

# Informe final publicable de proyecto RNAi como una alternativa al uso de pesticidas en el control de chinches de la soja.

Código de proyecto ANII: FSA\_1\_2018\_1\_151855

Fecha de cierre de proyecto: 02/06/2024

**DALLA RIZZA VILARÓ , Marco** (Responsable Técnico - Científico)

**FEIJOO ABAL, Matias Martin** (Investigador)

**MUJICA TELIZ, Maria Valentina** (Investigador)

**SCHVARTZMAN DI SEGNI, Claudia Rosina** (Investigador)

**BARBIERI ARHANCET, Graciela** (Investigador)

**ARHANCET, Juan Pedro** (Investigador)

**CERETTA SORIA, Sergio Eduardo** (Investigador)

---

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA. INIA LAS BRUJAS (Institución Proponente) \\  
FACULTA DE QUÍMICA - POLO TECNOLÓGICO DE PANDO \\  
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO REGIONAL ESTE \\  
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA

## Resumen del proyecto

*Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) causa pérdidas económicas en el cultivo de soja, reduciendo su productividad, afectando el tamaño, calidad, y poder germinativo de los granos. El control actual se basa en la utilización de piretroides y neonicotinoides que impactan en enemigos naturales, el ambiente y favorecen la aparición de resistencia. La interferencia por RNA (RNAi) es un proceso conservado de regulación génica en eucariotas desencadenado por RNA doble cadena con homología de secuencia a RNA mensajero. Si el blanco de la interferencia es un gen esencial, puede generar en el organismo inhibición de la reproducción, fenotipos no viables en la descendencia o la muerte. Estas características hacen del RNAi una herramienta interesante para el manejo integrado de plagas. El proyecto buscó desarrollar moléculas basadas en RNAi que permitan reducir o sustituir la dependencia a insecticidas químicos en el control de *P. guildinii*. Analizamos en primer lugar el transcriptoma de *P. guildinii* para caracterizar la maquinaria de RNAi y posibles blancos moleculares. Adicionalmente, diseñamos y evaluamos el efecto de la administración de dsRNAs por inyección e ingesta en la viabilidad de *P. guildinii* y determinamos sus efectos moleculares de silenciamiento. Asimismo, avanzamos en la generación de moléculas estables, mediante formulaciones de nanopartículas de quitosano. Finalmente, evaluamos el efecto de estas moléculas en especies no blanco, demostrando la especificidad de especie de este tipo de compuestos. En conjunto, los resultados de este proyecto generaron bases para el desarrollo de nuevas estrategias de control de una plaga de relevancia en la producción nacional.

**Ciencias Agrícolas / Biotecnología Agropecuaria / Biotecnología Agrícola y Biotecnología Alimentaria / Biología Molecular**

**Palabras clave:** *Piezodorus guildinii* / Soja / dsRNA /

### **Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.**

La producción de soja en la región (Brasil, Argentina, Paraguay, Bolivia y Uruguay) tiene el liderazgo en la producción global, estando dentro de los principales países exportadores, con el 61% de la producción total (vs. 39% de los EEUU) (MGAP-Opypa, 2022).

En nuestro país, la soja es uno de los pocos cultivos que tienen rentabilidad económica y donde se ha observado una alta tecnificación. Según datos de OPYPA, en la zafra 2021/22 se cultivaron 2,8 toneladas por hectárea y las exportaciones alcanzaron un récord histórico próximo a los 2.000 millones de dólares.

Los hemípteros fitófagos (chinchas), constituyen la mayor amenaza para el cultivo de soja en la región. Se alimentan de los granos en formación, reduciendo su calidad, el contenido de aceites, del poder germinativo y modificaciones en la su forma. Los hemípteros fitófagos tienen aparato bucal pico-suctor y tanto adultos como ninfas, durante el proceso de alimentación, perforan y rompen los tejidos vegetales con los estiletes externos (mandíbulas) e inyectan saliva que contiene fuertes agentes histolíticos que licúan las porciones sólidas o semisólidas de las células facilitando su ingestión. (Depieri & Panizzi, 2011). Cuando la alimentación se da durante la formación de granos ocasionan aborto de semillas o abscisión de vainas, en el período de llenado pueden causar disminución de tamaño, deformaciones y retención foliar. El poder germinativo y el vigor de las semillas disminuye, mientras que el contenido de aceite se ve afectado también (Panizzi, 1997).

*Piezodorus guildinii* (Westwood) es el hemíptero de mayor incidencia e importancia económica en Uruguay, es la más abundante y la que causa los mayores daños en la superficie y profundidad de los granos (Corrêa-Ferreira & De Azevedo, 2002; Depieri & Panizzi, 2011). Las hembras de esta especie desovan en las vainas, cada postura tiene entre 24 y 30 huevos y pudiendo llegar a 120 y 170 huevos (Zerbino et al., 2013). Después de un período de incubación de siete días, eclosionan dando lugar a las ninfas que pasan por cinco estadios y el ciclo de desarrollo de huevo hasta adulto dura de 35 a 40 días. Los adultos pueden colonizar la soja prácticamente durante todo su ciclo, pero sólo causan daños económicos cuando se alimentan de las vainas desde la formación y hasta madurez de vainas (R3-R7). Las ninfas de cuarto y quinto estadio de *P. guildinii* causan daños similares a los provocados por los adultos y la magnitud de los daños va a depender de la población alcanzada en esos momentos, y del tiempo de exposición a la infestación (Corrêa-Ferreira & De Azevedo, 2002).

El uso de insecticidas es aún la estrategia principal para controlar el desarrollo de la plaga cuando las poblaciones alcanzaron el umbral de daño económico, con las consecuencias negativas que ello implica (a nivel humano y de la fauna silvestre, polinizadores como abejas, los problemas de contaminación ambiental, de resurgencia y de resistencia de insectos plaga y la eliminación de organismos útiles). El control está basado en la aplicación de insecticidas piretroides y neonicotinoides. Se ha demostrado que estos compuestos impactan negativamente en enemigos naturales, son particularmente nocivos para abejas y tienen un efecto perjudicial en el ambiente (Balbuena et al., 2022; Giorio et al., 2021). En nuestro país, dependiendo de las condiciones climáticas, se puede llegar a 3 o 4 aplicaciones por año para el control de la chinche en el cultivo de soja. La falta de opciones para el control de estos insectos conduce a que se utilicen en una misma temporada y durante varios años principios activos con un modo de acción similar, favoreciendo la generación de resistencia.

