang & L. Fang. 2019.** Rice stripe virus hitchhikes the vector insect vitellogenin ligand-receptor pathway for ovary entry. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 374: e20180312.
- Husain, M., K. G. Rasool, M. Tufail, & A. S. Aldawood. 2020.** Molecular characterization, expression pattern and RNAi-mediated silencing of vitellogenin receptor gene in almond moth, *Cadra cautella*. *Insect Mol. Biol.* 29: 417–430
- Jin, L., K. Kryukov; Y. Suzuki; T. Imanishi; K. Ikeo & T. Gojobori. 2009.** The evolutionary study of small RNA-directed gene silencing pathways by investigating RNase III enzymes. *Gen.*, 435:1-8.
- Kobayashi, H. & Y. Tomari. 2016.** RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1859:71-81.
- Leipart, V., M. Montserrat-Canals, E.S. Cunha, H. Luecke, E. Herrero-Galán, O. Halskau & G.V. Amdam. 2022.** Structure prediction of honey bee vitellogenin: a multidomain protein important for insect immunity. *FEBS Open Bio*, 12:51-70.

- Lira, R., A.R.S. Rodrigues & J.B. Torres. 2016.** Fitness advantage in heterozygous ladybird beetle *Eriopis connexa* (Germar) resistant to lambda-cyhalothrin. *Neotrop. Entomol.* 45: 573–579.
- Lu, K., Y. Shu, J. Zhou, X. Zhang, X. Zhang, M. Chen, et al. & W. Zhang. 2015.** Molecular characterization and RNA interference analysis of vitellogenin receptor from *Nilaparvata lugens* (Stål). *J. Insect Physiol.*, 73, 20–29.
- Lundgren, J.G. 2009.** Nutritional aspects of non-prey foods in the life histories of predaceous Coccinellidae. *Biol. Control.*, 51: 294-305.
- Luo M., D. Li, Z. Wang, W. Guo, L. Kang & S. Zhou. 2017.** Juvenile hormone differentially regulates two Grp78 genes encoding protein chaperones required for insect fat body cell homeostasis and vitellogenesis. *J. Biol. Chem.*, 292:8823–34.
- Marchal E., E.F. Hult, J. Huang, Z. Pang, B. Stay & S.S. Tobe. 2014.** Methoprene-tolerant (Met) knockdown in the adult female cockroach, *Diploptera punctata*, completely inhibits ovarian development. *PLOS ONE* 9: e106737.
- Moriyama, M., T. Hosokawa, M. Tanahashi, N. Nikon & T. Fukatsu. (2016).** Suppression of bedbug's reproduction by RNA Interference of vitellogenin. *PLoS One*, 11: 0153984.
- Meister, G. & T. Tuschl. 2004.** Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431:343-349.
- Nation, J.L. 2016a.** Embryogenesis *in* Insect physiology and biochemistry.
- Nation, J.L. 2016b.** Reproduction *in* Insect physiology and biochemistry.
- Nelson, C.M., K.E. Ihle, M.K. Fondrk, R.E. Page Jr & G.V. Amdam. 2007.** The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biol.*, 6:
- Oliveira N.C., C.F. Wilcken & C.A.O. Matos. 2005.** Ciclo biológico e predação de três espécies de coccinelídeos (Coleoptera: Coccinellidae) sobre o pulgão-gigante-dopinus *Cinara atlantica* (Wilson) (Homoptera: Aphididae). *Ver. Bras. Entomol.*, 48: 529-533.
- Parthasarathy R, Z. Sun, H. Bai & S.R. Palli. 2010b.** Juvenile hormone regulation of vitellogenin synthesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40:405–14
- Parthasarathy R., Z. Sheng, Z. Sun & S.R. Palli. 2010a.** Ecdysteroid regulation of ovarian growth and oocyte maturation in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40:429–39.

- Parthasarathy, R. & S.R. Palli. 2011.** Molecular analysis of nutritional and hormonal regulation of female reproduction in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Insect Biochem. Mol. Biol., 41: 294-305.
- Piulachs, M.D., K.R. Guidugli, A.R. Barchuk, J. Cruz, Z.L. Simões & X. Bellés. 2003.** The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. Insect Biochem Mol Biol., 33(4):459-65.
- Poels, G.S., I. Claeys, T.V. Loy, V. Franssens, A. de Loof & J.V. Broeck. 2014.** Neuroendocrinological and molecular aspects os insect reproduction. J. Neuroendocrinol., 16: 649-659.
- Quiroz C.E., P. Larraín S. & P. Sepúlveda R. 2005.** Abundancia Estacional de Insectos Vectores de Virosis en dos Ecosistemas de Pimiento (*Capsicum annum* L.) de la Región de Coquimbo, Chile. Agric. Téc., 65: 3-19.
- Raikhel, A.S. & T.S. Dhadialla. 1992.** Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. Annu. Rev. Entomol., 37: 217–251.
- Raikhel, A.S. & A.O. Lea. 1983.** Previtellogenic developmental and vitellogenin synthesis in the fat body of a mosquito: Na ultrastructural and immonocytochemical study. Tissue Cell., 15:281-299.
- Rodrigues, A.R.S., Spíndola, A.F., Torres, J.B. H.A.A Siqueira & F. Colares. 2013.** Response of diferent populations of seven lady beetle species to lambda-cyhalothrin with record of resistance. Ecotoxicol. Environ. Saf. 96: 53–60.
- Romans, P., Z. Tu, Z. Ke, & H.H. Hagedorn. 1995.** Analysis of a vitellogenin gene of the mosquito *Aedes aegypti* and comparisons to vitellogenins from other organisms. Insect Biochem. Mol. Biol. 25: 939–958.
- Roy, S., T.T. Saha, Z. Zou & A.S. Raikhel. 2018.** Regulatory pathways controlling female insect reproduction. Annu. Rev. Entomol., 63:489-511.
- Roy-Zokan, E.M., C.B. Cunningham, L.E. Hebb, E.C. Mckinney & A.J. Moor. 2015.** Vitellogenin and vitellogenin receptor gene expression is associated with male and female parenting in a subsocial insect. Proc. Biol. Sci., 282, 20150787.
- Salmela, H. & L. Sundström. 2018.** Vitellogenin in inflammation and immunity in social insects. Inflam. Cell Signal., 5:e1506.
- Santos, D.S., A.R.S. Rodrigues, J.B. Torres & R. Lira. 2016.** Performance of *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae) resistant to lambda-cyhalothrin after extended recovery from knockdown. Neotrop. Entomol. 45: 718–724.
- Sappington, T.W. & A.S. Raikhel. 1998.** Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. Insect Biochem. Mol. Biol., 28: 277–300.

- Sappington, T.W., V.A. Kokoza, W.L. Cho, & A.S. Raikhel. 1996.** Molecular characterization of the mosquito vitellogenin receptor reveals unexpected high homology to the *Drosophila* yolk protein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 8934–8939.
- Sarmiento R.A., H.G. Oliveira, A.M. Holtz, S.M. Silva, J.E. Serrão & A. Pallini. 2004.** Fat body morphology of *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae) in function of two alimentary sources. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 47:407-411.
- Sarmiento R.A., Pallini A., Venzon M., Souza F.F., Molina-Rugama A.J., Oliveira C.L. 2007.** Functional response of the predator *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae) to different prey types. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 50:121-126.
- Shpigler H., E. Amsalem, Z.Y. Huang, M. Cohen, A.J. Siegel, A. Hefetz & G. Bloch. 2014.** Gonadotropic and physiological functions of juvenile hormone in Bumblebee (*Bombus terrestris*) workers. *PLoS ONE* 9:e100650.
- Silva, R.B., M.R.G. Fellet, A.C. Redoan, M.L.C. Figueiredo & I. Cruz. 2006.** Aspectos Biológicos de Fases Imaturas de *Eriopis connexa* (Gemar) (Coleoptera: Coccinellidae) Alimentada com Ovos de Presas Naturais e Dietas Artificiais. Embrapa Milho e Sorgo.
- Smykal, V. & A.S., Raikhel. 2015.** Nutritional controlo f insect reproduction. *Insect Sci.*, 11: 31-38.
- Sun, C., L. Hu, S. Liu, Z. Gao, & S. Zhang. 2013.** Functional analysis of domain of unknown function (DUF) 1943, DUF1944 and von Willebrand factor type D domain (VWD) in vitellogenin2 in zebrafish. *Dev. Comp. Immunol.*, 41: 469–476.
- Swevers L. & K. Iatrou. 2009.** Ecdysteroids and ecdysteroid signaling pathways during insect oogenesis. In *Ecdysone: Structures and Functions*, ed. G. Smagghe, 127–64p.
- Tabara, H.; M. Sarkissian; W.G. Kelly; J. Fleenor; A. Grishok; L. Timmons; A. Fire & C.C. Mello. 1999.** The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell.*, 99:123-132.
- Torres, J.B., C.S. Bastos, & D. Pratissoli. 2009.** Controle biológico de pragas com uso de insetos predadores. *Inf. Agropec.* 30: 17-32.
- Trewitt, P.M., L.J. Heilmann, S.S. Degrugillier & A.K. Kumaran. 1992.** The boll weevil vitellogenin gene: nucleotide sequence, structure, and evolutionary relationship to nematode and vertebrate vitellogenin genes. *J. Mol. Evolut.* 34: 478–492.
- Tufail, M., M. Hatakeyama & M. Takeda. 2001.** Molecular evidence for two vitellogenin genes and processing of vitellogenins in the American cockroach *Periplaneta americana*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 48: 72–80.

- Tufail, M., J.M. Lee, M. Hatakeyama, K. Oishi & M. Takeda. 2000.** Cloning of vitellogenin cDNA of the American cockroach, *Periplaneta americana* (Dictyoptera), and its structural and expression analyses. Arch. Insect Biochem. Physiol., 45: 37–46.
- Tufail, M. & M. Takeda. 2002.** Vitellogenin of the cockroach, *Leucophaea maderae*: nucleotide sequence, structure and analysis of processing in the fat body and oocytes. Insect Biochem. Mol. Biol. 32: 117–134.
- Tufail, M. & M. Takeda. 2008.** Molecular characteristics of insect vitellogenins. J. Insect Physiol., 54: 1447-1458.
- Tufail, M., J. Bembenek, A.M. Elgendy & M. Takeda. 2007.** Evidence for two vitellogenin-related genes in *Leucophaea maderae*: the protein primary structure and its processing. Arch. Insect Biochem. Physiol. 66: 190–203.
- Tufail, M. & M. Takeda. 2009.** Insect vitellogenin/lipophorin receptors: molecular structures, role in oogenesis and regulatory mechanisms. J. Insect Physiol., 55: 88-104.
- Tufail, M., Y. Nagaba, A.M. Elgendy & M. Takeda. 2014.** Regulation of vitellogenin genes in insects. Entomol. Sci., 17:269-282.
- Upadhyay, S. K., H. Singh, S. Dixit, V. Mendu, & P.C. Verma. 2016.** Molecular Characterization of Vitellogenin and Vitellogenin Receptor of *Bemisia tabaci*. PLOS ONE, 11: e0155306.
- Wahli, W. 1988.** Evolution and expression of vitellogenin genes. Trends Genet., 4:227-232.
- Wang, L., Y. Zhai, J. Zhu, Q. Wang, X. Ji, W. Wang, H. Yuan, C. Rui & L. Cui. 2023.** Sulfoxaflor adversely influences the biological characteristic of *Coccinella septempunctata* by suppressing vitellogenin expression and predation activity. J. Hazard Mater. 13; 447:130787. doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.130787.
- Wu, Z., L. Yang, A. He & S. Zhou. 2021.** Regulatory mechanisms of vitellogenesis in insects. Front. Cell Dev. Biol., 8:
- Wu, Z., W. Guo, Y. Xie & S. Zhou. 2016.** Juvenile Hormone activates the transcription of cell-division-cycle 6 (Cdc6) for polyploidy dependent insect vitellogenesis and oogenesis. J. Biol. Chem., 291: 5418-5427.
- Wynant, N., D. Santos & J.V. Broeck. 2014.** Biological Mechanisms Determining the Success of RNA Interference in Insects. p.139-167 in International Review of Cell and Molecular Biology, v. 312, ISSN 1937-6448.
- Xiang, M., D. Sang, B. Dong, H. X. Hu, R. Ji, & H. Wang. 2019.** Molecular features and expression patterns of vitellogenin receptor in *Calliptamus italicus* (Orthoptera: Acrididae). J. Insect Sci. 19: 15

- Yaguchi, H., S. Suzuki, N. Kanasaki, Y. Masuoka, R. Suzuki, R.H. Suzuki, Y. Hayashi, S. Shigenobu & K. Maekawa. 2022.** Evolution and functionalization of vitellogenin gene in the termite *Reticulitermes speratus*. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.*, 340:68-80.
- Yang, Z-M., T-Y. Lu, N. Yu, G.M. Xu, Q-Q. Han & Z.W. Liu. 2021.** The importance of vitellogenins receptors in the oviposition of the pond wolf spider, *Pardosa pseudoannulata*. *Insect Sci.*, 29:443-452.
- Yano, K-I., M.T. Sakurai, S. Izumi & S. Tomino. 1994.** Vitellogenin gene of the silkworm, *Bombyx mori*: Structural and sex-dependent expression. *FEBS lett.*, 19:207-211.
- Zhang, F., L. Chen, J. Qin, W. Zhao & P. Wu. 2011.** A novel gene with a vWD domain and three Kazal-type domains: Molecular cloning and expression in the ovary of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. *Russ. J. Genet.* 47: 1052.
- Zhang, T., Y. He, J. Zeng, L. Zhang, F. Zeng, J. Mao & G. Zhang. 2019.** Search for Nutritional Fitness Traits in a Biological Pest Control Agent *Harmonia axyridis* Using Comparative Transcriptomics. *Front. Physiol.* 10:e1148.
- Zhao, S., X. Kong & X. Wu. 2021.** RNAi-based immunity in insects against baculoviruses and the strategies of baculoviruses involved in siRNA and miRNA pathways to weaken the defense. *Dev. Comp. Immunol.*, 122:
- Zhenhui, W., C. Qi, Y. Shuo, Y. Shuoyu, L. Qin, W. Endong, Z. Bo, L.V. Jiale & X. Xuenong. 2022.** Molecular characterization, expression and function on Vitellogenin genes in *Phytoseiulus persimilis*. *Exp. Appl. Acaral.*, 86:343-356.

