

Identificação de genes alvo para controle de *Helicoverpa armigera* em milho via RNA interferente (RNAi)

Beatriz de Almeida Barros⁽¹⁾; Ana Laura Magalhães Verdolin⁽³⁾; Raquel Oliveira Moreira⁽³⁾; Roberto Willians Noda⁽²⁾; Newton Portilho Carneiro⁽²⁾

⁽¹⁾ Analista de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG; ⁽²⁾ Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG; ⁽³⁾ Estagiária, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. newton.carneiro@embrapa.br

RESUMO

O milho (*Zea mays L.*) é uma das mais importantes culturas do mundo, destacando-se em diversos setores do cenário agropecuário. Entretanto, infestação por insetos pragas podem acarretar grandes perdas de produção desse grão, sendo essencial o desenvolvimento de tecnologias alternativas de manejo que irão controlar tais ataques. *Helicoverpa armigera* é uma das mais importantes pragas que atacam o milho e RNA interferente (RNAi) pode ser uma ferramenta promissora para o seu controle. RNAi é um processo biológico com aplicação biotecnológica que ocorre em células eucarióticas, estimulando o silenciamento de genes a nível pós-transcricional. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi o de identificar genes de *H. armigera* que possam ser utilizados como alvo como controle desse inseto na cultura do milho. Foram selecionados doze genes (1 a 12) a partir de uma busca em banco de dados públicos e trabalhos anteriores, considerados cruciais para o desenvolvimento de *H. armigera*. Onze dos doze genes foram amplificados por RT-PCR utilizando RNA de *H. armigera* no estágio larval. O gene 3 foi selecionado como alvo de silenciamento e o gene 10 como gene de referência para futuras análises de expressão gênica quantitativa. dsRNAs desse gene foi sintetizado e utilizado em dietas em concentrações conhecidas e por tempo determinados. Os resultados obtidos neste trabalho fornecem informações sobre genes promissores que podem ser utilizados em trabalhos envolvendo a técnica de RNA interferente no controle *H. armigera*.

Termos de indexação: milho, RNAi, *Helicoverpa armigera*.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays L.*) apresenta grande importância na cadeia produtiva em diversos setores do cenário agropecuário, como na alimentação animal e humana, além da produção de biocombustíveis, destacando-se como o principal cereal cultivado no mundo. A alta demanda deste

grão desafia os agricultores a elevarem sua produtividade a cada safra, mesmo diante dos inúmeros fatores de estresse bióticos e abióticos que interferem negativamente na produtividade. Entre tais fatores, a infestação por pragas e doenças pode causar grandes perdas econômicas nessa cultura, seja pela sua ação direta nas lavouras, afetando a produção, a qualidade e o valor nutritivo dos grãos, ou através de medidas tomadas para controle desses ataques (Oliveira *et al.*, 2014). Muitas tecnologias já foram desenvolvidas para combater insetos praga, que vão desde a prática do controle biológico e inseticidas químicos até a produção de plantas geneticamente modificadas (GM) (Moreira; Mansur; Mansur, 2012). O RNA interferente (RNAi – *RNA interference*) é um processo biológico que ocorre em células eucarióticas e permite o silenciamento de genes a nível pós-transcricional, suprimindo a expressão de genes específicos (Carthew; Sontheimer, 2009). Esse mecanismo é ativado pelo aparecimento, na célula, de uma molécula de RNA dupla fita (dsRNA – *double strand RNA*), que é homóloga ao gene que será alvo do silenciamento. *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie polífaga apontada como importante problema para o cultivo do milho. Em todo o mundo, os gastos com o controle e danos de produção chegam a US\$ 5 bilhões ao ano. Uma opção promissora para o controle de *H. armigera* é a aplicação de concentrações conhecidas de dsRNA para essa espécie via biopesticidas ou transgenia. Além da escolha do gene se basear em mecanismos essenciais é necessário demonstrar que não existe efeito sobre outras espécies. Uma vez havendo a absorção da molécula de dsRNA, tal estrutura ativará o mecanismo de RNAi, levando à degradação do RNA mensageiro homólogo ao dsRNA e conseqüentemente alterações no ciclo ou morte do inseto alvo. Assim, o objetivo do presente trabalho foi identificar genes de *H. armigera* que possam ser utilizados como alvo durante a aplicação do RNAi para o controle desse inseto-praga na cultura do milho.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Genético