La interferencia por RNA es un mecanismo natural de regulación génica que controla el nivel de transcripción (silenciamiento génico transcripcional) o un proceso de degradación del RNA mensajero basado en homología (silenciamiento génico postranscripcional) (Ambros, 2004). El mecanismo básico consiste en el procesamiento a nivel de citoplasma de una molécula (endógena o exógena) de RNA doble cadena por la ribonucleasa III Dicer a un dúplex pequeño de 21-23 nucleótidos (small interference, siRNA). De forma interesante, Dicer está conservada en eucariotas, por lo que la estrategia de RNA de interferencia es extensible a cualquier especie de insectos. Los siRNA resultantes son luego incorporados a un complejo proteico de silenciamiento conocido como RISC (RNA-induced silencing complex). Posteriormente, se separan las dos hebras del siRNA, manteniendo una en el complejo con la proteína Argonauta, conocida como la hebra guía. El complejo RISC al encontrar mRNA de secuencia complementaria a la hebra guía, cliva el mRNA con el dominio RNAasa H de Argonauta, silenciando de esta manera la expresión (Andrade, 2016).

El primer reporte de RNA de interferencia en animales fue en *Caenorhabditis elegans* donde la microinyección de dsRNA por Fire y Mello mostró una reducción en la expresión del gen *unc-22* (Fire et al., 1998). En estos trabajos iniciales de Fire y Mello se mostró que es posible generar un fenotipo letal en la progenie de *C. elegans* sumergiendo los gusanos en una solución conteniendo dsRNA específico del gen *pos-1*. (Fire et al., 1998). Son varios los reportes que evidencian administración oral exitosa de dsRNA en insectos en varias especies, tanto a través de dietas naturales o artificiales. Efectos insecticidas fueron reportados cuando dsRNA-vATPasa fue administrado por ingesta a diferentes especies entre las que se encuentran el escarabajo de la harina (*Tribolium costoneum*), áfidos (*A. pisum*), mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), y gusano del tabaco (*Manduca sexta*) (Whyard et al., 2009). Adicionalmente, la

depleción exitosa de la expresión de múltiples genes fue reportado en el psílido de tomate y papa *Bactericerca cockerelli* mediante la administración del dsRNA a través de dieta artificial (Wuriyanghan et al., 2011). Más aún, se observó interferencia por RNA mediante alimentación por goteo en la polilla de la manzana (*Epiphyas postvittana*) (Turner et al., 2006), larvas de la polilla del repollo (*Plutella xylostella*) (Anita et al., 2009). El desarrollo de estrategias efectivas de RNAi en insectos es una tarea compleja y algunas taxas presentan una gran variabilidad, sin embargo, son varios los reportes que evidencian efectos insecticidas mediante la administración oral de dsRNA tanto a través de dietas naturales o artificiales. Entre éstos, insectos del orden Coleóptera (escarabajos) han mostrado ser altamente susceptibles (Baum & Roberts, 2014). Insectos del orden Lepidóptera (polillas y mariposas), Díptera (moscas y mosquitos), y Hemíptera (áfidos, saltamontes y chinches) sin embargo, responden con mayor variabilidad (Cooper et al., 2019).

Interesantemente, varios trabajos han reportado resultados promisorios del efecto de dsRNA en la viabilidad de chinches que afectan cultivos de interés. A modo de ejemplo, efecto en la chinche marmolada marrón (*Halyomorpha halys*) por inyección así como ingesta de dsRNAs dirigidos a Serin/threonin Phosfatase (PPI), Baculoviral repeat-containing protein 7-B-like (IAP) y Vacuolar-sorting protein (SNF7), llegando a una mortalidad del 70% (Mogilicherla et al., 2018). Asimismo, trabajos en la principal chinche de la soja en Brasil, *Euschistus heros* mostraron un efecto en la administración oral de dsRNAs dirigidos a Actina y vATPase. De forma interesante, este trabajo reportó además que el efecto puede ser potenciado si la administración de dsRNA se formula con EDTA o encapsulamiento en liposomas (Castellanos et al., 2019). En esta chinche se presentó una patente donde la administración por ingesta de un dsRNA para el gen hunchback a hembras adultas no generó efectos en la viabilidad de los adultos, pero silenció el gen en huevos colectados de estas hembras con un consecuente efecto insecticida (Siegried et al., 2017).

Finalmente, se ha mostrado el efecto de la inyección de dsRNAs en la chinche de la soja presente en nuestro país, *Nezara viridula*, con mortalidad mayor al 75% con blanco en los genes Actina, Acetil-CoA carboxilasa, Chitin Synthase mediante inyección (Riga et al., 2020) así como 100% y 70% de mortalidad cuando se administra dsRNA con blanco en SNF7 por inyección e ingesta, respectivamente (Gurusamy, Howell, et al., 2020).

Una de las principales dificultades en el desarrollo de formulaciones comerciales basados en RNAi es la sensibilidad a la degradación por nucleasas del huésped y del ambiente reduciendo su eficacia (Christiaens et al., 2020). Reportes mostraron persistencia de dsRNA por asperjado sobre plantas de hasta 25 días. Sin embargo, la vida media en el campo fue reportada de alrededor de 1,5 días, insuficiente para aplicaciones comerciales (San Miguel & Scott, 2016). Varias estrategias se han desarrollado para potenciar el efecto de la administración oral de dsRNAs. Por un lado, reactivos utilizados en transfección de células para encapsular el dsRNA en complejos de liposomas catiónicos que reducen la degradación y aumentan la efectividad del silenciamiento. Otra alternativa es el uso de agentes quelantes en conjunto con dsRNAs, que pueden actuar como inhibidores de nucleasas presentes en la saliva (Christiaens et al., 2020). Por otra parte, modificaciones químicas en una o en ambas hebras del dsRNA puede aumentar la estabilidad y expandir la vida media en circulación manteniendo el reconocimiento biológico (Deleavey & Damha, 2012). El uso de nanopartículas puede reducir la degradación e incrementar la incorporación celular del dsRNA. Se ha descrito el uso de polímeros naturales como el quitosano para encapsular dsRNA y lograr interferencia en mosquitos (Zhang et al., 2010). Finalmente, otra estrategia es el uso de virus modificados para producir dsRNAs deseados en el propio insecto. La principal ventaja de este método es la alta eficiencia debida al uso de los mecanismos propios de infección del virus (Kolliopoulou et al., 2017).

Ante la creciente necesidad de alternativas a pesticidas químicos, el uso de RNA de interferencia emerge

como una estrategia de alta especificidad, dada la restricción de secuencia, bajo impacto ambiental debido a su corta vida media, y su posible implementación no transgénica (Christiaens et al., 2020).