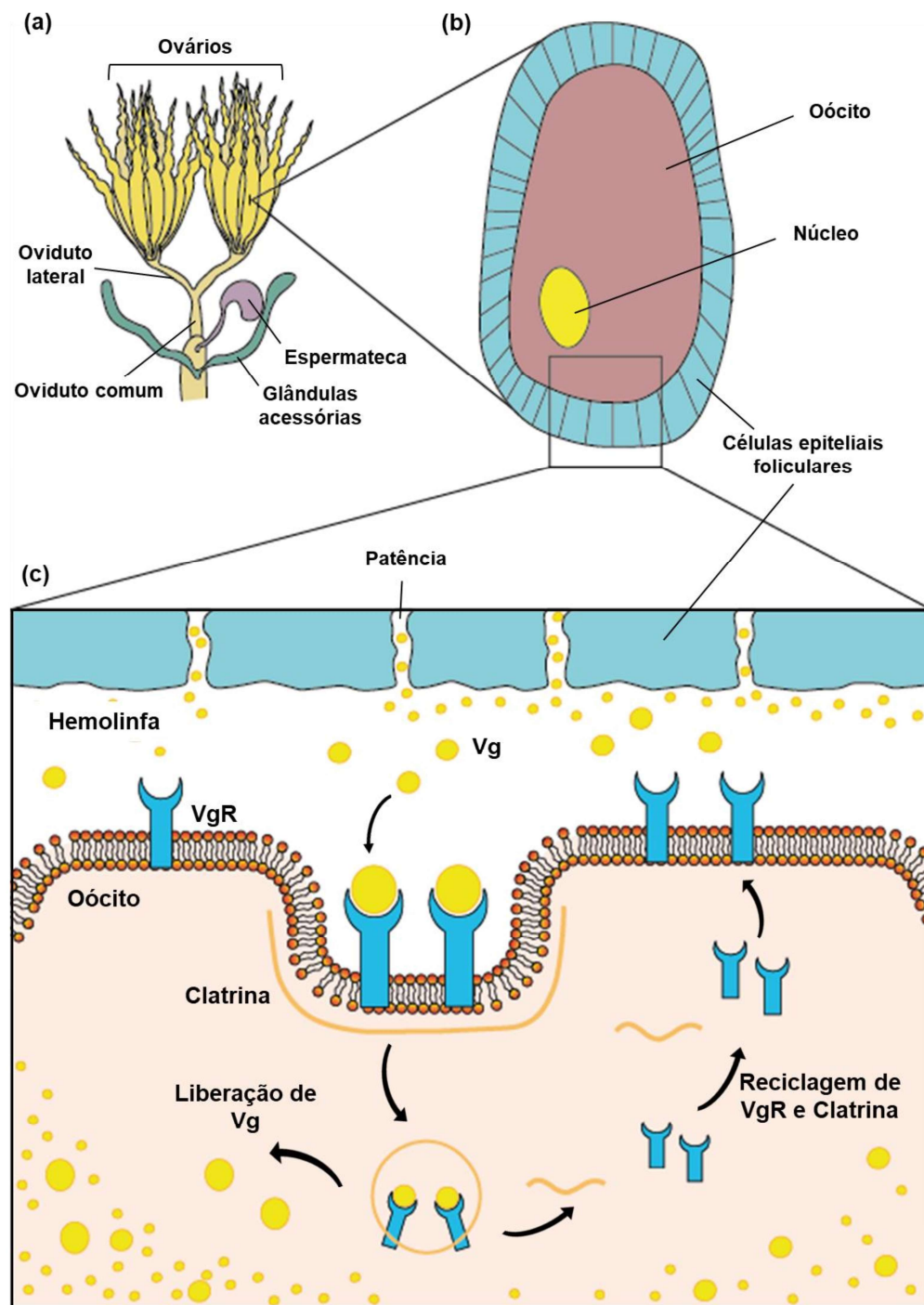


Figura 1. Aparelho reprodutor e captura de Vitelogenina pelo oócito. (a) aparelho reprodutor feminino. (b) Oócito e células foliculares. (c) mecanismo de internalização da Vitelogenina (Vg) mediada por Receptor de Vitelogenina (VgR) e proteínas clatrina.

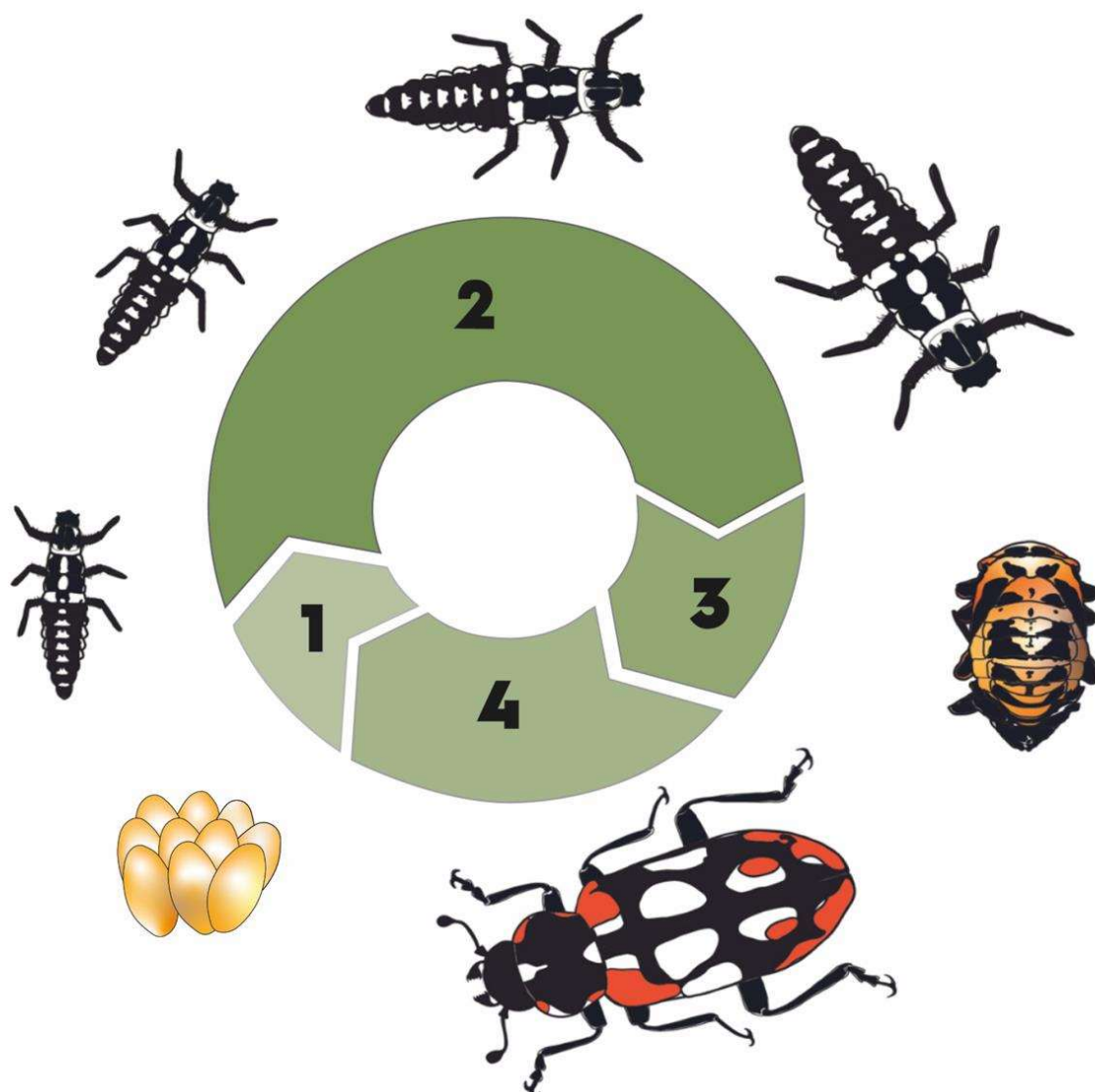


Figura 2. Ciclo de vida de *Eriopis connexa*. (1) Os ovos levam em média de 3 a 5 dias até eclodirem em 2. larvas que passarão por 4 instares de desenvolvimento (média de 14 dias). (3) larvas de 4º instar entram num estágio imóvel (pupa) no qual permanecem até emergirem como adultos (4).

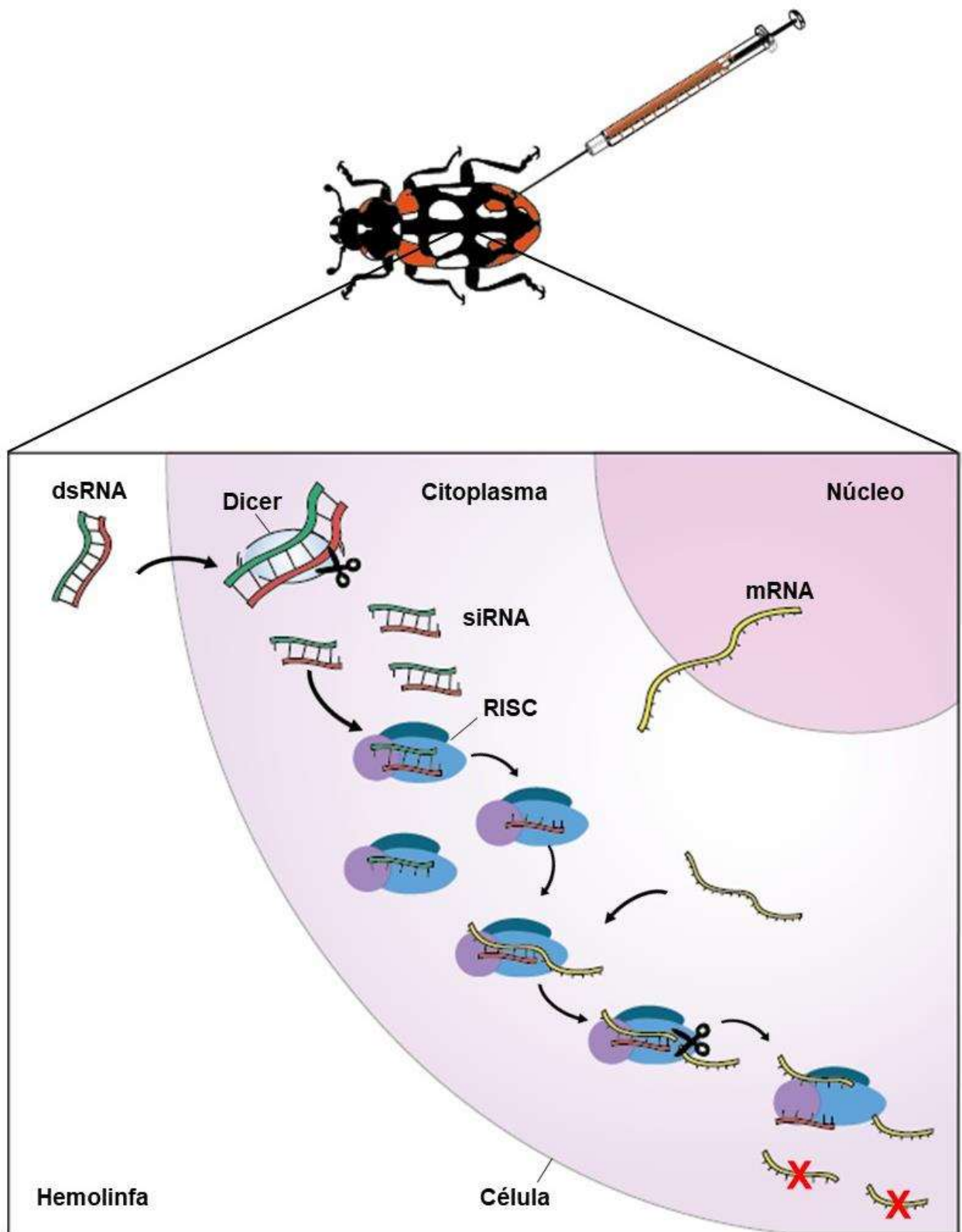


Figura 3. Via do RNA interferente em *Eriopis connexa*. A microinjeção de dsRNAs específicos na hemolinfa do inseto faz com que a via do RNAi seja ativada por meio da internalização da molécula no citoplasma da célula. No citoplasma, o dsRNA microinjetado é reconhecido e clivado pela Dicer em pequenos RNAs de interferência (siRNAs) que serão entregues ao complexo proteico RISC. RISC promove a abertura da dupla fita de siRNA e utilizam a fita antisense (3'-5') para reconhecer e clivar o mRNA alvo. Com a clivagem do mRNA e a produção de extremidades desprotegidas, o RNA será então degradado por enzimas no citoplasma.

CAPÍTULO 2

O SILENCIAMENTO POR RNAi DE AMBAS AS VITELOGENINAS (*EcVg1* e *EcVg2*) E DE SEU RECEPTOR (*EcVgR*) DIMINUI A VIABILIDADE, MAS NÃO A QUANTIDADE DE OVOS DEPOSITADOS PELA JOANINHA *Eriopsis connexa* ¹

IANNE C. DA S. NOBRE¹

¹Departamento de Agronomia – Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, 52171-900, Recife, PE, Brasil.

¹[Ianne C. da S. Nobre. O silenciamento por RNAi de *EcVgR* e de ambas as vitelogeninas (*EcVg1* e *EcVg2*) diminuem a viabilidade, mas não a quantidade de ovos depositados pela joaninha *Eriopsis connexa*. A ser submetido.

RESUMO - A tecnologia do RNA interferente (RNAi) é uma ferramenta molecular que têm auxiliado a desvendar a função de genes nos mais variados organismos. Em insetos, a grande maioria dos trabalhos tem se voltado para insetos-praga. Todavia, validar esta ferramenta em inimigos naturais pode ser importante para compreender processos fisiológicos, biológicos e ecológicos, contribuindo para a conservação ou potencialização dos inimigos naturais no manejo de pragas. Assim, buscou-se validar a técnica do RNAi em *Eriopis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae), uma joaninha predadora afidófaga. Foram escolhidos como alvo de estudo as principais proteínas responsáveis pela reprodução em insetos: a Vitelogenina (Vg) e seu receptor (Receptor de Vitelogenina – VgR). Com isso, dois genes de Vg (*EcVg1* e *EcVg2*) e um gene de VgR (*EcVgR*) foram identificadas em um transcrito de abdômen de adultos (dados não publicados) de *E. connexa*. A análise dos domínios nas proteínas preditas e as relações filogenéticas com ortólogos de outros organismos confirmaram a identidade destes genes. Posteriormente, verificou-se que a expressão dos três genes é dependente da idade da fêmea e vai aumentando à medida que a atinge maturação sexual (de 5 a 8 dias após a emergência). Além disso, fêmeas alimentadas com pulgões tiveram aumento na expressão de *EcVg1*, mas não de *EcVg2*. Por fim, o silenciamento de *EcVgR* diminuiu consideravelmente a viabilidade dos ovos, mas não a quantidade. Por outro lado, apenas quando ambos os genes *EcVg* são silenciados é que se obtém ovos inviáveis. Portanto, além de validar a técnica de RNAi, os dados obtidos confirmaram a importância da vitelogenina na reprodução de *E. connexa*. A validação do RNAi em inimigos naturais, como *E. connexa*, fornece uma excelente ferramenta molecular que poderá auxiliar em estudos que permitam a melhorar a atuação e a conservação dos inimigos naturais dentro do manejo integrado de pragas.

PALAVRAS-CHAVE: dsRNA, RT-qPCR, reprodução, inimigo natural, nutrição.

THE RNAi KNOCKDOWN OF BOTH VITELLOGENINS (*EcVg1* and *EcVg2*) AND
THEIR RECEPTOR (*EcVgR*) REDUCES THE VIABILITY BUT NOT THE NUMBER
OF EGGS LAID BY THE LADYBIRD *Eriopis connexa*

ABSTRACT – The RNA interference (RNAi) technology is a molecular tool that has aided in unraveling the function of genes in various organisms. In insects, most studies have focused on pest insects. However, validating this tool in natural enemies can be important for understanding physiological, biological, and ecological processes, contributing to the conservation or enhancement of natural enemies in pest management. Thus, we sought to validate the RNAi technique in *Eriopis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae), a predatory ladybird beetle. The main proteins responsible for reproduction in insects, Vitellogenin (Vg) and its receptor (Vitellogenin Receptor - VgR), were chosen as targets for study. Two Vg genes (*EcVg1* and *EcVg2*) and one VgR gene (*EcVgR*) were identified in an abdomen transcriptome of adults (unpublished data) of *E. connexa*. Analysis of predicted protein domains and phylogenetic relationships with orthologs from other organisms confirmed the identity of these genes. Subsequently, it was found that the expression of the three genes is age-dependent in females and increases as they reach sexual maturation (from 5 to 8 days after emergence). Furthermore, females fed with aphids showed increased expression of *EcVg1* but not *EcVg2*. Finally, silencing of *EcVgR* considerably decreased egg viability but not quantity. On the other hand, only when both *EcVg* genes are silenced do we obtain inviable eggs. Therefore, in addition to validating the RNAi technique, the obtained data confirmed the importance of vitellogenin in the reproduction of *E. connexa*. The validation of RNAi in natural enemies, such as *E. connexa*, provides an excellent molecular

tool that can assist in studies aimed at improving the performance and conservation of natural enemies within integrated pest management.