Larvas de *H. armigera* no 10º dia de desenvolvimento (3º instar) foram obtidas do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, sendo mantidas no Laboratório de Biologia Molecular, sob temperatura de 22°C (\pm 2°C). Cerca de 10 a 20 insetos eram mantidos em um copo plástico de 50,0 mL, contendo dieta artificial (DA), conforme descrito por Vilela *et al.* (2014).

Clonagem de genes candidatos

O critério para a seleção de genes candidatos foi baseada em casos de sucesso do uso da técnica de RNAi para controle de *Diabrotica virgifera virgifera* (comunicação pessoal) e de *H. armigera*, disponíveis na literatura (Asokan *et al.*, 2014). As sequências de nucleotídeos dos genes selecionados foram recuperadas no banco de dados público *National Center for Biotechnology Information* (NCBI- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) e utilizadas na identificação de regiões homólogas a *Helicoverpa armigera* por meio do algoritmo *blastp* no caso de proteínas de *Diabrotica virgifera* e *blastn* para o caso de genes de *H. armigera*. A partir das similaridades encontradas foram desenhados 12 pares de iniciadores com auxílio do software *Primer3 Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Iniciadores para PCR em tempo real quantitativo (qPCR) desses mesmos genes foram desenhados com o auxílio do software *PrimerExpress v3.0* (ThermoFisher Scientific).

Extração de RNA de *Helicoverpa armigera*

Para clonagem dos genes candidatos, o RNA total de *H. armigera* foi extraído a partir de 100 mg de amostra (larvas de 3º instar) utilizando-se o RNeasy Mini Kit (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade de RNA foi estimada por espectrofotometria (A_{260nm}) e a sua qualidade analisada em gel de agarose a 1%. As amostras foram armazenadas a -20°C até a síntese de DNA complementar (cDNA).

Amplificação, sequenciamento e Realtime PCR

Para a padronização das condições de reação, os genes alvo foram amplificados em reações contendo cerca de 2 μ L de cDNA diluído 10x, GoTaq HotStart Colorless Master Mix (Promega) 1X, e 0,5 pmol de cada primer, em um volume final de 20 μ L. A amplificação foi feita no termociclador *Veriti* (ThermoFisher Scientific). Para confirmação da identidade, os genes foram sequenciados utilizando o BigDye Terminator cycle sequencing kit

(ThermoFisher Scientific). Para análise de expressão foi utilizado o kit SyberGreen Master mix (Applied Biosystems) conforme instruções do fabricante. Os dados foram analisados pelo software Realtime System RQ Study software V1.3.1.9 (Applied Biosystems).

Ensaio biológicos com *H. armigera*

Os ensaios utilizaram 3 repetições de 10 lagartas de *H. armigera* em cada tratamento (água, GFP e gene 3). Os tratamentos contendo dsRNA foram utilizados a concentração de 200 ng/cm² de dieta sólida. A dieta contendo os dsRNA foram trocados a cada 24 horas por um período de 5 dias. Após esse período foi extraído RNA de cada tratamento e análise de Realtime utilizando primers do gene de interesse (Gene3) e comparado com o gene de referência (Gene10).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os genes 1, 2, 3, 9, 10 11 e 12 foram selecionados a partir da similaridade de sequências com genes de *Diabrotica virgifera* e os genes 4, 5, 6, 7 e 8 a partir de trabalhos presentes na literatura sobre *H. armigera*. A escolha dos genes a serem avaliados foi baseada em casos de sucesso pela técnica de RNAi para essas espécies. Dentre os 12 genes escolhidos incluíam dois genes relacionados com síntese de componentes estruturais do inseto (Gene 1 e 2); dois genes envolvidos na desintoxicação por substâncias químicas em insetos (GENES 4 e 5); dois genes relacionados com atividade de proteases expressas no intestino (GENES 6 e 7); um gene envolvido na síntese de enzima chave na biossíntese de hormônios durante a metamorfose de larva para pupa (GENE 8); dois genes que exercem funções catalíticas na glicólise (GENES 3 e 9); três genes envolvidos com funções celulares como a estrutura do citoesqueleto, mobilidade celular e movimento de cromossomo (GENES 10, 11 e 12). Os tamanhos esperados dos amplicons estão descritos na tabela 1. A amplificação dos fragmentos de cada um dos genes é mostrado na figura 1. O gene 6 não foi amplificado utilizando diferentes enzimas e condições de amplificação. Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor pGEM-T e transformados em *E. coli* (Figura 2). Os genes foram avaliados com relação a curva de dissociação para determinar a viabilidade do uso de primer para a determinação da expressão genica interna (Figura 4). O gene 3 (p459) utilizado para produção de dsRNA e alimentação de *H. armigera* demonstrou que houve uma inibição de cerca de 30% em relação ao controle que utilizou água e o gene do GFP (Figura 5).