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente planteados, el proyecto tiene como hipótesis que la administración de RNA doble cadena con homología a genes esenciales de *Piezodorus guildinii* puede desencadenar silenciamiento génico y tener un efecto sobre su viabilidad. De esta forma se podrán generar moléculas de interés comercial que permitan reducir o sustituir la dependencia a insecticidas químicos, único método de control para dicha plaga.

## Metodología/Diseño del estudio

### Cría de insectos

La cría de insectos se realizó en el laboratorio de Entomología de INIA La Estanzuela. Brevemente, adultos de *P. guildinii* colectados del campo de INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay (S34° 20' W 57°41') se mantuvieron en cajas de plástico transparente (25x20x20cm). Las chinches se alimentaron con chauchas (*Phaseolus vulgaris* L.) o semillas de soja (*Glycine max*) y suministro diario de agua. Tras cada muda, las ninfas se transfirieron a placas nuevas. En todos los casos, las condiciones de temperatura y humedad fueron de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $80 \pm 10\%$  RH y un fotoperíodo de 14:10h Luz: Oscuridad.

### Transcriptómica de *P. guildinii* en diferentes estadíos de desarrollo

Ninfas de todos los estadíos y adultos, (machos y hembras), fueron homogenizados con mortero en nitrógeno líquido y el RNA total fue purificado con el kit RNAEasy Mini Kit de Qiagen según las instrucciones del fabricante. Se cuantificó la concentración de RNA total en Nanodrop 8000 (ThermoScientific), su calidad en Bioanalyzer (Agilent Technologies) Servicio de la Plataforma y Secuenciación masiva, IIBCE y en geles de agarosa 1,5%. Se generó un pool de 1µg de RNA con todos los estadíos de desarrollo. Se generaron librerías Illumina TruSeq stranded mRNA y se secuenció en la plataforma Illumina HiSeq, con una cobertura de 75G (1 lane) de lecturas (reads) pareadas (paired-end) de 150 pb de longitud, en Macrogen Corea. En todas las etapas el control de calidad se realizó mediante lecturas en Bioanalyzer.

Los reads obtenidos fueron analizados en su calidad con el programa FastQC y filtrados en base a varias estrategias. Se analizaron k-mers erróneos con r-Corrector, se eliminaron los pares no reparables, se eliminaron los adaptadores y bases con un Phred score menor a 30 con TrimmGalore. Reads procedentes de RNA ribosomal, fueron identificados por mapeo contra la base SILVA LSU Y SSU ([www.arb.silva.de](http://www.arb.silva.de)), utilizando Bowtie2. Los reads que no mapearon se conservaron y fueron utilizados para el ensamblado de novo del transcriptoma utilizando Trinity con los parámetros por defecto (kmer=25). La calidad del ensamblado fue analizada evaluando la proporción de pares de reads que mapean con el ensamblado con Bowtie2, la completitud con BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs) y el número de transcriptos completos codificantes mediante búsqueda de homología con la base de datos BLASTx de NCBI (The National Center for Biotechnology Information) con un cut off E-value  $1 \times 10^{-20}$ .

Se utilizó CD-HIT-EST con una similitud del 95% para reducir la redundancia y el software TransDecoder identificó regiones codificantes con un mínimo de 100 aminoácidos y marcos abiertos de lectura. Los péptidos candidatos fueron utilizados en una búsqueda de homología BLASTp contra la base de datos curada SwissProt. Se realizó búsqueda de homología BLASTx contra las bases de datos Uniprot\_SwissProt, non-redundant protein Db (nr) de NCBI y Uniprot\_treEMBL. La herramienta InterproScan disponible en el software omicsBox (<https://www.biobam.com/omicsbox>) se utilizó para la búsqueda de dominios conservados y familias de proteínas utilizando la base de datos InterPro, el cual incorpora 13 bases de datos complementarias (Zdobnov & Apweiler, 2001).

Los contigs identificados por BLASTx, (incorporando hits identificados en las tres bases de datos

analizadas) fueron mapeadas y categorías de ontología génica (GO) (Gene Ontology) fueron asignados según el pipeline disponible en el software Omixbox para luego combinarse con aquellos provenientes de la base de datos interpro, para obtener las estadísticas de la anotación funcional.

De forma adicional, se realizó una búsqueda de homología en la base de datos no curada EggNog (<http://eggnog5.embl.de/#/app/home>) (Huerta-Cepas et al., 2019) para complementar la anotación funcional.

#### Selección, diseño y síntesis de dsRNA

Se seleccionaron 11 genes con reportes de actividad en las chinches *H. halys*, *E. heros*, y *N. viridula* y se obtuvieron las secuencias a partir del transcriptoma de *P. guildinii*. En el diseño de los dsRNA se consideraron regiones de 300 a 500pb que fueran poco conservadas y se evaluó la homología con secuencias no blanco de otras especies mediante búsqueda BLASTx contra la base de datos RefSeq de mRNA de NCBI. Se consideró prioritario, que no exista homología con especies benéficas. Como control negativo, se diseñó un dsRNA conteniendo 500pb de la secuencia del gen de la proteína GFP.

El molde para la síntesis de dsRNA se generó por PCR a partir de cDNA de *P. guildinii* y primers específicos conteniendo además la secuencia para el promotor T7. Los productos de amplificación fueron purificados por precipitación con Isopropanol 75%, resuspendidos en 15µl de agua ultrapura, cuantificados en nanodrop y analizados en geles de agarosa al y secuenciados (Macrogen Corea) para confirmar la identidad de los mismos.

Los dsRNAs fueron sintetizados in-vitro utilizando el kit MEGAscript T7 RNA kit (Thermo). Para cada reacción se utilizaron 1,2µg de molde de cDNA siguiendo las instrucciones del fabricante. El dsRNA fue purificado utilizando Phenol y resuspendido en agua ultrapura, cuantificado en nanodrop y analizado en geles de agarosa al 1,5%. Los dsRNAs se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

#### Evaluación de la actividad inhibitoria de los dsRNA seleccionados

El efecto de la administración de dsRNAs, se evaluó en primer lugar por microinyección. Para ello, grupos de 57 adultos fueron anestesiados en hielo durante 5 minutos para luego ser inyectados con una jeringa Hamilton acoplada a un repetidor PB600 (Hamilton – Nevada) utilizando una aguja 33G. El sitio de inyección fue la región metatorácica central, cerca de la coxa donde se inyectó 1ul por adulto de dsRNA a 1.2ug/ul. Se siguió la sobrevida de 30 insectos durante 14 días, mientras que se destinaron 27 insectos para determinar silenciamiento génico por qPCR, tomando muestras a las 24, 48 y 72 horas post inyección. La sobrevida se evaluó con curvas Kaplan-Meier y el log-rank test con corrección de Bonferroni para la comparación de a pares. Se consideraron significativos aquellos grupos con  $p < 0.05$ .