KEY WORDS: dsRNA, RT-qPCR, reproduction, natural enemy, nutrition.

Introdução

Eriopis connexa (Germar) é uma joaninha predadora que se alimenta preferencialmente de pulgões (Sarmiento *et al.* 2007). Devido a sua voracidade em predar ativamente diversos insetos considerados praga, esta joaninha é tida como excelente agente de controle biológico (Fogel *et al.* 2016). Em acréscimo, Fogel *et al.* (2016) sugerem que a presença deste inimigo natural num agroecossistema pode integrar programas de manejo e proporcionar a redução do uso de inseticidas. Contudo, para que o uso desta joaninha possa ter impacto nas populações de insetos praga de modo a ser utilizada em programas de controle biológico, é importante conhecer melhor seus aspectos biológicos e fisiológicos, inclusive sua reprodução, para se poder incrementar a criação em laboratório para futuras liberações massais em campo.

O ciclo de vida completo desta espécie dura, aproximadamente, 21 dias, com estágios de ovo, larva, pupa e adulto (Silva *et al.* 2006). Assim como em outros insetos, a reprodução de *E. connexa* depende principalmente da produção de uma proteína chamada Vitelogenina (Vg). Vitelogeninas são glicolipoproteínas essenciais à nutrição e desenvolvimento de embriões (Nation *et al.* 2016), cuja estrutura é bem conservada em Insecta, mas também entre Insecta e outros grupos (Wahli 1988, Sappington & Raikhel 1998, Zhenhui *et al.* 2022). Nos insetos, a transcrição do gene *Vg* nas células do corpo gorduroso está sobre regulação nutricional e hormonal (Wahli 1988, Tufail & Takeda 2008, Smykal & Raikhel 2015, Roy *et al.* 2018), o que já foi demonstrado em várias famílias, como Coccinellidae (Bonte *et al.* 2010), Tenebrionidae (Parthasathy *et al.* 2010, Parthasarathy & Palli 2011), Acricidae (Wu *et al.* 2016), Tephritidae (Chen *et al.* 2022), e outros (Tufail & Takeda 2014). Após ser expressa no corpo gorduroso, Vg precisa ser secretada na hemolinfa, direcionada até os ovários e ser exposta à membrana do oócito onde se ligará ao seu receptor (Receptor de Vitelogenina ou VgR), que mediará sua internalização junto com proteínas do tipo clatrina (Nation *et al.* 2016).

Os Receptores de Vitelogenina são proteínas comumente associadas à membrana de oócitos cuja função principal é promover a absorção de Vg (Tufail & Takeda 2009, Nation *et al.* 2016). A proteína traduzida de *VgR* possui diversos domínios funcionais que auxiliam em sua função (Tufail & Takeda 2009). Seu papel para a internalização de Vg nos oócitos já foi demonstrado em estudos utilizando a tecnologia do RNA de interferência (RNAi) (Upadhyay *et al.* 2016, Han *et al.* 2022a, Han *et al.* 2022 b) e, como resultado, estes autores observaram que o silenciamento de *VgR* não apenas provocou a diminuição no número de ovos, mas também promoveu a produção de ovos inférteis.

Devido ao potencial de uso de genes envolvidos na reprodução como alvos específicos para silenciamento visando o controle de espécies consideradas pragas (Wu *et al.* 2021), grande parte dos esforços para entender a função de Vg e VgR em insetos focaram em pragas e vetores de doenças, como *Aedes aegypti* (Raikhel & Lea 1983), *Tribolium castaneum* (Parthasathy *et al.* 2010), *Bemisia tabaci* (Upadhyay *et al.* 2016), *Laodelphax striatellus* (Hou *et al.* 2019), *Zeugodacus cucurbitae* (Chen *et al.* 2022), *Spodoptera frugiperda* (Han *et al.* 2022a), entre outros. Contudo, estudar a função destes genes em inimigos naturais é fundamental para a compreensão dos processos moleculares que guiam a reprodução nestes organismos e assim poder promover o desenvolvimento de metodologias que possam preservá-los de forma mais eficiente ou até mesmo potencializar sua atuação (Han *et al.* 2022b).

Uma das formas de estudar a função de um gene é através da tecnologia do RNA interferente ou RNA de interferência (RNAi) (Fire *et al.*, 1998). O RNAi é um mecanismo molecular conservado em todos os eucariotos que têm como principais atores, a enzima Dicer e o complexo proteico RISC, que em ação coordenada e sequencial a partir de uma RNA dupla

fita (dsRNA), promovem a degradação de RNAs mensageiros (mRNA) com identidade a sequência de dsRNA (Fire *et al.* 1998, Wynant, Santos & Broeck 2014).

Além do mais, apesar do potencial de *E. connexa* como agente de controle biológico, trabalhos realizados demonstraram que o tipo de alimentação pode influenciar a sua reprodução (Sarmiento *et al.* 2004). Sendo assim, a validação da via do RNAi juntamente com a caracterização molecular de gene envolvido na reprodução nesta joaninha predadora poderá proporcionar o desenvolvimento de ferramentas para sua preservação e até mesmo multiplicação em laboratório para liberação massal. Por isso, neste trabalho foi feita a identificação e validação funcional de dois genes *Vg* e um *VgR* de *E. connexa* por RNAi. Além disso, foram caracterizados os padrões de expressão destes genes ao longo do tempo, durante o início da fase adulta das fêmeas e a influência do tipo de alimento na expressão de *Vgs*. Os resultados obtidos mostram que ambas as *Vgs* e *VgR* são essenciais para a reprodução de *E. connexa*.

Material e Métodos

Criação do Inseto em Laboratório. Larvas e adultos de *Eriopis connexa* foram mantidos em ambiente controlado com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas no Laboratório de Controle Biológico de Insetos da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A alimentação das larvas se deu pela oferta de ovos de *Anagasta* (= *Ephestia*) *kuehniella* até a chegada do estágio pupal. Já os adultos foram mantidos tanto com ovos de *A. kuehniella* quanto uma mistura de mel e levedura (1:1), assim como oferta periódica de pulgões.

Análises *in silico* e relações filogenéticas das sequências de *Vg1*, *Vg2* e *VgR* de *E. connexa*.

As sequências dos genes de vitelogenina (*Vg*) e receptor de vitelogenina (*VgR*) de *E. connexa*

foram buscadas utilizando sequências de *Vg* e *VgR* de *Tribolium castaneum* (coleóptero modelo), com o algoritmo tBlastN em um transcrito de abdômen de *E. connexa* (dados não publicados), utilizando o software BioEdit (Versão 7.2.5). As ORFs (Open Reading Frame – Matriz de leitura aberta) e proteínas preditas foram identificadas na plataforma OrfFinder (NCBI). Os *contigs* identificados foram confirmados através do algoritmo blastP comparando com o banco nr do GenBank (NCBI). Os *contigs* identificados que não resultaram em ORFs completas (*contigs* incompletos), foram ordenados e montados por meio de alinhamento com as sequências dos mesmos genes de *Harmonia axyridis* (Primeira sequência recuperada no GenBank por BlastP). As proteínas preditas foram utilizadas para identificação de domínios funcionais na plataforma CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?>) e HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>). Além disso, a identificação de peptídeos sinal e domínios transmembrana foram realizadas no Phobius (<https://phobius.sbc.su.se/>), e os peptídeos sinal confirmados no SignalP v6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP>).

Para análise filogenética, inicialmente foram recuperadas, a partir das sequências identificadas, sequências dos mesmos genes de outros insetos (34 para Vitelogenina e 39 para Receptor de Vitelogenina) utilizando o algoritmo BlastP. O alinhamento foi realizado utilizando o algoritmo MUSCLE no programa MEGA 11 (Versão 11.0.13) e a árvore construída pelo método de máxima verossimilhança (ML) na plataforma PhyML 3.0 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>).

Análise de expressão dos genes de *Vg* e *VgR* em fêmeas de idades diferentes por RT-qPCR. Para investigar a expressão dos três genes selecionados envolvidos na reprodução e correlacionar com a maturidade sexual, fêmeas de *E. connexa* foram coletadas em 2, 5 e 8 dias após a emergência (DAE). Para cada amostra (idade), as extrações foram feitas em 3 repetições

biológicas, contendo um mix de 3 fêmeas por repetição. O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, EUA) seguindo as especificações do fabricante. As amostras contendo RNA foram quantificadas utilizando NanoDrop™ (Thermo-Fisher, EUA) e a integridade analisada por eletroforese em gel de agarose 1%. Posteriormente, 1,5 µg de RNA foi tratado com a Ambion™ DNase I (Invitrogen, EUA) para remover o DNA contaminante, seguindo as recomendações do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando iScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad, EUA) e armazenado a -20°C até o uso. A confirmação da síntese de cDNA foram avaliados por PCR convencional, utilizando primers que amplificam fragmentos dos genes de interesse ([Tabela 1](#)). Para realização da RT-qPCR foi utilizado o termociclador QuantStudio 5 (Thermo-Fisher, EUA) fazendo uso de primers específicos, próprios para qPCR, para cada gene (Tabela 1) e o kit GoTaq qPCR Mix (Promega, EUA) em condições padrão de ciclagem do termociclador. Também foi realizada curva de “melting” para cada amplicon para detectar formação de dímero de primers ou possíveis contaminações. Além disso, cada reação foi feita em duplicata técnica, e controle negativo contendo água para qPCR em vez de cDNA, para cada par de primer utilizado. Primers específicos para os genes *GAPDH*, *β-Tubulina*, *RPS10* e *eEF-1α* foram utilizados para determinar os melhores genes normalizadores, ou seja, os mais estáveis. As análises de melhores genes normalizadores e de expressão foram realizadas no software SATQPCR (Rancurel *et al.* 2019). A expressão foi calculada utilizando o método de $\Delta\Delta C_t$ (Livak & Schmittgen 2001).

Análise de expressão dos genes de *Vg* em *E. connexa* de acordo com a dieta. Para investigar a influência da alimentação na expressão de *EcVgR*, *EcVg1* e *EcVg2*, bioensaios de alimentação foram montados para dois tratamentos: (i) indivíduos que não se alimentaram de afídeos nem durante a fase de larva e nem durante a fase adulta, e (ii) indivíduos que se

alimentaram de afídeos tanto na fase de larvas como na fase adulta. Nove fêmeas de cada tratamento foram coletadas no quinto dia após a emergência para extração de RNA total, síntese de cDNA e análise de expressão por RT-qPCR, conforme descrito anteriormente. Cada amostra foi composta de um conjunto de 3 fêmeas por tratamento, resultando em três repetições biológicas para cada tratamento. A RT-qPCR foi realizada conforme descrita anteriormente utilizando *β-Tubulina* e *eEF-1α* como genes normalizadores. Os fenótipos dos adultos decorrentes do tipo de alimentação (tratamento) foram observados em esteromicroscópio Zeiss Stemi 508 e fotografados com uma câmera Nikon D3200.

Síntese de dsRNA. A síntese dos dsRNAs foi realizada a partir do processo de transcrição *in vitro*, utilizando o kit MEGAscript™ T7 transcription (Thermo Fisher, EUA). Inicialmente, fragmentos de 500-600 pb foram amplificados com primers específicos para cada gene (1º round de amplificação). Em seguida, utilizando como molde o produto do 1º round, foi amplificado o molde para síntese do dsRNA contendo os primers acrescentados da sequência mínima do promotor T7. Como controle foram utilizadas duas moléculas de dsRNA inespecíficas. Uma foi sintetizada, conforme mencionado anteriormente, a partir de um fragmento do gene *AgraCE8.1*, uma pectina-metil-esterase do bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), que não possui ortólogos em indivíduos da família Coccinelidae. A outra, um fragmento da Proteína Verde Fluorescente (*GFP*), foi adquirido da empresa agroRNA (Coreia do Sul).

Silenciamento gênico do Receptor de Vitelogenina de *E. connexa* por RNAi. Inicialmente, foi necessário determinar as melhores condições para os bioensaios de microinjeção em fêmeas de *E. connexa*. Como ponto de partida utilizamos as condições previamente estabelecidas no coleóptero *A. grandis* (Firmino *et al.* 2013), pelo fato dos insetos apresentarem tamanho e peso aproximados. Para testar a concentração ideal de dsRNA

necessário para silenciar o receptor de Vitelogenina em *E. connexa* (*EcVgR*), 1µL de *dsEcVgR* em diferentes concentrações (100, 500, e 1000 ng) foi microinjetado no dorso do abdômen de fêmeas com 5 dias após a emergência, usando uma seringa do tipo Hamilton 10µL. Como controle, foi microinjetado 1µL de água livre de RNase (controle negativo – “Mock”) e 1µL de *dsAgCE8.1* a 500 ng/µL (controle de dsRNA não específico). Neste estudo inicial, 45 fêmeas foram utilizadas (9 fêmeas por tratamento, divididas em três repetições biológicas com cada amostra contendo 3 fêmeas). 48 horas após as microinjeções, prosseguiu-se com extrações de RNA de todo o corpo, síntese de cDNA e RT-qPCR como descrito anteriormente.

Posteriormente, para avaliar o efeito da diminuição de expressão de *EcVgR* na reprodução de fêmeas de *E. connexa*, 1µL de *dsEcVgR* contendo 500 ng de dsRNA foi novamente microinjetado no abdômen de fêmeas com 5 DAE a fim de estudar o padrão de expressão dos genes relacionados a reprodução (*EcVgR*, *EcVg1* e *EcVg2*), bem como acompanhar a biologia da reprodução do inseto observando o número de ovos ovipositados, a viabilidade dos ovos, e mortalidade das fêmeas. Para análise de expressão dos genes, 48 horas após as microinjeções, 9 fêmeas (3 repetições biológicas contendo três fêmeas cada) por tratamento foram utilizadas para extração de RNA total, síntese de cDNA e RT-qPCR como descrito anteriormente. Os bioensaios de oviposição e viabilidade dos ovos foram montados com as demais fêmeas microinjetadas com água (Mock), *dsAgCE8.1* 500 ng e *dsEcVgR* 500ng. As fêmeas microinjetadas foram pareadas com machos não tratados e os casais individualizados em copos plásticos com tampa, de tal forma que pelo menos 15 casais por tratamento foram formados e acompanhados por 15 dias nas mesmas condições da criação normal dos insetos. Fêmeas que morreram até 48 horas após as microinjeções foram substituídas e as que morreram após a montagem dos casais foram anotadas como mortalidade. Casais que não apresentaram postura de ovos até o final do período de observação foram

dissecados para confirmação dos sexos. Na análise estatística, casais que não colocaram ovos foram desconsiderados. O fenótipo dos ovos foi observado utilizando uma lupa Nikon AZ100 Multizoom (Nikon Instruments Inc.) e fotografado com uma câmera de microscópio digital Jenoptik ProgRes® CT5 com intermédio do programa ProgRes CapturePro (Versão 2.8.8).