Tabela 1. Tamanho esperado para cada amplicon testado em *Helicoverpa armigera*.

GENE	Am	GENE	Am	GENE	Am
GENE 1	433	GENE 5	442	GENE 9	425
GENE 2	402	GENE 6	474	GENE 10	447
GENE 3	412	GENE 7	470	GENE 11	404
GENE 4	455	GENE 8	421	GENE 12	410

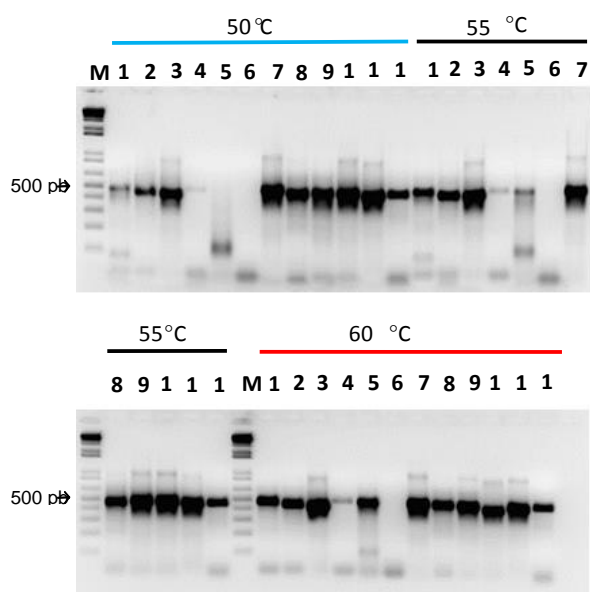


Figura 1. Teste de gradiente de temperatura de anelamento para amplificação dos genes avaliados. As setas em vermelho indicam a ausência de amplificação do GENE 6. MM corresponde ao marcador de peso molecular 1Kb Plus Ladder (Invitrogen).

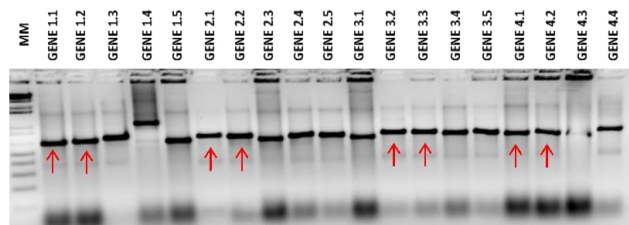


Figura 2. Reação em cadeia da polimerase de colônia de *Escherichia coli* para confirmação da clonagem dos fragmentos de cada gene de interesse em vetor pGEM. As setas indicam as colônias selecionadas para o inóculo em meio de cultura. MM corresponde ao marcador de peso molecular 1 Kb Plus Ladder (Invitrogen).