Se seleccionaron los 3 interferentes que mostraron mayor mortalidad por inyección para evaluar su efecto por ingesta. En estos ensayos, 52 insectos por grupo se mantuvieron en ayuna por 24 horas. Cada insecto fue luego colocado en una placa de Petri conteniendo una gota de sucrosa 2.5%, y dsRNA a 0.33ug/ul. Una vez ingerida, las chinches fueron colocadas en placas de Petri con alimento y agua ad-livium. Se destinaron 25 insectos para evaluar sobrevida y 27 para evidenciar silenciamiento génico por qPCR. La sobrevida se evaluó de forma análoga a la descrita para los ensayos por inyección. En todos los casos, los ensayos se realizaron por duplicado.

#### RT-qPCR

Se utilizó el equipo QuantStudio™ 3 Real-Time PCR (Applied Biosystems) en placas de 96 pocillos. Las reacciones incluyeron 2µl de cDNA en la dilución adecuada (1-1/15 para curvas de eficiencia, 1/6 para cuantificación relativa) utilizando el kit iQ SYBR Green Supermix 2X (Bio-rad), 0,25µl dNTPs (10µM) y Agua Ultrapura para un volumen final de 10 µl.

La eficiencia de los primers se determinó a partir de diluciones seriadas de cDNA de 1 a 1/15 con tres réplicas técnicas por condición con la ecuación  $E = (10^{(-1/pend)} - 1) * 100$ , siendo  $pend$  la pendiente del gráfico  $\text{Log}[\text{dilución}] = f(\text{Ct})$ . Asimismo, se confirmó la presencia de un único pico en curvas de melting en el rango 65-90°C, y se comprobó la presencia de un único producto en geles de agarosa 1,5%.

Se evaluaron 5 genes housekeeping descritos en *H. halys* 18S, 60S ribosomal protein (60S) (Mogilicherla, Howell, & Palli, 2018), Actin related protein 8 (ARP8), ADP ribosylation factor 2A (AD) y Ubiquitin conjugation factor E4 A (Ub) (Bansal et al., 2016). La selección de los genes normalizadores se realizó utilizando el software RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>),

Tanto en los ensayos de inyección como ingesta se utilizaron 3 réplicas biológicas a partir de un pool de 3 insectos y 3 réplicas técnicas. La normalización de los datos se realizó con los genes endógenos 18S y 60S. La expresión relativa fue calculada con la ecuación de Livak., diferencias significativas entre el grupo evaluado y el grupo control se calculó por un t-test no pareado (P-value <0.05, n=3).

**Síntesis y caracterización de nano-complejos de dsRNA-quitosano.**

Se evaluó la conjugación de dsRNAs a nanopartículas de quitosano. Para ello, se siguió el protocolo descrito previamente (H. Quiao et al., 2020). Brevemente, se evaluó la conjugación de dsRNA con quitosano en las proporciones 2:1, 1:1 y 1:2. Para ello se mezclaron volúmenes iguales de dsRNA en buffer Sulfato de sodio 50mM y quitosano 0.2% (m/v) en buffer acetato de sodio 0.1M pH 4.5, se incubó durante 1 min a 55°C y luego se vortexeó durante 30 segundos. Las nanopartículas se recuperaron por centrifugación durante 1 hora a 13000g a 4°C. El pellet se resuspendió en agua mili-Q. Los complejos generados fueron caracterizados por dispersión dinámica de la luz y electroforesis doppler láser mediante un NanoZetasizer para determinar tamaño, índice de polidispersidad (PDI) y potencial Z. Asimismo, se determinó la morfología y el diámetro de los nanosistemas por microscopía electrónica de transmisión, con tinción negativa de las muestras.

**Evaluación de la estabilidad de dsRNA y dsRNA-quitosano**

Se determinó la estabilidad de dsRNAs desnudos respecto a aquellos formulados en ensayos de degradación enzimática con RNAasas (30U), hemolinfa (1/10) y jugos gástricos proveniente de adultos. En todos los casos se incubó 1 µg/µl de dsRNA y se tomaron muestras a los 10, 30, 60 y 120 minutos. El RNA fue recuperado con Trizol según las indicaciones del fabricante y la integridad de los mismos fue evidenciada en geles de agarosa al 1,5%.

**Evaluación en especies no blanco**

Se evaluó el efecto de las moléculas estudiadas sobre insectos no blanco, particularmente en abejas melíferas. Estos son los principales polinizadores de plantas silvestres y cultivadas y son ampliamente utilizados como modelos en este tipo de estudios. Trabajamos en colaboración con el grupo de la Dra. Belen Branchiccela de la sección Apicultura de INIA La Estanzuela.

Se evaluó el efecto de la ingesta del que mostró mayor mortalidad en abejas melíferas. Grupos de 120 adultos con 1 día de emergidos fueron divididos en grupos de 60 y tratados con agua:sucrosa conteniendo 1 o 2ug de dsRNA por insecto (60/120ug por jaula desde una jeringa de 3ml). Los grupos fueron agua, GFP, Spr54 (1) y Spr54 (2). Las condiciones de cría fueron 32°C, 75% Humedad y se siguió la mortalidad y el consumo de alimento durante 20 días. La sobrevivencia se evaluó con curvas Kaplan-Meier y el log-rank test con corrección de Bonferroni para la comparación de a pares. Se consideraron significativos aquellos grupos con p< 0.05.

Si bien, la inocuidad implica el seguimiento de otras características a dosis sub-letales, esta fue una primera aproximación para el estudio del efecto de dsRNAs dirigidos a *P. guildinii* en insectos no blanco.

## **Resultados, análisis y discusión**

**Transcriptómica de *P. guildinii* en diferentes estadios de desarrollo**

El número total de reads fue de 520,093,434, correspondiendo a 260.046.717 pareados sin procesar (crudos) con un contenido GC de 41.88 %. A través del proceso de filtrado por calidad descrito en Materiales y Métodos, se eliminaron 50.599.592 reads (19,4%). El ensamblado del transcriptoma de *P. guildinii* se realizó a partir de los reads de alta calidad filtrados en el paso anterior con el software Trinity y resultó en 172.298

transcriptos, correspondiendo a 119.178 unigenes. El contenido GC fue de 35,57%, similar a lo reportado para *E. heros* (37,12%) (Cagliari et al., 2020). En un ensamblado de buena calidad se espera que al menos un 70% de los reads existan como "proper pairs" es decir que el ensamblado contenga el par de reads original. Las estadísticas del mapeo indicaron que un 97.49% (Tabla 3) de los reads pareados fueron incluidos en el ensamblado, mostrando una muy buena representación. Asimismo, se destaca, que solamente 5 de 1066 genes (0.5%) no fueron identificados con la herramienta BUSCO lo que implica una buena cobertura del transcriptoma. Finalmente, se evaluó el número de transcritos codificantes reconstruidos mediante BLASTx del ensamblado contra la base de datos Swissprot, 4499 hits tuvieron una cobertura mayor o igual al 90%. Finalmente, se redujo el número de transcriptos totales en 21.213, con CD-HIT. Este transcriptoma curado fue utilizado en la anotación funcional.