Silenciamento gênico de *EcVg1* e *EcVg2* em *E. connexa* por RNAi. Para analisar o efeito de *EcVg1* e *EcVg2* na reprodução de fêmeas de *E. connexa*, 1 µL de ds*EcVg1* 500ng e 1 µL ds*EcVg2* 500ng foram microinjetados no abdômen de fêmeas de 5 DAE. Como controle foram utilizados 1 µL de água livre de RNase (Mock) e 1 µL de ds*GFP* 500ng (controle dsRNA não-específico). Decidiu-se utilizar o ds*GFP* em vez de ds*AgCE8.1* devido ao efeito na oviposição provocado por este dsRNA no experimento anterior. Ao final de 48 horas após as microinjeções, 9 fêmeas por tratamento (divididas em três fêmeas por amostra) foram utilizadas para extração de RNA, síntese de cDNA e RT-qPCR, como descrito anteriormente.

Ainda para estudar o efeito do silenciamento de *EcVg1* e *EcVg2* na biologia reprodutiva de fêmeas de *E. connexa*, bioensaios com fêmeas microinjetadas com água (Mock), ds*GFP*, ds*EcVg1* e ds*EcVg2*, todos a 500ng. Após 48 horas da microinjeção, cada fêmea foi pareada com um macho não tratado e o casal individualizado em copos plásticos com tampa nas mesmas condições da criação de manutenção dos insetos. Foram montados pelo menos 15 casais por tratamento, que foram acompanhados por 15 dias para observação do número de ovos depositados, viabilidade dos ovos e mortalidade das fêmeas. Casais que não apresentaram postura até o final do período de análise foram dissecados para confirmação dos sexos e não contabilizados para análise estatística. O fenótipo dos ovos foi observado utilizando um esteromicroscópio Zeiss Stemi 508, fotografados com uma câmera Nikon D3200.

Análise estatística. Os parâmetros biológicos de todos os tratamentos foram avaliados estatisticamente por Análise de variância (ANOVA), as médias comparadas pelo teste t e de Tukey a $P \leq 0,05$. As análises de RT-qPCR foram avaliadas utilizando o programa SATQPCR (<http://satqpcr.sophia.inra.fr/cgi/home.cgi>).

Resultados

Análises das sequências de *EcVg1*, *EcVg2* e *EcVgR*. A busca pela sequência de Vitelogenina (*Vg*) no transcriptoma de *Eriopsis connexa* revelou que esta espécie possui dois genes para *Vg*, denominados *EcVg1* e *EcVg2*. A sequência parcial para *EcVg1* possui um total de 5.278 nucleotídeos (nt), divididos em dois *contigs*, que codificam uma proteína de 1757 aminoácidos (aa) ([Fig. 1a](#)). A proteína predita *EcVg1* apresenta os domínios funcionais característicos para *Vg*: Vitelogenina_N (região amino terminal da lipoproteína) e Vitelogenina_open_β (Vitelogenina folha β aberta) ([Fig. 1b](#)). Já a sequência parcial de *EcVg2* possui 2.565 nt, dividida em três *contigs*, codificando uma proteína parcial de 1741 aa ([Fig. 1a](#)). *EcVg2* apresenta os domínios funcionais de Vitelogenina_N, Vitelogenina_open_β e o fator tipo D de von Willebrand (VWD) ([Fig. 1b](#)). Como esperado, *E. connexa* apresenta apenas uma cópia do gene do *Receptor de Vitelogenina* (doravante chamado *EcVgR*), e este possui 5.919 nt codificando uma proteína completa de 1.777 aa. A proteína predita para *EcVgR* possui 13 domínios funcionais do receptor de lipoproteína de baixa densidade classe a (LDL_a), dois domínios do receptor de lipoproteína de baixa densidade classe b (LDL_b), um domínio de ligação ao Cálcio (EGF_Ca) e um complemento semelhante a Clr-EGF (cEGF) ([Fig. 1b](#)).

A análise filogenética de *EcVg1*, *EcVg2* ([Fig. 2a](#)) e *EcVgR* ([Fig. 2b](#)) mostrou que estas se agrupam com 100% de similaridade com Vitelogeninas e Receptores de Vitelogenina, respectivamente, de insetos da ordem Coleoptera, especificamente na família Coccinellidae.

A análise ainda evidenciou que *EcVg1* e *EcVg2* se agrupam diferencialmente em Coccinellidae indicando alta similaridade entre *EcVg1*, *Vg1* de *Harmonya axyridis* e *Vg* de *Coccinella septempunctata*, bem como uma alta semelhança entre *EcVg2* e *Vg2* de *H. axyridis*. Essa semelhança indica que provavelmente o gene de *Vg* foi duplicado no ancestral comum dos Coccinellidae.

Expressão dos genes *EcVgR*, *EcVg1* e *EcVg2* em fêmeas de *E. connexa* de diferentes idades. A análise de expressão por RT-qPCR dos genes *EcVgR*, *EcVg1* e *EcVg2* em fêmeas de 2, 5 e 8 dias após a emergência (DAE) ([Fig. 3](#)) mostrou que estes são minimamente expressos em 2 e mais expressos em 8 DAE, como esperado. Os resultados obtidos ainda evidenciaram que, em *EcVgR*, a diferença entre a quantidade relativa de transcritos é significativa apenas entre 2 e 8 DAE, representando um aumento de aproximadamente 6 vezes ($F_{2,6} = 9,38$; $P=0,014$). Da mesma forma, *EcVg1* apresentou um aumento significativo de aproximadamente 21 vezes também no oitavo dia após a emergência ($F_{2,6}=13,21$; $P=0,006$). Finalmente, para *EcVg2*, a maior expressão foi em fêmeas com 8 DAE, sendo significativamente diferente de 2 e 5 DAE ($F_{2,6}=15,48$; $P=0,004$). *EcVg2* em fêmeas de 8 DAE foi 11,4 e 2,5 vezes mais expresso que em fêmeas de 2 e 5 DAE, respectivamente.

Expressão de *EcVg1* e *EcVg2* conforme a dieta de *E. connexa*. Indivíduos alimentados com pulgão expressam um fenótipo que se diferencia dos que nunca se alimentaram com pulgão pela tripla coloração: corpo preto com manchas nas cores branca e laranja. Indivíduos que não se alimentam de afídeos não expressam as manchas laranja ([Fig. 4a](#)). Um aumento significativo na quantidade relativa de transcritos de *EcVg1*, em fêmeas que se alimentaram de afídeos na fase adulta em comparação a fêmeas que nunca se alimentaram de pulgão foi observado ($P<0,05$) ([Fig. 4b](#)). Em contrapartida, não houve diferença significativa na quantidade relativa de *EcVg2* entre tratamentos analisados ($P>0,05$).

O Silenciamento de *EcVgR* inviabiliza os ovos, porém não diminui a oviposição em fêmeas de *E. connexa*. Inicialmente, para os ensaios de silenciamento gênico por RNAi, dsRNAs foram sintetizados (Fig. 5a). Foi observado que apesar da expressão de *EcVgR* diminuir numericamente de acordo com a dose de ds*EcVgR* utilizada, as reduções não são significativas entre si, porém são significativas em comparação ao controle com ds*AgCE8.1* (Fig. 6a, $F_{3,8}=9,69$; $P=0,0048$). Desta forma, decidiu-se utilizar a dose de 500 ng para os demais experimentos. Adicionalmente foi verificado que o dsRNA para *EcVgR* não interfere na expressão nem de *EcVg1* ($P=0.14$) nem de *EcVg2* ($P=0.22$) quando comparados com o tratamento ds*AgCE8.1* (Fig. 6b). Nenhuma das fêmeas microinjetadas com ds*EcVgR* morreu.

Além disso, o tratamento com ds*EcVgR* não afetou o número de ovos postos quando comparado ao tratamento controle (Mock) (Fig. 6c). Porém, o tratamento ds*AgCE8.1* resultou em um número de ovos menor do que os tratamentos controle (Mock) e ds*EcVgR* (Fig. 6c, $F_{2,43}=5,35$; $P=0,008$), mesmo sem alterar a expressão de *EcVgR*, *EcVg1* ou *EcVg2* (Fig. 6b).

Já a viabilidade dos ovos postos por fêmeas tratadas com ds*EcVgR* foi significativamente menor que aquelas apresentada por fêmeas tratadas com água ou ds*AgCE8.1* (Fig. 6d, $F_{2,44}=10,34$; $P<0,001$), com uma média de viabilidade em torno de 9% e mediana no valor 0. Por fim, os fenótipos observados nos ovos mostraram que não existe diferença aparente na morfologia entre os controles (Mock e ds*AgCE8.1*), porém, ds*EcVgR* produz um padrão de ovos deformados (Fig. 6e).

Em se tratando do gene de vitelogenina, apenas o silenciamento de ambos os genes é capaz de inviabilizar os ovos de *E. connexa*. Surpreendentemente, apesar de se escolher uma região com menor similaridade entre os dois genes de *Vg* de *E. connexa* para a produção dos dsRNAs (Fig. 5b), o ds*EcVg2* foi capaz de silenciar ambos os genes *EcVg1* ($F_{2,6}=96,11$;

$P=0,00002$) e *EcVg2* ($F_{2,6}=7,33$; $P=0,024$) de forma significativa, diferente de *dsEcVg1* que silenciou apenas *EcVg1* (Figs. 7a e 7b).

Em nenhum tratamento o número de ovos depositados por fêmea foi diferente significativamente (Fig. 7c, $H=2,78$; g.l.=3, $P=0,43$). Entretanto, a viabilidade dos ovos em fêmeas tratadas com *dsEcVg2* foi bastante afetada. Neste grupo, apenas 1,22% dos ovos totais foram viáveis, o que fez diferenciá-lo de todos os demais tratamentos (Fig. 8d, $H=20.003$, g.l.=3, $P<0,001$). A viabilidade dos ovos depositados por fêmeas tratadas por *dsEcVg1* foi bastante variável, porém não diferente dos tratamentos controle (Fig. 7d). De forma interessante, após a montagem dos casais, no grupo tratado com *dsEcVg1* morreram 6 fêmeas em 18 (33,3%) e em *dsEcVg2*, 3 em 15 (20%). Nenhuma fêmea tratada com água (Mock) ou *dsGFP* morreu. Finalmente, não houve diferença aparente na morfologia dos ovos de fêmeas tratadas com *dsEcVg1*, mas fêmeas tratadas com *dsEcVg2* pareceram produzir ovos ligeiramente menores (Fig. 7e).

Discussão

A Vitelogenina é fundamental para a reprodução de insetos (Wahli 1988, Nation *et al.* 2016). Por isso, identificar, caracterizar e validar a expressão deste gene em inimigos naturais é crucial para o entendimento dos processos moleculares que guiam a reprodução desses organismos e incrementar novas estratégias no manejo de pragas. A joaninha predadora *Eriopis connexa* fornece um excelente serviço ecológico a diversas culturas uma vez que promovem a supressão de populações de afídeos e outras pragas (Sarmiento *et al.* 2004 e 2007, Fogel *et al.* 2016). Contudo, apesar de sua importância, este foi o primeiro estudo sobre os mecanismos moleculares que promovem a reprodução nesta espécie.

Em um banco de dados de transcritos próprio de *E. connexa*, dois genes *Vg* foram encontrados e denominados *EcVg1* e *EcVg2*. Apesar de muitos insetos apresentarem apenas uma cópia de *Vg* (Upadhyay *et al.* 2016, Hou *et al.* 2019, Wang *et al.* 2023), duplicações não são um evento raro e pode acontecer tanto em insetos (Wahli 1988, Tufail & Takeda 2008) quanto em outros artrópodes (Yang *et al.* 2021, Zhenhui *et al.* 2022). Corroborando com nosso resultado, duas cópias de *Vg* também já foram registradas para o besouro *Nicrophorus vespilloides* (Ray-Zokan *et al.* 2015) e o percevejo *Cimex lectularius* (Moriyama *et al.* 2016). Em acréscimo, pelo menos quatro cópias deste gene são encontradas no cupim *Reticulitermes speratus* (Yaguchi *et al.* 2022) e no díptero *Zeugodacus cucurbitae* (Chen *et al.* 2022). Por outro lado, existe apenas um *VgR* em *E. connexa* assim como na maioria dos insetos (Tufail & Takeda 2009).

Os motivos pelos quais duplicações de *Vg* acontecem ainda são um mistério. Alguns estudos sugerem a não redundância de função entre as repetições analisado (Amdam *et al.* 2003, Nelson *et al.* 2007, Salamela & Sundstrom 2018). Por exemplo, em *N. vespilloides*, *Vg* parece influenciar o cuidado parental exercido por machos e fêmeas (Roy-Zokan *et al.* 2015). Em *R. speratus*, o gene *RsVg4* aparenta estar envolvido na subdivisão de castas já que foi majoritariamente expresso em operárias e fêmeas não reprodutivas (Yaguchi *et al.* 2022). Além do mais, o estudo filogenético realizado para esta espécie de cupim mostrou que, apesar de semelhantes, a proteína traduzida de *RsVg4* não agrupou com as demais *RsVgs*. Em contrapartida, em baratas e no percevejo-das-camas, duplicações em *Vg* são redundantes e desempenham papel fundamental na reprodução (Tufail & Takeda 2008 e 2014, Moriyama *et al.* 2016). No presente estudo, a análise filogenética confirmou que as sequências preditas para *E. connexa* possuem homologia com *Vgs* e *VgRs* de outros insetos. Ficou evidenciado ainda que *EcVg1* e *EcVg2* são distintos uma vez que se agruparam

diferencialmente em Coccinellidae. Todavia, em relação as possíveis funções desempenhadas por estes genes, este trabalho limitou-se apenas ao estudo das funções reprodutivas.

A análise dos domínios funcionais de EcVg1 e 2 revelou que EcVg2 possui os domínios comuns às vitelogeninas, ao contrário de EcVg1, onde o fator tipo D de von Willebrand (VWD) não pôde ser identificado. Entretanto, isto pode ser devido aos poucos aminoácidos faltantes na sequência, o que poderia ter resultado no não reconhecimento do domínio VWD pelo algoritmo de análise de domínios. Na joaninha *H. axyrdis*, o coccinelídeo que demonstrou maior similaridade com *E. connexa* quanto as sequências de Vg, os três domínios funcionais característicos então presentes tanto em *HaVg1* quanto em *HaVg2* (Zhang *et al.* 2017, Liang *et al.* 2019). O papel exato desempenhando por VWD na estrutura de Vg ainda não é conhecido, mas parece diferir entre reprodução e imunidade, conforme o organismo (Zhang *et al.* 2011, Sun *et al.* 2013, Leipart *et al.* 2022). Na abelha *Apis mellifera*, um estudo de modelagem de Vg sugeriu que VWD é um potencial local de ligação ao VgR e que também pode contribuir para o sistema imunológico deste himenóptero. Já no camarão oriental *Macrobrachium nipponense*, VWD tem função crítica na maturação dos oócitos (Zhang *et al.* 2011). De qualquer forma, é plausível afirmar que a perda deste domínio por EcVg1 pode representar um custo à reprodução caso seu precursor ainda esteja associado aos processos reprodutivos. Em EcVg2 os domínios Vitelogenina_N, Vitelogenina_open_β e VWD estão presentes, assim como na estrutura proteica de Vg de lepidópteros (Upadhyay *et al.* 2016, Han *et al.* 2022a), neurópteros (Liu, Mao & Zeng 2015), cupins (Yaguchi *et al.* 2022), dípteros (Chen *et al.* 2022), hemípteros (Moriyama *et al.* 2016), himenópteros (Leipart *et al.* 2022) e outros coleópteros (Wang *et al.* 2023).