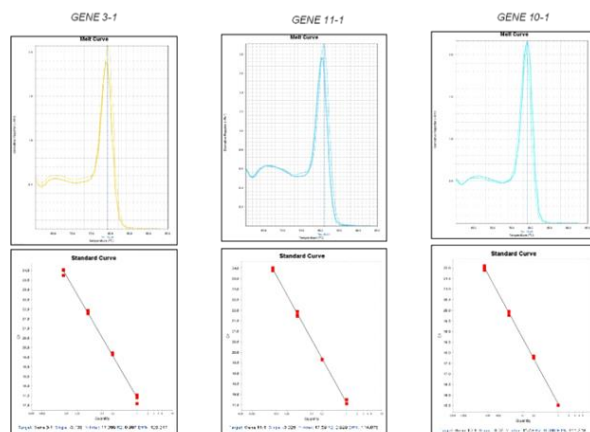


Figura 3. Curva de eficiência para determinação dos níveis de expressão em tempo real dos genes alvo para o controle de *H. armigera* via RNAi. Quanto menor o Ct, maior a expressão do gene.

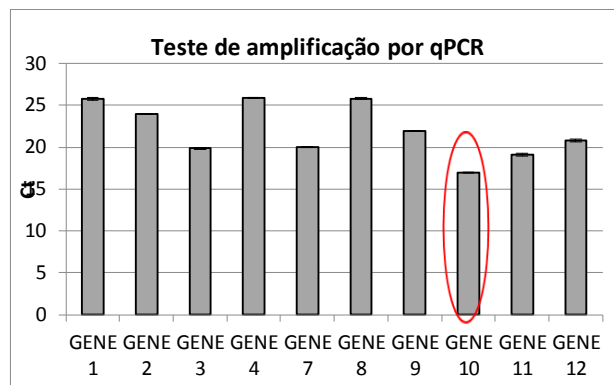


Figura 4. Curvas de dissociação dos genes selecionados para síntese de dsRNA e posteriores testes de silenciamento gênico em *H. armigera*, mostrando boa performance para os padrões de especificidade.

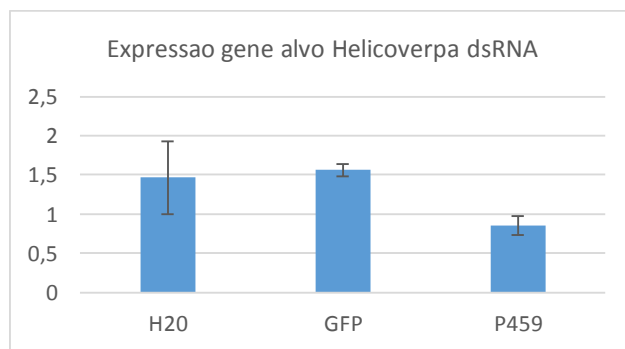


Figura 5. Nível de expressão usando qPCR de *H. armigera* alimentada com 200 ng/cm² de P459.

CONCLUSÕES

Por meio deste trabalho, isolamos e clonamos fragmentos referentes a regiões codificadoras de genes essenciais para a sobrevivência de *Helicoverpa armigera*. Dos onze genes avaliados, todos apresentaram bons níveis de expressão em larvas de *H. armigera*. Ao final, selecionamos dois genes como alvo de silenciamento e um gene como referência para análises de expressão gênica quantitativa. A partir dos genes alvo e de referência selecionados demonstramos inibição do gene P459 utilizando 200 ng/cm² de dsRNA indicando o potencial do uso dessa tecnologia para o controle dessa praga.

AGRADECIMENTOS

Esse projeto teve a participação da FAPEMIG e Embrapa.

REFERÊNCIAS

OLIVEIRA, Charles M. *et al.* Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. *Crop Protection*, v. 56, p. 50-54, 2014. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jen.12018/abstract>>. Acesso em : 23 out. 2015. CARTHEW, Richard; SONTHEIMER, Erick J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, v. 136, n. 4, p. 642–655, feb. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19239886>>. Acesso em: 18 out. 2015. MOREIRA, Mônica F.; MANSUR, Juliana F.; FIGUEIRA - MANSUR, Janana. Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos. In: *UFRJ Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, 2012, p. 1-25.



XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

**“Milho e Sorgo: inovações,
mercados e segurança alimentar”**