En la identificación funcional de los contigs generados, se realizó una búsqueda BLASTx (cut-off E-value  $> 10^{-5}$ ) con las bases de datos RefSeq non redundant protein db (nr) de NCBI filtrando por taxa insecta (50557), la base de datos UniProt-SwissProt y una base de datos generada a partir de las entradas de taxa insecta de trEBMLE. Se obtuvieron 55.706 hits con la base de datos nr (36,8%), 33.490 con SwissProt (22%), mientras que el BLASTx contra la base de datos TrEMBLE arrojó 52.721 coincidencias (36,8%). Tomando en conjunto los resultados únicos de todas las bases de datos, se obtuvieron 58.922 hits, correspondiendo a un 39% del total analizado (figura 1A). Estos datos son similares a los reportados para el transcriptoma de *E. heros* (Cagliari et al., 2020). Si se comparan las bases de datos utilizadas, un 53,60% de los transcritos son identificadas por las tres. Por otra parte, la base de datos nr de NCBI, fue la que identificó un mayor número de contigs únicos (9.44%) como se esquematiza en la figura 1B. Las proteínas identificadas por dicha base de datos provienen en un 76,8% de especies del orden hemíptera, donde se destacan Hemíptera:pentatomidae *H. halys* con un 65% de los resultados y *N. viridula* 0,2%; El resto se reparte en Hemíptera:Aphidae 4% (*Aphis craccivora*, *Aphis glycines*), Hemiptera:Delphacidae 2.16% (*Nilaparvata lugens*, *Laodelphax striatellus*), Hemiptera:Miridae 2.08% (*Apolygus lucorum*, *Nesidiocoris tenuis*), Hemiptera:cimicidae 1,79% (*Cimex lectularius*) y Hemiptera:psyllia 0.8% (*Diaphorina citri*). Los hits restantes se repartieron entre especies de los órdenes Himenóptera 3,9%, Coleóptera 2,4%, Lepidóptera 2,16% y Díptera 1.19% entre otros 13% (Figura 1c). Cabe destacar, que BLAST analiza homología de secuencia por lo que la representatividad de especies es dependiente de la base de datos utilizada y no implica relaciones filogenéticas.

#### Selección, diseño y síntesis de dsRNA

Se seleccionaron once genes blanco a partir de reportes previos: subunidad catalítica A ATPasa vacuolar (vATPasa-A), Signal recognition particle 54kDa (Spr54), subunidad alfa del proteasoma (Prosa), Actina (Act), Quitín sintasa (Chs), Acetyl-CoA carboxylasa (ACC), Proteína de sorting Vacuolar (Snf-7), Proteína de inhibición de apoptosis (IAP), Serin/treonin- fosfatasa -subunidad catalítica beta (PPI), Arginina quinasa (AK) y superóxido dismutasa (SOD). Para cada blanco, se identificó la secuencia en el transcriptoma y se diseñaron dsRNAs entre 300 y 500 pb con baja homología a organismos no blanco y una secuencia de 496bp de la proteína GFP como control negativo. Los dsRNAs se sintetizaron por transcripción in-vitro a partir de cDNA de *P. guildinii* y todas las secuencias fueron confirmada por secuenciación.

#### Evaluación de la actividad inhibitoria de los dsRNA seleccionados

El efecto de la inyección de once dsRNA dirigidos a genes blanco fue evaluado respecto a grupos controles tratados con agua o un dsRNA dirigido a GFP. Diferencias significativas se observaron considerando la globalidad del ensayo según Log-Rank test ( $\chi^2=170$ ,  $df=12$  P-value  $<0.000.1$ ). Los interferentes que mostraron mayor mortalidad acumulada a los 14 días superaron el 80% de forma significativa ( $P<0.001$ ) y se seleccionaron para evaluarlos por ingesta.

En ensayos de ingesta, el modelo planteado, no considera el transporte del interferente a través de la planta ni las posibles RNAasas presentes en las mismas. De esta forma se evaluó el efecto de dsRNAs



desnudos en presencia de enzimas degradativas en saliva, y aparato digestivo. Se observaron diferencias significativas para el ensayo por Log-Rank Test global ( $X^2=24,69$ ,  $df=4$   $P<0.0001$ ) observándose valores de mortalidad corregida de 43,5% ( $P=0.011$ ), 49,2% ( $P=0.022$ ) y 46,3% ( $P=0.034$ ).

Se evaluó el efecto en la mortalidad en ensayos de ingesta a 14 días de las nanopartículas de quitosano generadas. Diferencias significativas se observaron considerando la globalidad del ensayo según Log-Rank test ( $P\text{-value}=0.0079$ ). El grupo correspondiente al interferente-quitosano mostró diferencias significativas respecto al grupo control GFP y GFP-CS ( $p\text{-value}=0.011$  y  $0.03$ ), mientras que no mostró diferencias significativas con el interferente sin modificar. Cabe destacar que la mortalidad corregida del interferente modificado fue de 72,2%, aproximadamente un 20% más que el interferente sin modificar.

#### RT-qPCR

Se analizaron cinco genes normalizadores con la herramienta Reffinder y se determinó que los genes más estables entre los evaluados son 18S y 60S.

Se determinó el nivel relativo de expresión del gen vATPasa A, gen utilizado como prueba de concepto, así como el nivel de los tres genes que mostraron mayor efecto en la mortalidad. Se observó una disminución significativa de la expresión relativa a las 24, 48 y 72hs en los insectos tratados con vATPasa A, y los tres blancos seleccionados. De forma complementaria, se evaluó en el grupo tratado con vATPasa A, los niveles de expresión de las proteínas relacionadas con la maquinaria de silenciamiento Argonauta-2 y Dicer-2. Para Dicer-2, diferencias significativas con el control se observaron a las 48hs con una sobre-expresión de 1.8 veces respecto al grupo control mientras que para Argonauta-2, se observó un aumento en la expresión relativa del gen a las 24hs llegando a las 48hs a 1.8 veces respecto al grupo control.