No que concerne a estrutura dos Receptores de Vitelogenina, estes possuem repetições de LDL_ α , LDL_ β (promovem a interação do receptor com Vg), fator de crescimento epidermal (EGF) (promovem a dissociação de complexo Vg-VgR no endossomo acidificado), domínio transmembrana (mantêm o receptor estável na membrana do oócito) e, em alguns casos, um domínio de açúcar O-ligado (proporcionam estabilidade e protegem contra desnaturação enquanto VgR está sendo reciclado) (Tufail & Takeda, 2009). Conforme a distribuição das repetições de LDL_ α ao longo da estrutura de VgR, Tufail & Takeda (2009) os classificam em dois tipos: I e II. De acordo com isto, EcVgR é um VgR tipo I, pois possui um cluster inicial com 5 repetições LDL_ α e um cluster com 8 repetições na região C-terminal. Além do mais, EcVgR apresentou todos os principais domínios característicos da família de receptores de lipoproteína de baixa densidade. Contudo, o mesmo não possui o domínio de açúcar O-ligado que é comum aos receptores tipo I. Assim como em *E. connexa*, em *Laodelphax striatellus* (Hou *et al.* 2019) e *Sogatella furcifera* (Hu *et al.* 2019) o domínio de açúcar O-ligado não foi encontrado. Já em *H. axyridis*, que também possui VgR tipo I, o domínio de açúcar O-ligado está presente (Han *et al.* 2022b). Em espécies cujo VgR é classificado como tipo II (distribuição 4+8), a ausência do domínio de açúcar O-ligado é comum e não influencia o funcionamento de VgR (Upadhyay *et al.* 2016, Han *et al.* 2022a). No besouro *Colaphellus bowringi*, que extraordinariamente demonstrou um padrão 5+9, a ausência do domínio de açúcar O-ligado também não prejudica o funcionamento da proteína (Liu *et al.* 2019). Sendo assim, o desempenho de EcVgR em internalizar EcVgs não deve ser afetado pela ausência deste domínio em sua estrutura.

A análise de expressão dos genes *Vg* e *VgR* por RT-qPCR em fêmeas de diferentes idades mostrou que *EcVgR*, *EcVg1* e *EcVg2* já são expressos no segundo dia após a emergência (DAE). De 2 a 5 DAE, os níveis de expressão tendem a aumentar e permanecem

em ascensão pelo menos até o 8° DAE. Isso indica que a expressão de *EcVg1*, e 2 e *EcVgR* está intimamente associado ao início da postura de ovos viáveis (Silva *et al.* 2021). Em *Tribolium castaneum*, organismo modelo de Coleoptera, níveis elevados de HJ até o 5° DAE faz com que os níveis de *Vg* comecem a aumentar a partir do 3° DAE e atinjam o pico de expressão entre o 4-5° DAE (Parthasathy *et al.* 2010). Na joaninha *H. axyridis* os níveis de expressão de *HaVgR* foram identificados logo no 1° DAE, aumentou gradualmente entre o 3° e 9° DAE e começou a diminuir após atingir o pico de expressão no 13° DAE (Han *et al.* 2022b). Em insetos não coleópteros, a expressão de *Vg* e *VgR* pode ser iniciada antes da fase adulta. A exemplo disto, na cigarrinha marrom do arroz, *Laodelphane striatellus*, o nível de transcrição de *LsVgR* começa a aumentar ainda nos ovários imaturos de ninfas de último instar (Hou *et al.* 2019). Na lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda*, *SfVg* foi detectado em pupas de 7 dias e, após isso, a taxa de expressão continuou aumentando até atingir um pico em adultos de 3 DAE (Han *et al.* 2022a). Por fim, em mosquitos, uma fase pré-vitelogênica bem caracterizada de três dias é observada antes que o repasto sanguíneo desencadeie a fase vitelogênica (Raikhel & Lea 1983). Todos os dados levantados confirmam, a relação existente entre a expressão de *Vg* e *VgR* com a maturidade reprodutiva dos insetos. Em *E. connexa*, a maturidade sexual de fêmeas acontece por volta do 5° DAE (Silva *et al.* 2021). Sendo assim, de acordo com os níveis de expressão de *EcVgs* e *EcVgR* em função de DAE, o período pré-vitelogênico nessa espécie acontece entre o primeiro e quinto dia. Fêmeas de 5 DAE atingem a maturidade reprodutiva ao elevarem a quantidade de transcritos *Vg* e *VgR* e, em 8 DAE, quando já atingiram os níveis adequados de transcritos, a reprodução acontece plenamente.

A nutrição desempenha um papel crucial na reprodução de insetos, sendo apontada como um dos seus principais pontos regulatórios (Smykal & Raikhel 2015, Roy *et al.* 2018).

Na mosca do melão, *Z. cucurbitae*, foi visto que um jejum de 24 horas pode reduzir a expressão de *ZcVg* e que uma posterior alimentação pode restabelecer os padrões normais de transcrição (Chen *et al.* 2022). Em *T. castaneum*, a fome impediu o rápido aumento das taxas de *TcVg* durante o período de transição entre o período pré-vitelogênico e vitelogênico (Sheng *et al.* 2011). Na abelha *A. mellifera*, a nutrição afeta tanto a expressão de *AmVg* quanto a longevidade de operárias (Wang *et al.* 2014). Em *E. connexa*, estudos anteriores mostraram que uma alimentação preferencial mantida a base de pulgões fez com que os trofócitos dos indivíduos fossem três vezes maiores do que aqueles alimentados com ácaros (Sarmiento *et al.* 2004). Em vista disto, investigou-se o efeito da alimentação com pulgão para a expressão de *EcVg1* e *EcVg2*.

Bioensaios com indivíduos alimentados desde a fase larval com ou sem pulgão foram conduzidos, com observação de fenótipo e quantificação relativa de transcritos *EcVg1* e *EcVg2*. Indivíduos que foram alimentados desde a fase larval com pulgões apresentaram o fenótipo de coloração característico da espécie: élitro preto com manchas brancas e laranjas. Já indivíduos que nunca se alimentaram de pulgões não expressaram a cor laranja. A análise de expressão por RT-qPCR indicou que *EcVg1* foi mais expresso em fêmeas alimentadas com pulgão e que os níveis de *EcVg2* não foram influenciados pelo tipo de alimento.

Os efeitos da diminuição de expressão de *EcVg1*, *EcVg2* e *EcVgR* na biologia reprodutiva de *E. connexa* foram analisados por RNAi. Desta forma, descobriu-se que *dsEcVgR* foi capaz de silenciar a expressão de *EcVgR* mas, não interferiu na expressão nem de *EcVg1* nem de *EcVg2*. Em decorrência do silenciamento de *EcVgR*, a análise dos parâmetros biológicos revelou que o tratamento com *dsEcVgR* não interferiu na oviposição, mas diminuiu significativamente a viabilidade dos ovos, que estavam em sua maioria deformados. De maneira semelhante ao encontrado para *E. connexa*, foi relatada uma redução

da expressão de *VgR* em *L. striatellus* em 75% após o tratamento com *dsLvVgR* (Hou *et al.* 2019) e uma redução de 95,49% na expressão de *VgR* em *H. axyridis* após tratamento com dsRNA específico (Han *et al.* 2022b) e, em *Cadra cautela* (Lepidóptera), *dsCcVgR* também diminuiu a expressão de *CcVgR* e diminuiu a viabilidade dos ovos (Husain *et al.* 2020). Ademais, como *VgR* é bem conservado não apenas em Insecta, mas também entre Insecta e outros grupos, impactos equivalentes para a fertilidade dos camarões *Litopenaeus vannamei* (Ruan *et al.* 2020) e *Macrobrachium nipponense* (Bai *et al.* 2016) e de carrapatos (Mitchell, Sonenshine & León 2019) forma registrados.

Os receptores de Vitelogenina são proteínas presentes na membrana de oócitos em desenvolvimento e alterações nesses receptores podem ser limitantes no processo de reprodução, pois são essenciais à internalização da Vitelogenina e a nutrição de embriões (Engelman 1970, Nation 2016). A deficiência de *VgR* na membrana dos oócitos provocada pela administração de dsRNA específico fez com que os oócitos de *L. striatellus* não absorvessem a *Vg* presente na hemolinfa, da mesma forma prejudicou a absorção de *Vg* em *B. tabaci* e em *H. axyridis* (Upadhyay *et al.* 2016, Hou *et al.* 2019, Han *et al.* 2022b). Sabendo disto, é correto inferir que o silenciamento de *EcVgR* por *dsEcVgR*, impediu a deposição de *Vg* nos oócitos de fêmeas de *E. connexa* tratadas *dsEcVgR*, o que justifica tanto o padrão deformado dos ovos quanto a diminuição da viabilidade dos ovos de fêmeas tradas com *dsEcVgR*.

O estudo da função das Vitelogeninas de *E. connexa* por RNAi mostrou que *dsEcVg2* é capaz de silenciar *EcVg1* e *EcVg2*; que *dsEcVg1* apenas silencia *EcVg1*; que o número de ovos postos não é influenciado pela administração de dsRNAs específicos para ambos os genes; mas que a viabilidade dos ovos postos por fêmeas tratadas com *dsEcVg2* é drasticamente reduzida frente ao nocauteamento de ambos os genes *Vgs*. Apesar dos esforços

para escolher uma região que não tivesse identidade de 21pb entre *EcVg1* e *EcVg2* para a síntese de dsRNAs, não foi possível silenciar *EcVg1* e *EcVg2* isoladamente e, consequentemente não pudemos analisar os fenótipos individualmente.

Como visto até aqui, a vitelogenina é indispensável à reprodução pois são as responsáveis pela nutrição dos embriões (Tufail & Takeda 2008, Nation *et al.* 2016). Estudos que identificaram e validaram funcionalmente *Vg* em *Z. cucurbitar* (Chen *et al.* 2022), *C. lectularius* (Moriyama *et al.* 2015), *S. frugiperda* (Han *et al.* 2022a) e *C. septempunctata* (Liu, Mao & Zeng 2015) também relataram a diminuição da viabilidade após tratamento com dsRNAs específicos. Adicionalmente, Liu, Mao & Zeng (2015) viu que ds*CsVg* reduziu o número de ovos; Moriyama *et al.* (2015) registrou uma mortalidade variável de 4-12%, revelou que o abdome de *C. lectularius* se tornou inflado devido a hipertrofia das células do corpo gorduroso e mostrou que os ovários estavam atrofiados e sem oócitos maduros após administração de ds*ClVg*; e Han *et al.* (2022a) relatou a diminuição do conteúdo de *Vg* na hemolinfa e nos ovários, assim como a diminuição de oviposição e aumento do período de pré-oviposição após tratamento de fêmeas com ds*SfVg*. Provavelmente as vitelogeninas identificadas em *E. connexa* são redundantes e cruciais para a reprodução. Contudo, o motivo para ds*EcVg2* conseguir silenciar ambas as Vitelogeninas ainda precisa ser investigado. Uma alternativa viável para desvendar este impasse é a utilização de técnicas moleculares como CRISPR, que permite a edição de pontos específicos de um genoma (Hanna & Doench 2020).

Neste trabalho conseguimos identificar os genes *EcVgR*, *EcVg1* e *EcVg2* e validar sua função por RNAi. Este foi o primeiro estudo de silenciamento gênico em *E. connexa*. Em acréscimo, também confirmamos que o tipo de alimentação pode influenciar na expressão de *Vgs*. Esses dados abrem perspectivas para estabelecer condições de criação massal de *E.*

connexa além de possibilitar que esta espécie seja um modelo de estudos para inimigos naturais predadores.

Literatura Citada

- Amdam, G.V.Z., L.P. Simões, K.R. Guidugli, K. Nøberg & S.W. Omholt. 2003.** Disruption of vitellogenin gene function in adult honey bee by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnol.*, 3:
- Bai, H., H. Qiao, F. Li, H. Fu, S. Jiang, W. Zhang, et al. & y. Wu, Y. 2016.** Molecular and functional characterization of the vitellogenin receptor in oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 194, 45–55.
- Bonte, M., M.A. Samih & P.D. Clercq. 2010.** Development and reproduction of *Adalia bipunctata*, on factitious and artificial foods. *Bio. Control.*, 55, 485–491.
- Chen, D., H.-L. Han, W.-J. Li, J.-J. Wang & D. Wei. 2022.** Expression and role of Vitellogenin gene in ovarian development of *Zeugodacus cucurbitae*. *Insects*, 13:
- D’ávila, V.A., W.F. Barbosa, L.C. Reis, B.S.A. Gallardo, J.B. Torres & R.N.C. Guedes. 2018.** Lambda-cyhalothrin exposure, mating behavior and reproductive output of pyrethroid-susceptible and resistant lady beetles (*Eriopis connexa*). *Crop Prot.* 107:41–47.
- Engelmann, F. 1970.** Gonadal development in The physiology of insect reproduction. International series of monographs in Pure and Applied Biology, Zoology Division, 44:
- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery & et al. 1998.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nat.*, 391: 806-811.
- Firmino A.A., F.C. Fonseca, L.L. de Macedo, R.R. Coelho, J.D. Antonino de Souza JD Jr., R.C. Togawa, O.B. Silva-Junior, G.J. Pappas Jr, M.C. da Silva, G. Engler & M.F. Grossi-de-Sa. 2013.** Transcriptome analysis in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) and RNA interference in insect pests. *PLoS One.*, 8:e85079.
- Fogel M.N., M.I. Schneider, F. Rimoldi, L.S. Ladux, N. Desneux & A.E. Ronco. 2016.** Toxicity assessment of four insecticides with different modes of action on pupae and adults of *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae), a relevant predator of the Neotropical Region. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 23:14918-14926.
- Hanna, R.E., J.G. Doench. 2020.** Design and analysis of CRISPR–Cas experiments. *Nat Biotechnol* 38: 813–823