Se determinó el nivel de expresión por RT-qPCR del gen blanco tras ingesta del interferente conjugado a quitosano a las 24, 48 y 72hs post ingesta. En todos los casos se observó una reducción de los niveles de expresión del gen blanco, siendo significativos a las 48 y 72hs con una reducción en los niveles de expresión del 67 y 73% respectivamente ( $p\text{-valor}$  0.04 y 0.02). Si se compara estos resultados con los del interferente sin modificar, evidenciamos una respuesta de silenciamiento más fuerte en la nanopartícula lo que podría explicar un efecto mayor en la mortalidad.

#### Formulación en complejos de quitosano

Las nanopartículas de quitosano fueron preparadas de acuerdo con el procedimiento reportado por H. Qiao et al. Se generaron nanocomplejos CS:RNA con relación en masa 2:1, 1:1 y 1:2 respectivamente. La eficiencia de encapsulación de los nanocomplejos fue determinada cuantificando el RNA libre luego del encapsulamiento, mientras el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta de las nanopartículas fueron medidas en Nano Zetasizer. Todas las formulaciones presentaron una excelente eficiencia de encapsulación superior al 80 %, siendo la formulación CS:RNA 2:1 la que posee menor tamaño de partícula (155.8 nm), y un potencial Z alto (19.2mV) indicativo de buena estabilidad coloidal del sistema. Mediante microscopía electrónica de transmisión se observaron partículas del tamaño esperado de forma irregular así como complejos de mayor tamaño.

#### Evaluación de la estabilidad de dsRNA y dsRNA-quitosano

Se determinó la estabilidad de las nanopartículas vs dsRNA en ensayos de degradación enzimática con RNAasas, hemolinfa y jugos gástricos proveniente de adultos. En todos los casos se incubó 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de dsRNA y se tomaron muestras a los 10, 30, 60 y 120 minutos. Se evidenció la integridad del dsRNA mediante geles de agarosa al 1,5%. En el caso de estabilidad a RNAasas, el RNA sin modificar es degradado a los 30 minutos luego de ser incubado con 30U de Mnase, jugos gástricos o hemolinfa, mientras que el conjugado con quitosano es estable dos horas después para la RNAasa y los jugos gástricos y 1 hora para hemolinfa.

#### Evaluación en especies no blanco

Se evaluó el efecto de la ingesta del que mostró mayor mortalidad en abejas melíferas. Grupos de 120

adultos con 1 día de emergidos fueron divididos en grupos de 60 y tratados con agua:sucrosa conteniendo 1 o 2ug de dsRNA por insecto (60/120ug por jaula desde una jeringa de 3ml). Los grupos fueron agua, GFP, Interferente a la concentración de trabajo en chinches 1ug/insecto (1) e interferente al doble de la concentración 2ug/insecto (2). Las condiciones de cría fueron 32°C, 75% Humedad y se siguió la mortalidad y el consumo de alimento durante 20 días. La sobrevivencia se evaluó con curvas Kaplan-Meier y el log-rank test con corrección de Bonferroni para la comparación de a pares. No se observaron diferencias significativas entre los grupos Agua, GFP y (2) a 2ug/ul. Sin embargo, en el grupo tratado con 1ug/ul se observó una diferencia significativa respecto al grupo Agua (p-valor = 0.01) no observada respecto a GFP (p-valor= 1). Estos resultados ponen de manifiesto que la concentración de aplicación debe ser analizada para trabajar en las condiciones que no tienen un efecto en organismos no blanco.

Estudio de propiedad intelectual y protección de las moléculas generadas

Se realizó un estudio de Libertad de Operación y del estado de patentamiento de las moléculas candidatas estudiadas sin modificar. Este estudio evaluó a nivel de secuencia las patentes registradas a nivel internacional y concluyó que de las tres moléculas en estudio, una no cuenta con protección en ninguna de las bases de datos evaluadas. Si bien las otras dos, están registradas, el estado de patentamiento varía según los países y hace aún viable su uso para la modificación química y posterior registro.

Se presentó la patente provisional N° US 63/498,418 con fecha 26 de Abril de 2023, HEMIPTERAN CONTROL PEST IN CROPS USING RNAi, con inventores Marco Dalla Rizza y Claudia Schwartzman del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria.

## Conclusiones y recomendaciones

El desarrollo de bio-plaguicidas basados en RNA está cobrando impulso como una alternativa emergente mundialmente de control de plagas, patógenos e inclusive malezas dirigidos con precisión y especificidad. La entrega estable del dsRNA aplicado tópicamente y la extensión de la duración de la protección son las limitaciones que debe superar un producto comercialmente viable. Para la implementación de esta tecnología tópica de RNAi es clave el desarrollo de marcos regulatorios, la identificación de riesgos y el establecimiento de estrategias de prevención y mitigación. Esta tecnología es considerada la nueva ola de protección de cultivos y a través de este proyecto se evaluó su contribución en el control de la chinche de la soja. Se eligió el insecto plaga de mayor interés económico para el principal cultivo de nuestro país y con limitaciones actuales en la capacidad de control de dicha plaga. Para evaluar el potencial del RNA como herramienta de control de la chinche de la soja, en primer lugar generamos un transcriptoma de todos los estadios de desarrollo de *P. guildinii*, dado que no había información de secuencias disponibles al comienzo del proyecto. Este encare nos permitió identificar los componentes de la maquinaria de RNAi, las secuencias de genes blanco así como genes normalizadores (housekeeping). Recientemente, se ha publicado el ensamblado de un genoma completo (Saha et al., 2022). En conjunto, estos datos generan información complementaria que ampliará el conocimiento de la biología de esta especie.

Las diferencias en la respuesta a RNAi entre insectos puede ser explicada parcialmente por la diversidad en los genes de RNAi presentes en diferentes linajes. Para aumentar el entendimiento de este proceso, analizamos el transcriptoma de *P. guildinii* y anotamos genes relacionados a este proceso, pudiendo identificar 56 secuencias de las tres vías de RNAi. Adicionalmente pudimos identificar componentes de

internalización celular, fundamentales para la respuesta, así como la presencia de varias RNAsas, las que limitan el efecto observado ante la administración de dsRNAs.

Una vez que identificamos transcritos homólogos a genes esenciales de RNAi en *P. guildinii*, evaluamos in vivo si la maquinaria es funcional mediante inyección de un interferente dirigido a vATPasaA. Pudimos evidenciar, una reducción en los niveles de expresión del gen blanco, así como un aumento en genes relacionados a la respuesta de RNAi. De forma complementaria, evidenciamos diferencias significativas en la mortalidad de aquellos insectos tratados con dsRNA específico para vATPasaA. De esta manera, demostramos, que *P. guildinii* responde al RNAi y que la reducción de niveles en genes esenciales tiene un efecto en la sobrevivencia. A continuación evaluamos 10 dsRNAs diseñados a partir de secuencias específicas de especie. Pudimos observar diferencias significativas en la mortalidad en ensayos a 14 días en 9 de los 11 interferentes evaluados, llegando a valores de mortalidad corregida mayores al 80%. El efecto de la inyección fue evaluado adicionalmente por RT-qPCR. Observamos una disminución en la expresión relativa de todos los genes blanco evaluados a las 72 horas post inyección.

A partir de estos resultados, evaluamos el efecto de los tres interferentes que mostraron mayor respuesta en ensayos de ingesta, mecanismo por el cual funcionaría un insecticida de aplicación tópica a campo. En estos ensayos volvimos a observar diferencias significativas en la mortalidad a 14 días, la mortalidad corregida llegó a valores del 49.2%, siendo notoriamente menor a lo observado por inyección. De forma análoga, se evaluó el silenciamiento por RT-qPCR de la región intestinal media de los insectos, donde la reducción en niveles de expresión a los 72hs fue significativa, pero menos marcada que en los ensayos de inyección.

Una de las principales dificultades en el desarrollo de formulaciones comerciales basados en RNAi es la sensibilidad a la degradación por nucleasas del huésped y de factores ambientales, como la radiación UV, reduciendo su eficacia (Christiaens et al., 2020). A nivel del insecto, ha sido demostrado que una vez consumidos, los dsRNAs deben evitar la degradación por nucleasas de las glándulas salivales, el intestino medio y la hemolinfa. Particularmente en hemípteros, se ha determinado una alta actividad de ribonucleasas a nivel de las glándulas salivales (Christiaens et al., 2014). Varias estrategias se han desarrollado para potenciar el efecto de la administración oral de dsRNAs. En ese sentido, el presente proyecto evaluó generar formulaciones estables con las moléculas estudiadas y trabajamos en la formulación de nanopartículas de quitosano. Se ajustaron protocolos para la síntesis de complejos dsRNA-quitosano, las que fueron caracterizadas y evaluadas por administración oral y a nivel molecular y en su estabilidad ante la presencia de RNAsas. Verificamos un aumento del 20% en la mortalidad en ensayos de ingesta, así como una mayor estabilidad en ensayos in-vitro. Estos resultados son promisorios para avanzar en el desarrollo de moléculas basadas en RNAi con actividad insecticida estables.

Finalmente, evaluamos el efecto de las moléculas estudiadas sobre insectos no blanco, particularmente en abejas melíferas. Ampliamente utilizados como modelos en este tipo de estudios, de hecho, ya se han utilizado para evaluar el efecto de los compuestos químicos utilizados en el control clásico de *P. guildinii* (Balbuena et al., 2022). Pudimos evidenciar, en ensayos de ingesta que el doble de la concentración utilizada no tiene un efecto en la mortalidad, análogo a la ingesta de agua o del interferente control.

De forma complementaria, evaluamos el estado del arte de la propiedad intelectual de las moléculas generadas mediante una búsqueda de antecedentes y Análisis de patentabilidad realizado por Fischer Abogados. A partir de resultados arrojados por la búsqueda realizada, se concluyó que es posible concluir que actualmente se conocen los métodos para el control de plagas hemípteras, incluyendo *P. guildinii*, que involucran el uso de RNAi pero, en el estado del arte no se divulga una de las secuencias empleadas constituyendo la secuencia para la molécula Spr54. Basados en esto, se generó una presentación de patente provisional en Estados Unidos US 63/498,418 Schwartzman&Dalla-Rizza, (2023) la cual se adjunta al presente informe.

La generación de estrategias de control de plagas mediante RNAi es una tarea compleja que depende de numerosas variables desde la presencia y número de copias de las proteínas de la maquinaria de RNAi, la elección de los genes blanco, el diseño de los dsRNA a las estrategias de delivery que deben superar la degradación por nucleasas, la incorporación celular y la diseminación sistémica (Jain et al., 2021). En este contexto, el presente trabajo generó información que puede ser útil en la selección y diseño de nuevos blancos, demostró la actividad insecticida de moléculas basadas en RNAi y evaluó los componentes moleculares implicados en dicho proceso. Más aún, avanzamos en el desarrollo de moléculas estables para su aplicación en planta, mediante la conjugación en nanopartículas de quitina. Finalmente, comprobamos que estas moléculas no generan efectos significativos en la mortalidad de abejas melíferas a concentraciones superiores de las de trabajo, mostrando la especificidad de especie de estas moléculas. Este proyecto identificó tres moléculas de dsRNA (protegidas provisoriamente por INIA) y que establece la base para continuar su estudio de estabilidad y prueba con chinches para verificar su mejorar de eficacia por ingesta.

Los resultados generados en este proyecto sienta las bases para la generación de nuevas estrategias de control de *P. guildinii* basados en la tecnología de RNAi de uso tópico, denominadas biotecnologías verdes, que se está desarrollando aceleradamente en el mundo para control de insectos, hongos y malezas y donde nuestro país tiene capacidades para generar valor.