- Han, H., S. Han, Q. Qin, J. Chen, D. Wang & Y. He. 2022b.** Identification and functional characterization of Vitellogenin Receptor from *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *J. Econ. Entomol.*, 115:325-333.
- Han, S., D. Wang, P. Song, S. Zhang & Y. He. 2022a.** Molecular Characterization of Vitellogenin and Its Receptor in *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797), and Their Function in Reproduction of Female. *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 11972
- Hoffmann, K.H. 1995.** Oogenesis and the female reproductive system *in* Insect Reproduction. Leather, S.R. & Hardie, j. CRC Press, 1995.
- Huo, Y., Y. Yu, Q. Liu, D. Liu, M. Zhang, J. Liang, X. Chen, L. Zhang & L. Fang. 2019.** Rice stripe virus hitchhikes the vector insect vitellogenin ligand-receptor pathway for ovary entry. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 374: e20180312.
- Husain, M., K.G. Rasool, M. Tufail & A.S. Aldawood. 2020.** Molecular characterization, expression pattern and RNAi-mediated silencing of vitellogenin receptor gene in almond moth, *Cadra cautella*. *Insect Mol. Biol.*, 29:417-430.
- Leipart, V., M. Montserrat-Canals, E.S. Cunha, H. Luecke, E. Herrero-Galán, O. Halskau & G.V. Amdam. 2022.** Structure prediction of honey bee vitellogenin: a multidomain protein important for insect immunity. *FEBS Open Bio*, 12:51-70.
- Liang, C., T. Liu, S. Han & Y. He. 2019.** Molecular cloning, expression profiling and RNA interference of a vitellogenin gene from *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *J. Integrat. Agricul.*, 18: 2311-2320.
- Lira, R., A.R.S. Rodrigues & J.B. Torres. 2016.** Fitness advantage in heterozygous ladybird beetle *Eriopis connexa* (Germar) resistant to lambda-cyhalothrin. *Neotrop. Entomol.* 45: 573–579
- Liu, C., J. Mao & F. Zeng. 2015.** *Chrysopa septempunctata* (Neuroptera: Chrysopidae) vitellogenins functions through effects on egg production and hatching. *J. Econ. Entomol.*, 108: 2779-2788.
- Livak K.J. & T.D. Schmittgen. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.*, 25:402-8.
- Moriyama, M., T. Hosokawa, M. Tanahashi, N. Nikon & T. Fukatsu. 2016.** Suppression of bedbug's reproduction by RNA Interference of vitellogenin. *PLoS One*, 11: 0153984.
- Nation, J.L. 2016.** Reproduction in Insect physiology and biochemistry.
- Nelson, C.M., K.E. Ihle, M.K. Fondrk, R.E. Page Jr & G.V. Amdam. 2007.** The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biol.*, 6:

- Parthasarathy R, Z. Sun, H. Bai & S.R. Palli. 2010.** Juvenile hormone regulation of vitellogenin synthesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Insect Biochem. Mol. Biol. 40:405–14
- Parthasarathy, R. & S.R. Palli. 2011.** Molecular analysis of nutritional and hormonal regulation of female reproduction in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Insect Biochem. Mol. Biol., 41: 294-305
- Raikhel, A.S. & A.O. Lea. 1983.** Previtellogenic developmental and vitellogenin synthesis in the fat body of a mosquito: Na ultrastructural and immunocytochemical study. Tissue Cell., 15:281-299.
- Rancurel, C., T. van Tran, C. Elie & F. Hilliou. 2019.** SATQPCR: Website for statistical analysis of real-time quantitative PCR data. Molecular and Cellular Probes. doi:10.1016/j.mcp.2019.07.001
- Roy, S., T.T. Saha, Z. Zou & A.S. Raikhel. 2018.** Regulatory pathways controlling female insect reproduction. Annu. Rev. Entomol., 63:489-511.
- Roy-Zokan, E.M., C.B. Cunningham, L.E. Hebb, E.C. McKinney & A.J. Moor. 2015.** Vitellogenin and vitellogenin receptor gene expression is associated with male and female parenting in a subsocial insect. Proc. Biol. Sci., 282, 20150787.
- Ruan, Y., N-K. Wong, X. Zhang, C. Zhu, X. Wu, C. Ren, et al. & T. Chen. 2020.** Vitellogenin Receptor (VgR) Mediates Oocyte Maturation and Ovarian Development in the Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Front. Physiol., 11. doi:10.3389/fphys.2020.00485
- Salmela, H. & L. Sundström. 2018.** Vitellogenin in inflammation and immunity in social insects. Inflamm. Cell Signal., 5:e1506.
- Sappington, T.W. & A.S. Raikhel. 1998.** Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. Insect Biochem. Mol. Biol., 28: 277–300.
- Sarmiento R.A., H.G. Oliveira, A.M. Holtz, S.M. Silva, J.E. Serrão & A. Pallini. 2004.** Fat body morphology of *Eriopsis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae) in function of two alimentary sources. Braz. Arch. Biol. Technol., 47:407-411.
- Sarmiento R.A., Pallini A., Venzon M., Souza F.F., Molina-Rugama A.J., Oliveira C.L. 2007.** Functional response of the predator *Eriopsis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae) to different prey types. Braz. Arch. Biol. Technol. 50:121-126.
- Sheng, Z., J. Xu, H. Bai, F. Zhu & S.R. Palli. 2011.** Juvenile Hormone Regulates Vitellogenin Gene Expression through Insulin-like Peptide Signaling Pathway in the Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum*. J. Bio. Chem., 286: 41924-41936

- SILVA, A.C.G., SILVA-TORRES, C.S.A., NASCIMENTO, D.V. & TORRES, J.B. 2021.** Sexual maturity, lack of partner choice and sperm precedence in the promiscuous ladybird beetle *Eriopis connexa* (Germar): Who is my father?. *BEHAVIOURAL PROCESSES*, v. 192, p. 104500.
- Silva, R.B., M.R.G. Fellet, A.C. Redoan, M.L.C. Figueiredo & I. Cruz. 2006.** Aspectos Biológicos de Fases Imaturas de *Eriopis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae) Alimentada com Ovos de Presas Naturais e Dietas Artificiais. *Embrapa Milho e Sorgo*.
- Smykal, V. & A.S., Raikhel. 2015.** Nutritional controlo f insect reproduction. *Insect Sci.*, 11: 31-38.
- Sun, C., L. Hu, S. Liu, Z. Gao, & S. Zhang. 2013.** Functional analysis of domain of unknown function (DUF) 1943, DUF1944 and von Willebrand factor type D domain (VWD) in vitellogenin2 in zebrafish. *Dev. Comp. Immunol.*, 41: 469–476.
- Tufail, M. & M. Takeda. 2008.** Molecular characteristics of insect vitellogenins. *J. Insect Physiol.*, 54: 1447-1458.
- Tufail, M. & M. Takeda. 2009.** Insect vitellogenin/lipophorin receptors: molecular structures, role in oogenesis and regulatory mechanisms. *J. Insect Physiol.*, 55: 88-104.
- Tufail, M., Y. Nagaba, A.M. Elgendy & M. Takeda. 2014.** Regulation of vitellogenin genes in insects. *Entomol. Sci.*, 17:269-282.
- Upadhyay, S. K., H. Singh, S. Dixit, V. Mendu, & P.C. Verma. 2016.** Molecular Characterization of Vitellogenin and Vitellogenin Receptor of *Bemisia tabaci*. *PLOS ONE*, 11: e0155306.
- Wahli, W. 1988.** Evolution and expression of vitellogenin genes. *Trends Genet.*, 4:227-232.
- Wang, H., S.W. Zhang, Z-J. Zeng & W-Y Yan. 2014.** Nutrition affects longevity and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) workers. *Apidologie* 45: 618-625.
- Wang, L., Y. Zhai, J. Zhu, Q. Wang, X. Ji, W. Wang, H. Yuan, C. Rui & L. Cui. 2023.** Sulfoxaflor adversely influences the biological characteristic of *Coccinella septempunctata* by suppressing vitellogenin expression and predation activity. *J. Hazard Mater.* 13; 447:130787.
- Wu, Z., L. Yang, A. He & S. Zhou. 2021.** Regulatory mechanisms of vitellogenesis in insects. *Front. Cell Dev. Biol.*, 8:
- Wu, Z., W. Guo, Y. Xie & S. Zhou. 2016.** Juvenile Hormone activates the transcription of cell-division-cycle 6 (Cdc6) for polyploidy dependent insect vitellogenesis and oogenesis. *J. Biol. Chem.*, 291: 5418-5427.

- Wynant, N., D. Santos & J.V. Broeck. 2014.** Biological Mechanisms Determining the Success of RNA Interference in Insects. p.139-167 in International Review of Cell and Molecular Biology, v. 312, ISSN 1937-6448.
- Xiao, D., X. Chen, R. Tian, M. Wu, F. Zhang, L. Zang, I.D. Harwood & S. Wang. 2020.** Molecular and potential regulatory mechanisms of melanic synthesis in *Harmonia axyridis*. Int. J. Mol. Sci., 21:2088.
- Yaguchi, H., S. Suzuki, N. Kanasaki, Y. Masuoka, R. Suzuki, R.H. Suzuki, Y. Hayashi, S. Shigenobu & K. Maekawa. 2022.** Evolution and functionalization of vitellogenin gene in the termite *Reticulitermes speratus*. J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol., 340:68-80.
- Yang, Z-M., T-Y. Lu, N. Yu, G.M. Xu, Q-Q. Han & Z.W. Liu. 2021.** The importance of vitellogenins receptors in the oviposition of the pond wolf spider, *Pardosa pseudoannulata*. Insect Sci., 29:443-452.
- Zhang, F., L. Chen, J. Qin, W. Zhao & P. Wu. 2011.** A novel gene with a vWD domain and three Kazal-type domains: Molecular cloning and expression in the ovary of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. Russ. J. Genet. 47: 1052
- Zhang, T., G. Zhang, F. Zeng, J. Mao, H. Liang & F. Liu. 2017.** Molecular Cloning of the Vitellogenin Gene and the Effects of Vitellogenin Protein Expression on the Physiology of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). Sci Rep 7, 13926
- Zhenhui, W., C. Qi, Y. Shuo, Y. Shuoyu, L. Qin, W. Endong, Z. Bo, L.V. Jiale & X. Xuenong. 2022.** Molecular characterization, expression and function on Vitellogenin genes in *Phytoseiulus persimilis*. Exp.Appl. Acaral., 86:343-356.

Tabela 1. Primers utilizados para PCR, RT-qPCR e síntese de dsRNAs.

Gene	Nome do Primer	Sequência (5'-3')	Tm (°C)	Objetivo
<i>EcVgR</i>	EcVgR_qPCT_Fw	CTGTTCAGCATTGCACAGAAA	60	RT-qPCR
	EcVgR_qPCT_Rv	TTTATGACTTGGCCATCTTCG	60	RT-qPCR
<i>EcVg1</i>	EcVg1_qPCT_Fw	ATGAATGGGTACAACGAGCTG	60	RT-qPCR
	EcVg1_qPCT_Rv	TTCGCTTCCATCGAAAGAATA	60	RT-qPCR
<i>EcVg2</i>	EcVg2_qPCT_Fw	ACACAAGCTCAAGCAAGGAGA	60	RT-qPCR
	EcVg2_qPCT_Rv	GCCCAGTGATCTTTGGTGTA	60	RT-qPCR
<i>EcGAPDH</i>	EcGAPDH_qPCT_Fw	GGGGTAAGGTTGGAGCACTT	60	RT-qPCR
	EcGAPDH_qPCT_Rv	AAGGGGCCGAAATGATTACT	60	RT-qPCR
<i>Ecβ-Tubulina</i>	Ecβ-Tubulina_qPCT_Fw	GCAGCTGGAGAGGATAGAGGT	60	RT-qPCR
	Ecβ-Tubulina_qPCT_Rv	GCTTTCCATAGGAACCACTCC	60	RT-qPCR
<i>EcRPS10</i>	EcRPS10_qPCT_Fw	GGCTCTCCAATCCTTGAAATC	60	RT-qPCR
	EcRPS10_qPCT_Rv	CAATTTCAGGAGGCAAATTCA	60	RT-qPCR
<i>EceEF1α</i>	EceEF1α_qPCT_Fw	AAAAGTCGACCGTCGTTC	60	RT-qPCR
	EceEF1α_qPCT_Rv	TTGGAAAGATTCAACGCACAT	60	RT-qPCR
<i>EcVgR</i>	EcVgR_1st Round_Fw	TGAATTGATGGGAGATGGAAG	52	Molde para dsRNA
	EcVgR_1st Round_Rv	ATGCAAATCCGTTTGTATGAG	52	Molde para dsRNA
<i>EcVgR</i>	Ec_T7-dsVgR_Fw	T7-TTCAATCATCCTGGAAGTTA	62	Molde para dsRNA
	Ec_T7-dsVgR_Rv	T7-GACTTTGAGTACGGAACATTG	62	Molde para dsRNA
<i>EcVg1</i>	EcVg1_1st Round_Fw	CCAAAACAAATATCGCTTCAA	50	Molde para dsRNA
	EcVg1_1st Round_Rv	GTAAGCGTGGGAAGTAAGGTC	52	Molde para dsRNA
<i>EcVg1</i>	Ec_T7-dsVg1_Fw	T7-GAGGGAATATCAGAAAGAAT	62	Molde para dsRNA
	Ec_T7-dsVg1_Rv	T7-ACCATCTTGCCTTATCATACT	62	Molde para dsRNA

Continuação. [Tabela 1.](#) Primers utilizados para PCR, RT-qPCR e síntese de dsRNAs.

<i>Gene</i>	Nome do Primer	Sequência (5'-3')	Tm (°C)	Objetivo
<i>EcVg2</i>	EcVg2_1st Round_Fw	AGAACGAACACATCATCCGTA	54	Molde para dsRNA
	EcVg2_1st Round_Rv	GGAGCCATATCGAATTTCATT	51	Molde para dsRNA
<i>EcVg2</i>	Ec_T7-dsVg2_Fw	T7-GAAAAACCCAGTTCAATG	64	Molde para dsRNA
	Ec_T7-dsVg2_Rv	T7-TCAACATTTTGTGTCCAGA	64	Molde para dsRNA
<i>AgCE8.1</i>	AgCE8.1_1stR_Fw	GAACGGATGGTCTCCTGGTAA	56	Molde para dsRNA
	AgCE8.1_1stR_Rv	AACGTAGATTCTGCCAGAACC	55	Molde para dsRNA
<i>AgCE8.1</i>	Ag_T7-dsCE8.1_Fw	T7-GTACCATTCAAGAAGCTGT	63	Molde para dsRNA
	Ag_T7-dsCE8.1_Rv	T7-AGGCTACTTCCAAGAGATC	63	Molde para dsRNA

T7 - TAATACGACTCACTATAGGGAGA

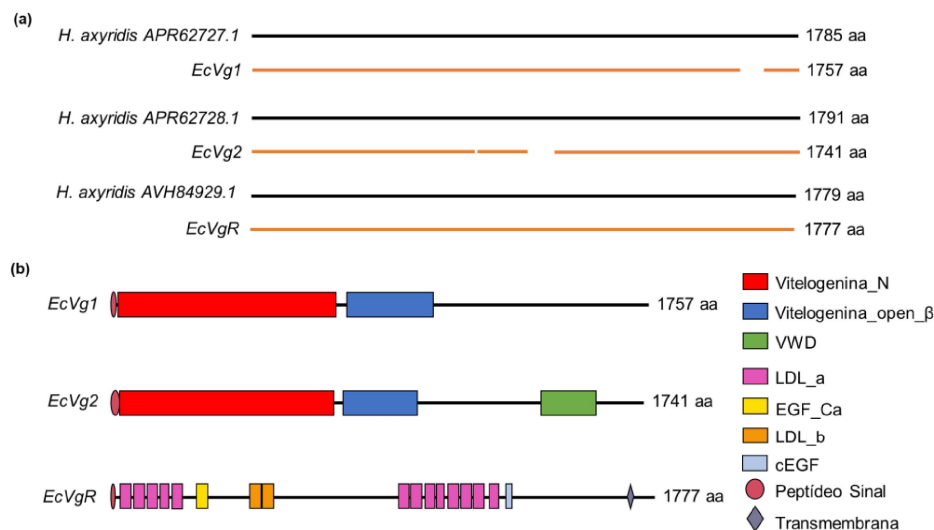
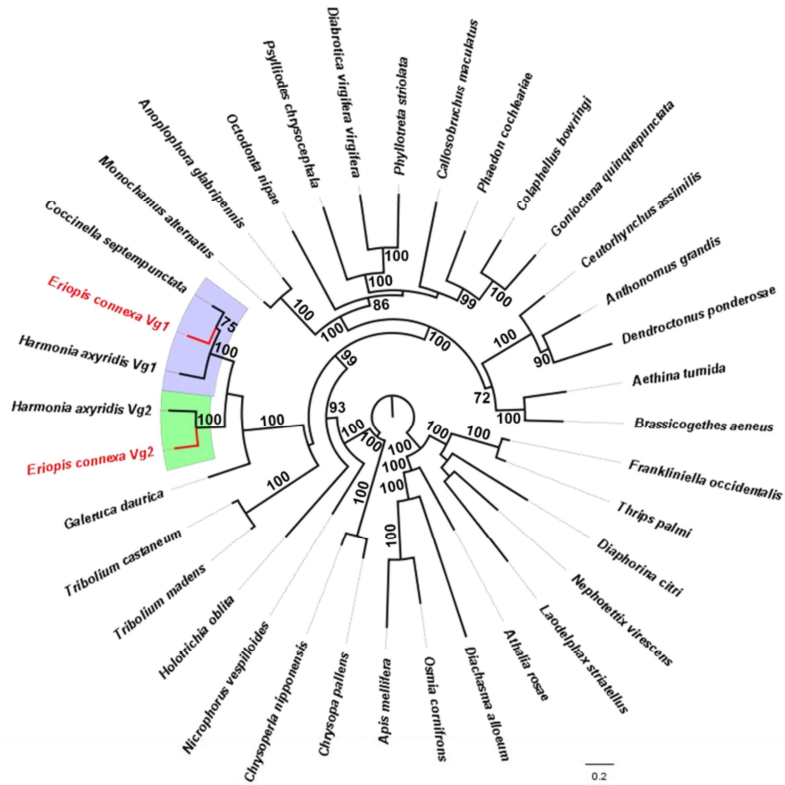


Figura 1. Análise *in silico* dos genes e proteínas preditas de *EcVg1*, *EcVg2* e *EcVgR*. (a)

Regiões de alinhamento dos *contigs* encontrado para *EcVgR*, *EcVg1* e *EcVg2* utilizando sequências de *Harmonia axyridis*. **(b)** Domínios funcionais identificados no HMMER e CDD. *EcVg1* apresenta um domínio Vitelogenina amino terminal (Vitelogenina_N) entre os aminoácidos 23 e 735, um Vitelogenina folha β aberta (Vitelogenina_open_β) entre os aminoácidos 770 e 1053 e o peptídeo sinal entre os aminoácidos 1-18. *EconVg2* apresenta os domínios Vitelogenina_N, Vitelogenina_open_β e o fator tipo D de von Willebrand (VWD) nas posições 28-727aa, 758-1000aa e 1405-1586aa, respectivamente e o peptídeo sinal na posição 1-29aa. *EconVgR* e os 13 domínios funcionais do receptor de lipoproteína de baixa densidade classe a (LDL_a) entre os aminoácidos 30-65; 74-105; 117-153; 160-191; 200-234; 939-75; 980-1015; 1024-1258; 1061-1098; 1101-1136; 1143-1180; 1182-1219; 1236-1267; 1 domínio de ligação ao Cálcio (EGF_Ca) entre os aminoácidos 279-317; 2 domínios do receptor de lipoproteína de baixa densidade classe b (LDL_b) nas posições 454-491aa e 494-533aa; 1 complemento semelhante a Clr-EGF entre os aminoácidos 1290-1311. *EconVgR* ainda possui um peptídeo sinal entre os aminoácidos 1-16 e um domínio transmembrana entre os aminoácidos 1686-1708.

(a)



(b)

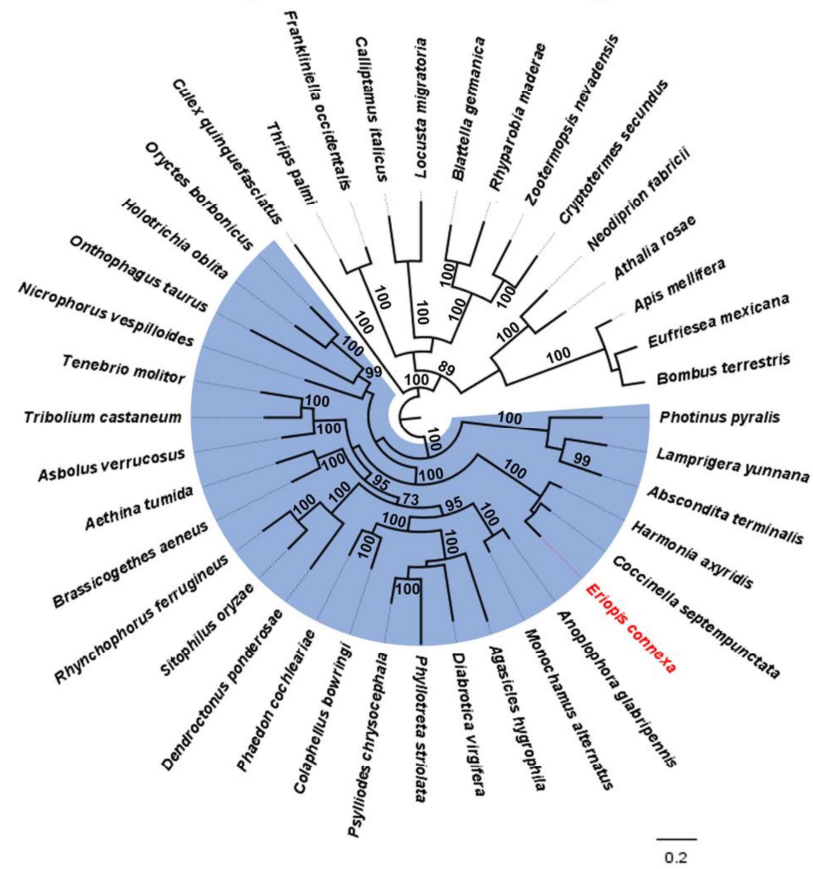


Figura 2. Análise filogenética das sequências de Vitelogenina (*EcVg1* e *EcVg2*) e Receptor de Vitelogenina (*EcVgR*). Árvore filogenética determinada por máxima verossimilhança para sequências de *Vitelogenina* (a), e para as sequências de *Receptor de Vitelogenina* (b). Em (a) o box azul destaca a semelhança entre *EcVg1* e as sequências de *Vitelogenina* de *C. septempunctata* e *Vg1* de *H. axyridis* enquanto o box verde mostra a semelhança entre *EcVg2* e *Vg2* de *H. axyridis*. Em (b) o semidisco azul destaca o grupo Coleoptera. A confiabilidade dos ramos está expressa em valores de Bootstrap (1000 repetições). Apenas foram considerados os valores acima de 75.

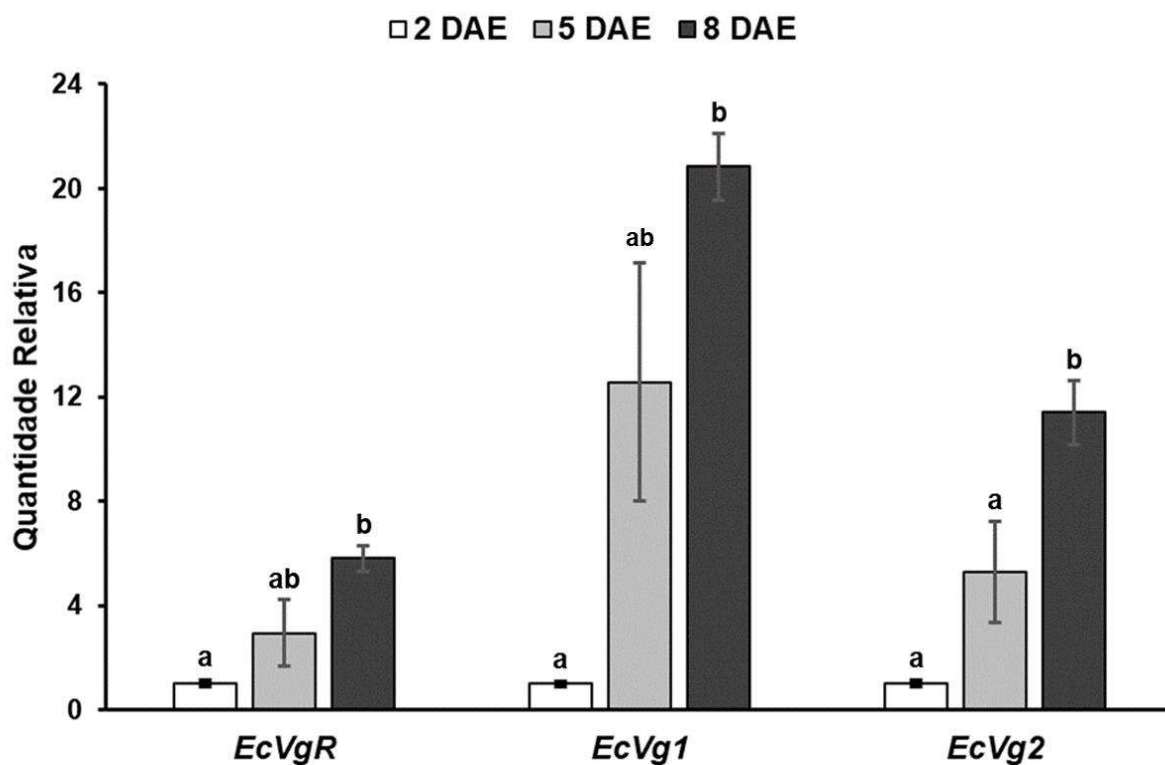


Figura 3. Nível de expressão dos genes *EcVgR*, *EcVg1* e *EcVg2* em fêmeas de *E. connexa* em diferentes idades após a emergência. Os dados foram normalizados com os genes β -Tubulina e EF1 α , expressos em média $\pm$ Erro Padrão e analisados por ANOVA e Teste de Tukey ($P < 0,05$). DAE: Dias após a emergência.

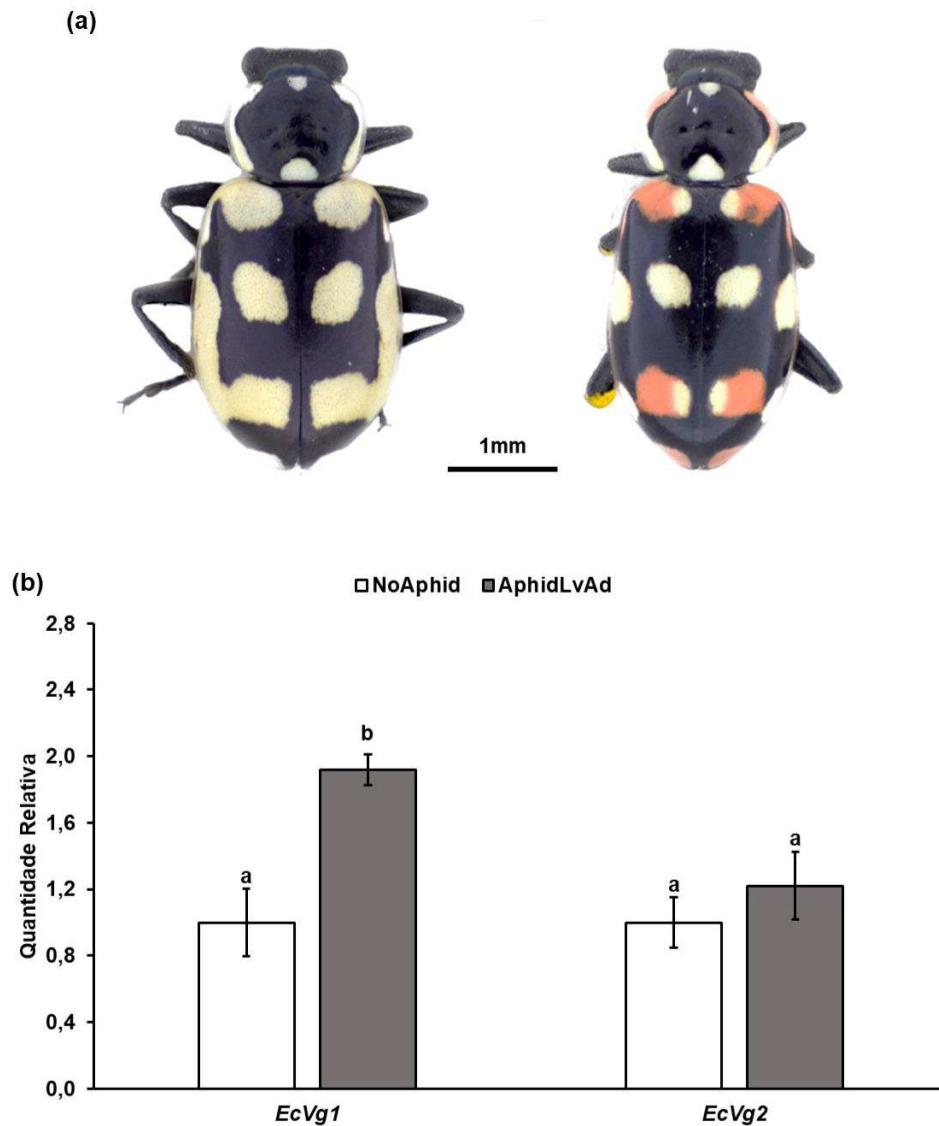
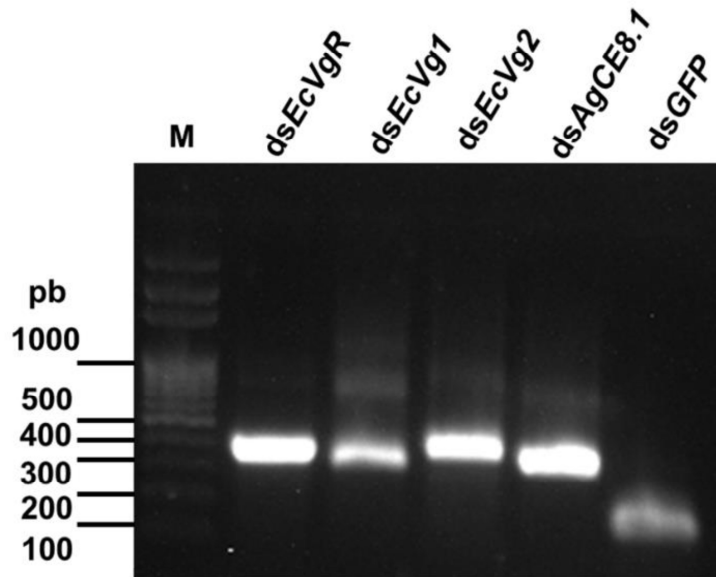


Figura 4. Influência da alimentação em *E. connexa*. (a) Fenótipo apresentado de acordo com alimentação: na esquerda, indivíduo alimentado com afídeo após fase adulta, na direita, indivíduo que nunca se alimentou de afídeos. (b) quantidade relativa de *EcVg1* e *EcVg2* conforme alimentação. Os dados foram normalizados com β -Tubulina e eEF1 α , expressos em média $\pm$ SE e analisados por ANOVA e Teste de Tukey ($P > 0,05$). (b) NoAphid: alimentação sem afídeos; AphidAdult: alimentação com afídeos na fase adulta.