## Referencias bibliográficas

- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006), 350–355. <https://doi.org/10.1038/nature02871>
- Amdam, G. V., Simões, Z. L. P., Guidugli, K. R., Norberg, K., & Omholt, S. W. (2003). Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra- abdominal injection of double-stranded RNA. *8*, 1–8.
- Andrade, E. C. de. (2016). RNA Interference – Natural Gene-Based Technology for Highly Specific Pest Control (HiSPeC) (W. B. H. E.-I. Y. Abdurakhmonov, Ed.; p. Ch. 19). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/61612>
- Anita, M., Bautista, M., Miyata, T., Miura, K., & Tanaka, T. (2009). RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(1), 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.09.005>
- Arhancet, J., Cheerla, S., Arhancet, G. B., & Rozema, D. (2018). Post-transcriptionally chemically modified double strand RNAs (Patent US2018/0127753A1).
- Balbuena, S., Castelli, L., Zunino, P., & Antúnez, K. (2022). Effect of Chronic Exposure to Sublethal Doses of Imidacloprid and *Nosema ceranae* on Immunity, Gut Microbiota, and Survival of Africanized Honey Bees. *Microbial Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02014-8>
- Baum, J. A., & Roberts, J. K. (2014). Progress Towards RNAi-Mediated Insect Pest Management. In *Advances in Insect Physiology* (1st ed., Vol. 47). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800197-4.00005-1>
- Castellanos, N. L., Smagghe, G., Sharma, R., Oliveira, E. E., & Christiaens, O. (2019). Liposome encapsulation and EDTA formulation of dsRNA targeting essential genes increase oral RNAi-caused mortality in the Neotropical stink bug *Euschistus heros*. *Pest Management Science*, 75(2), 537–548. <https://doi.org/10.1002/ps.5167>
- Christiaens, O., & Smagghe, G. (2014). The challenge of RNAi-mediated control of hemipterans. *Current Opinion in Insect Science*, 6, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.09.012>
- Christiaens, O., Swevers, L., & Smagghe, G. (2014). DsRNA degradation in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) associated with lack of response in RNAi feeding and injection assay. *Peptides*, 53, 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.12.014>
- Christiaens, O., Whyard, S., Vélez, A. M., & Smagghe, G. (2020). Double-Stranded RNA Technology to Control Insect Pests?: Current Status and Challenges. *11*(April), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00451>
- Cooper, A. M. W., Silver, K., Zhang, J., Park, Y., & Zhu, K. Y. (2019). Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. *Pest Management Science*, 75(1), 18–28. <https://doi.org/10.1002/ps.5126>
- Corrêa-Ferreira, B. S., & De Azevedo, J. (2002). Soybean seed damage by different species of stink bugs. *Agricultural and Forest Entomology*, 4(2), 145–150. <https://doi.org/10.1046/j.1461-9563.2002.00136.x>
- Deleavey, G. F., & Damha, M. J. (2012). Designing chemically modified oligonucleotides for targeted gene silencing. *Chemistry & Biology*, 19(8), 937–954. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.07.011>
- Depieri, R., & Panizzi, A. (2011). Duration of feeding and superficial and in-depth damage to soybean seed by selected species of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology*, 40(2), 197–203. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2011000200007>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *391*(February), 806–811.
- Giorio, C., Sánchez-Bayo, F., & Bijleveld van Lexmond, Maarten, Bonmatin, J. M. (2021). An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. *Environmental Science and Pollution*

Research, 28(10), 11709–11715. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12853-6>

Gurusamy, D., Howell, J. L., Chereddy, S. C. R. R., Koo, J., & Reddy, S. (2020). Transport of orally delivered dsRNA in southern green stink bug, *Nezara viridula*. February, 1–18. <https://doi.org/10.1002/arch.21692>

Gurusamy, D., Mogilicherla, K., & Palli, S. R. (2020). Chitosan nanoparticles help double-stranded RNA escape from endosomes and improve RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 104(4). <https://doi.org/10.1002/arch.21677>

Jain, R. G., Robinson, K. E., Asgari, S., & Mitter, N. (2021). Current scenario of RNAi-based hemipteran control. *Pest Management Science*, 77(5), 2188–2196. <https://doi.org/10.1002/ps.6153>

Jaubert-Possamai, S., Le Trionnaire, G., Bonhomme, J., Christophides, G. K., Rispe, C., & Tagu, D. (2007). Gene knockdown by RNAi in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *BMC Biotechnology*, 7, 7–9. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-63>

Kennerdell, J. R., & Carthew, R. W. (1998). Use of dsRNA-Mediated Genetic Interference to Demonstrate that frizzled and frizzled 2 Act in the Wingless Pathway. 95, 1017–1026.

Mogilicherla, K., Howell, J. L., & Palli, S. R. (2018). Improving RNAi in the Brown Marmorated Stink Bug: Identification of target genes and reference genes for RT-qPCR. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22035-z>

Panizzi, A. R. (1997). Wild hosts of Pentatomids: ecological significance and role in their pest status on crops. *Annual Review of Entomology*, 42, 99–122. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.99>

Riga, M., Denecke, S., Livadaras, I., Geibel, S., Nauen, R., & Vontas, J. (2020). Development of efficient RNAi in *Nezara viridula* for use in insecticide target discovery. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 103(3), 1–9. <https://doi.org/10.1002/arch.21650>

Saha, S., Allen, K. C., Mueller, L. A., Reddy, G. V. P., & Perera, O. P. (2022). Chromosome length genome assembly of the redbanded stink bug, *Piezodorus guildinii* (Westwood). *BMC Research Notes*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-022-05924-5>

San Miguel, K., & Scott, J. G. (2016). The next generation of insecticides: dsRNA is stable as a foliar-applied insecticide. *Pest Management Science*, 72(4), 801–809. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ps.4056>

Schvartzman, C., Fresia, P., Murchio, S., Mujica, M. V., & Dalla-Rizza, M. (2022). RNAi in *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae): Transcriptome Assembly for the Development of Pest Control Strategies. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.804839>.

Schvartzman&Dalla-Rizza (2023). Hemipteran control pest in crops using RNAi. Provisional Application for Patent, US 63/498,418.

Siegried, B., Narva, K., Arora, K., Worden, S., Khajuria, C., Fishilevich, E., Storer, N., Frey, M., Hamm, R., & Velez, M. (2017). Parental Rnai Suppression Of Hunchback Gene To Control Hemipteran Pests. 188-974-656-977-740, AU, A1. <https://lens.org/188-974-656-977-740>

Turner, C. T., Davy, M. W., MacDiarmid, R. M., Plummer, K. M., Birch, N. P., & Newcomb, R. D. (2006). RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Molecular Biology*, 15(3), 383–391. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00656.x>

Whyard, S., Singh, A. D., & Wong, S. (2009). Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(11), 824–832. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.09.007>

Wuriyangan, H., Rosa, C., & Falk, B. W. (2011). Oral Delivery of Double-Stranded RNAs and siRNAs Induces RNAi Effects in the Potato / Tomato Psyllid, *Bactericerca cockerelli*. 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027736>

Zerbino, M. S., Altier, N. A., & Panizzi, A. R. (2013). Effect of Photoperiod and Temperature on Nymphal Development and Adult Reproduction of *Piezodorus guildinii* (Heteroptera: Pentatomidae). *Florida Entomologist*, 96(2), 572–582. <https://doi.org/10.1653/024.096.0223>

Zerbino, M. S., Altier, N. A., & Panizzi, A. R. (2015). Seasonal occurrence of *Piezodorus guildinii* on different

plants including morphological and physiological changes. *Journal of Pest Science*, 88(3), 495–505. <https://doi.org/10.1007/s10340-014-0630-2>

Zhang, X., Zhang, J., & Zhu, K. Y. (2010). Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Molecular Biology*, 19(5), 683–693. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01029.x>

#### **Licenciamiento**

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)