(a)



(b)

```

EcVg1 aaatcaatctatcaagt---taacagggcccggttcaaaagagattcgaagctgttgttgggt 3279
EcVg2 aagaAGAACGAACACATCATCCGTATGAAAAACCCAGTTCAATGGGAAAAAACTGTTGGT 3126
    **      * * * * *      * *      * *      * *      * *      * *
EcVg1 gataaatccgtaggaatggcattccgtgttaaatacgagaatgatgactCCAAAACAAAT 3339
EcVg2 GACAAATCTGTTGGAATGGCTTTCCGCGTCAAATACGAGAATGATAACAAAATCGCCAGC 3186
    ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
EcVg1 ATCGCTTCAATGTCTCGAAGGATTCTTCGAAGATAGAATTCAACACGAATGGCTCGATGTT 3399
EcVg2 GTAGAAGATTTACTCAAGGATATGTACGAAATTGATGTTTATTATAAACAAATCAAGGTT 3246
    * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
EcVg1 GAATACGTACCCGAACCTTTCAAAAACAAGAAGGTGAATGGAATCGTTTCTTACATTGAGG 3459
EcVg2 CAATTTCGTACCTGAACTCTCTCCCAACAAAAAATTCACTACTGATGTAATCTACAGAGAG 3306
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
EcVg1 GAATATCAGAAAGAATACCAGTCTGTGACAGAAAGACAATGCTCAACAATTTAGCTCAA 3519
EcVg2 AAATACCAAAAGGAATGCGAAGAGCAAGATGGAAAAATCAATGCTTAACAAATTTGTCCCA 3366
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
EcVg1 TTGCCAGCCGACGACACCTCACGCGTCGCCCAACTCGTGAAATACGCTCCATTTGGCATC 3579
EcVg2 CTTCCAATCTACTCAAGATCAACGTGCTTCTGAAATCGTCAAATACGCTTCAGCTGGTATT 3426
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
EcVg1 AAGAATGCCATGGTAACTGTCTGTAGATAAGAAAGTTCAATTCAAGTGAAGTCAAAACGTA 3639
EcVg2 CAAAACGCAAGAATGCAGGTGTTGGATTCAAGATTCTCTTTCTCTGGACAACAAAATGTT 3486
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
EcVg1 GAGTACGTGATGTCTATTGGCATAACGAAAGAACGGAGACAATTCTAAGGCTCGTATGCTG 3699
EcVg2 GAATATAGTTTTACAATGACTTACGCTAGAAACCAGGAGGATTCTAAATCTCGTTTGTG 3546
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
EcVg1 GCTCACGTCAAGAAACAGACACAAATTTCAAGGAAGCAAACCATTCGAAGCTGCTGCTTGT 3759
EcVg2 GCTTACGTTAAGAAACACACATCAAGT-----AGCAGACCATTGCGCGAGCTGTGTCA 3600
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
EcVg1 GGTCAGTATGATAAGGCAAGATGGTCTGGACTTGACATGAATTACGTAATGAAATCCGAC 3819
EcVg2 ATGAAATTTCGATATGGCTCCTGTAACCTGGATTGAACATGGATTATGTCATGAACCATAAC 3660
    * *      * * * * * * * *      * * * * * * * * * * * * * * *
EcVg1 CTTACTTCCACGCTTACgtcgatgttgcatcgacacaaaactaccaagtgacaacat 3879
EcVg2 cttcaatcttctgtcctcatcgatggtgctttcgccgaaacactccaactgacaacaa 3720
    * *      * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```


Figura 5. dsRNAs. (a) Gel de agarose mostrando o tamanho dos dsRNAs produzidos. Os números na esquerda representam o tamanho dos dsRNAs em pares de base (pb). M é o marcador molecular. *dsEcVgR* é o dsRNA produzido para silenciar *VgR* de *E. connexa*. *dsEcVg1* e *dsEcVg2* os dsRNAs para silenciar as *Vg* da mesma espécie. *dsAgCE8.1* e *GFP* são as moléculas inespecíficas usadas como controle positivo. (b) Alinhamento das sequências *EcVg1* e *EcVg2*. Na figura, a região do dsRNA está marcada em verde. Os primers do primeiro round de PCR estão em negrito, itálico e marcados em cinza. As regiões que não foram amplificadas na PCR estão em minúsculas, e as que foram a partir do primeiro round estão em maiúsculas. Os primers com T7 estão marcados em negrito (sequência não mostrada).

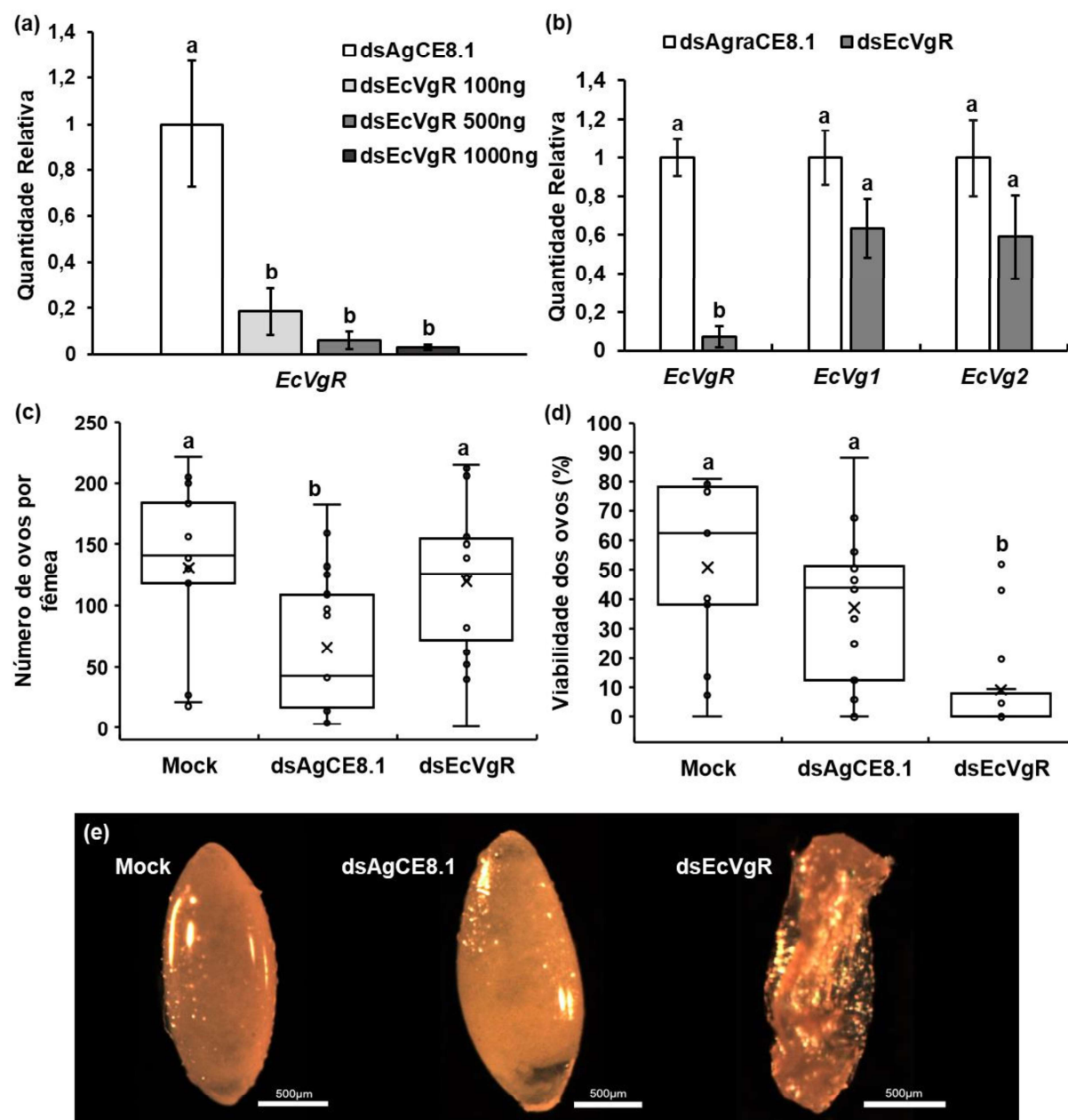


Figura 6. Efeitos do silenciamento de *EcVgR*. **(a)** Quantidade relativa de transcritos de *EcVgR* sob tratamento com diferentes doses de ds*EcVgR*. **(b)** Quantidade relativa dos transcritos de genes envolvidos na reprodução de *E. connexa* 48 horas após tratamento com

ds*EcVgR*. **(c)** Número de ovos por fêmea após tratamento com ds*EcVgR* durante 15 dias de observação. **(d)** Viabilidade (%) dos ovos ovipositados por fêmeas tratadas com ds*EcVgR* e controles. **(e)** Fenótipo dos ovos após tratamento com água e dsRNAs. Em (a) e (b) os genes β -Tubulina e eEF-1 α foram utilizados como normalizadores, os valores expressos em média $\pm$ SE. Em (a) os dados foram analisados por ANOVA e Teste de Tukey ($P < 0,05$) e em (b) por teste t. Em (c) e (d) a linha que separa os quartis representa a mediana e o “x” representa a média. Mock: água livre de RNase.

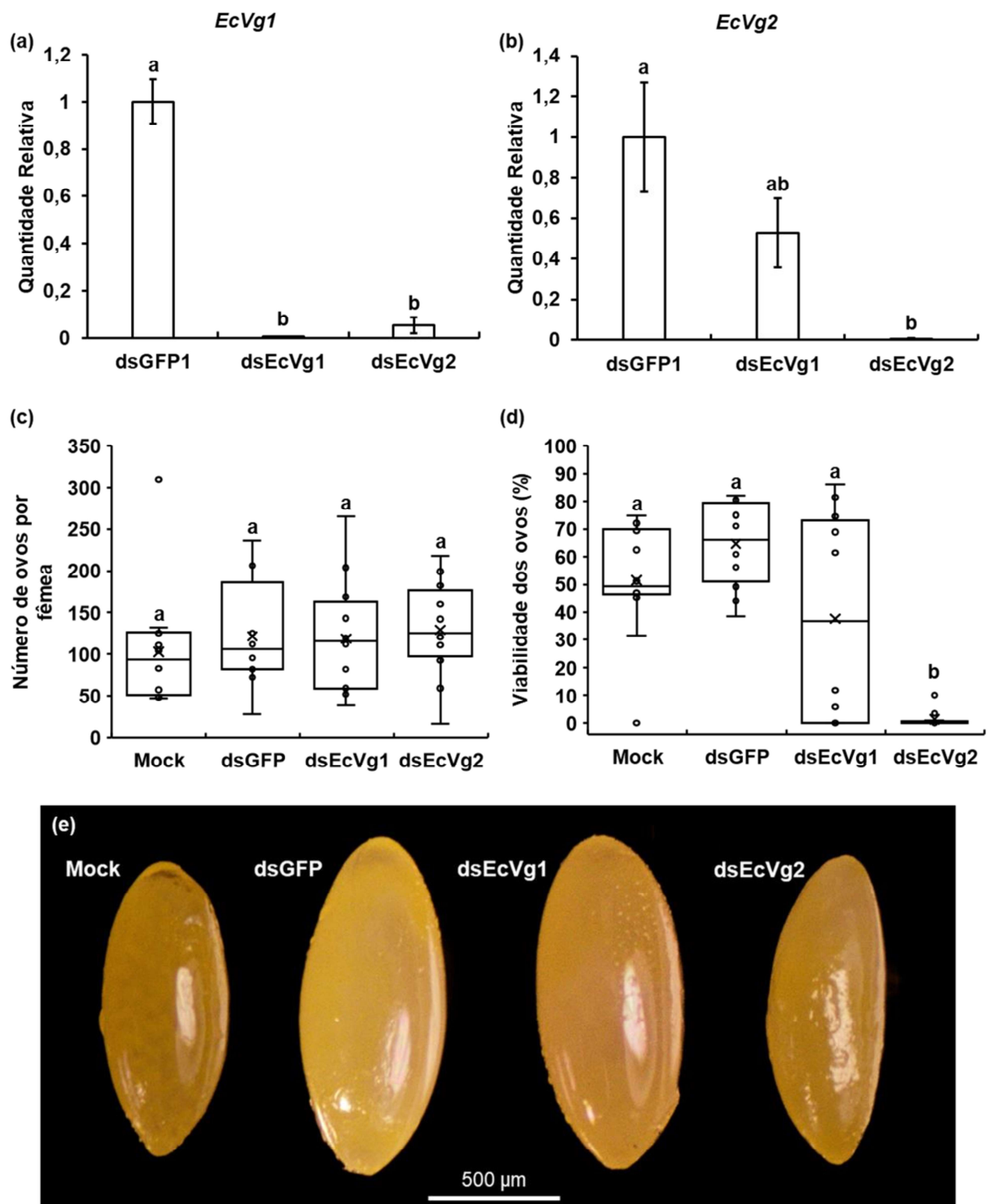


Figura 7. Efeitos silenciamento de *EcVg1* e *EcVg2*. **(a)** Quantidade relativa dos transcritos de *EcVg1* 48 horas após tratamento com dsRNAs. **(b)** Quantidade relativa dos transcritos de *EcVg2* 48 horas após tratamento com dsRNAs. **(c)** Número de ovos por fêmea. **(d)** Viabilidade dos ovos expresso em porcentagem. **(e)** Fenótipo dos ovos após tratamento com água e dsRNAs. Em (a) os dados foram normalizados com os genes β -Tubulina e eEF-1 α , expressos em média $\pm$ SE e analisados por ANOVA e Teste de Tukey ($P < 0,05$). Em (b) e (c) a linha que separa os quartis representa a mediana, o “x” representa a média e o pontos internos a oviposição ou viabilidade dos ovos de cada fêmea. Mock: água livre de RNase.

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu identificar e caracterizar dois genes *Vg* em *Eriopsis connexa* (*EcVg1* e *EcVg2*) e um gene *VgR* (*EcVgR*). As análises filogenéticas traçadas confirmam as sequências preditas e sugerem forte homologia de *EcVg1*, *EcVg2* e *EcVgR* com genes de outros coccinelídeos. Além disso, evidenciam a duplicação de *Vg* em *E. connexa* sugerindo que esta duplicação é ancestral em Coccinellidae. Os domínios proteicos são bem conservados, mas *EcVg1* não apresenta o domínio VWD, cuja função pode variar entre imunidade e reprodução. O nível de expressão dos genes encontrados está relacionado a maturidade sexual de fêmeas e a alimentação pode influenciar sua transcrição. Por fim, *EcVgR* tem função chave para a viabilidade dos ovos e que apenas o silenciamento das duas cópias de *EcVg* identificados têm poder de causar acentuada inviabilidade. Aparentemente, *EcVg1* e *EcVg2* são redundantes, mas os motivos pelos quais *dsEcVg2* consegue nocautear ambas as *Vgs* enquanto *dsEcVg1* só tem poder sobre *EcVg1* ainda precisam ser avaliadas.

Outros pontos importantes que precisarão ser investigados são: (i) como se comporta a expressão dos genes de *vitelogenina* na ausência de alimentação com pulgões por várias gerações; (ii) avaliar o fenótipo quando se injeta os dsRNAs para as duas vitelogenina de forma simultânea; e (iii) Qual o motivo do dsRNA não específico *dsAgCE8* diminuir a oviposição de *E. connexa*, mesmo quando dsRNAs específicos para genes envolvidos na reprodução não o fazem. De fato, este último ponto, pode levantar questionamentos a respeito da especificidade do RNAi, e de como um dsRNA projetado para uma praga poderia atuar em organismos não-alvo.