

## DEFINIÇÃO E AVALIAÇÃO DE GENES ALVOS PARA SILENCIMENTO VIA RNAi COMO ESTRATÉGIA DE CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda*

FABRÍCIO BARCELOS MOTTA<sup>1</sup>; INDYRA FARIA DE CARVALHO<sup>2</sup>,  
CAMILA GAUGER NEITZKE<sup>3</sup>, LARISSA ERDMAN LUCKOW<sup>4</sup>, MOISÉS  
JOÃO ZOTTI<sup>5</sup>, ANA PAULA SCHNEID AFONSO DA ROSA<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade federal de Pelotas-fabricio.b.motta@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade federal de Pelotas- Indryrafaria@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas- camila.neitzke9@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas- larissa.erdmann@hotmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas- moises.zotti@ufpel.edu.br

<sup>6</sup>Embrapa- ana.afonso@embrapa.br

### 1. INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) é considerada a principal praga da cultura do milho (*Zea mays*) no Brasil. Seu ataque na planta ocorre desde a emergência, pendoamento e enchimento de grãos. O impacto econômico dessa praga é alto e as perdas nas lavouras infestadas costumam variar de 15% a 35% da produção e em condições favoráveis ao seu desenvolvimento pode chegar a 100% (CRUZ, 1995).

A principal forma de controle é via inseticidas químicos e mais recentemente via plantas geneticamente modificadas (GM) expressando proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner conhecidas como plantas *Bt*. No entanto, devido à elevada pressão de seleção sobre a espécie durante todo o ciclo vegetativo da planta, houve o favorecimento da evolução da resistência (BERNARDI et al., 2015).

Neste contexto, o mecanismo de silenciamento gênico chamado RNA de interferência (RNAi), tem se apresentado como estratégia promissora para o manejo de insetos. O RNAi é um processo de inativação/ bloqueio da expressão genética via fita dupla de RNA (dsRNA). É de alta especificidade, visto que atua em nível de sequência de nucleotídeos, e tem sido investigado para uso, tanto quanto inseticida (tendo genes essenciais para sobrevivência do inseto como alvo) quanto via repressor da resistência (restabelecendo a suscetibilidade através do silenciamento de genes ligados a resistência) (ZOTTI et al., 2018).

Embora promissor, o uso do RNAi depende do silenciamento de genes chaves na rota metabólica da resistência, que no caso de *S. frugiperda*, não é uma tarefa direta, visto que o mecanismo de resistência envolvido na tecnologia *Bt* ainda não é completamente compreendido, e pela resistência não ser monogênica, ou seja, envolve muitos genes em conjunto, pode ser particularmente difícil de silenciar via RNAi (BANERJEE et al., 2017). Portanto o objetivo deste estudo foi testar o método de extração do material genético assim como definir e validar possíveis genes alvos para silenciamento via RNAi.

### 2. METODOLOGIA

Posturas de populações resistentes às proteínas Cry1A.105+Cry2ab2 e Cry1A.105+Cry2ab2+Cry1F e suscetíveis foram recebidas do laboratório de resistência a táticas de controle da ESALQ e após mantidas no Núcleo de Bioeficiência da Embrapa Clima Temperado. A partir destas, foram estabelecidas as colônias utilizadas no experimento.

Foi feita uma extensa revisão de literatura dos possíveis genes envolvidos nos mecanismos de resistência às proteínas CRY1. Os genes selecionados foram membros do cassete de proteínas transportadoras do ATP (transportadores

ABCC), por existirem relatos de mutações conferindo a resistência em *Helicoverpa armigera*, *Bombyx mori*, *Spodoptera exigua* e *S. frugiperda*. Foi também selecionado a caderina, por também existirem relatos de mutações nessa proteína, reduzem ou removem completamente a interação do receptor com a Cry1Ac (ATSUMI et al., 2012; XIAO et al., 2014; PARK et al., 2014; FLAGEL et al., 2018).

Selecionou-se também, os genes prophenoloxidase 1 e 2 que expressam uma proteína hexamerica que se acumula no tecido gorduroso e estão relacionadas com a proteção do intestino contra infecções microbianas. Acredita-se que são importantes hormônios produzidos no metabolismo secundário (não diretamente relacionado ao modo de ação das proteínas Cry) em populações resistentes (HAKIM et al., 2007; HAKIM et al., 2010).

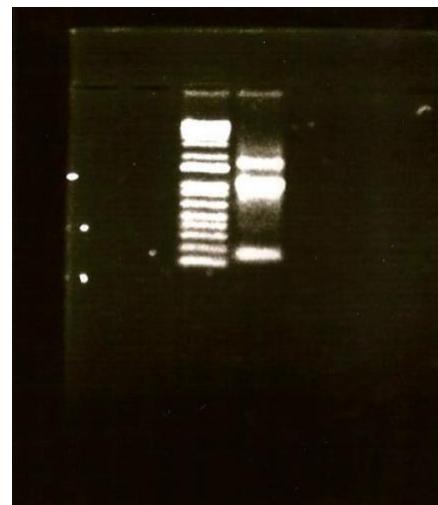
Os genes referência, ou seja, que devem ser estáveis, conservados na espécie, e que não variam de acordo com a resistência, foram os que expressam a actina (actin 1, actin 2 e actin 3), proteína ribossomal (Ribosomal protein), 28S e ecdisônio (ecdysoneless). Esses genes são utilizados nas análises subsequentes, onde a sua expressão é considerada um controle. As sequências de nucleotídeos específicos desses genes foram obtidas do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.NCBI.nlm.nih.gov>) e os primers foram desenhados na respectivas populações utilizando o Site primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)

O RNA total das populações foi extraído pelo método de Trizol, foi extraído cerca de 60mg de tecido de lagartas de 3ºinstar (aproximadamente 4 indivíduos) individualizadas em Eppendorf. Foram utilizadas 6 repetições, logo foi feita a conferência da qualidade do RNA extraído via gel de eletroforese em agarose e conferência em espectrofotômetro (Nanodrop).

Para validação dos primers, o cDNA foi sintetizado a partir de um pool de amostras de RNA total de cada população utilizando o kit superSCRIPT 11 RT da Invitrogen. Os genes foram amplificados utilizando 20 g de cDNA utilizando o KIT *Taq Polimerase* (Thermo Fischer Scientific) e os primers específicos ,utilizado o termo ciclador da Applied Biosystem com estágio de pré leitura 60°C 30s logo o estágio de hold a 95°C por 10 min, o estágio de PCR a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto por 40 ciclos. Em seguida foi feita conferencia utilizando o gel de eletroforese em agarose.

### 3. Resultados e discussão

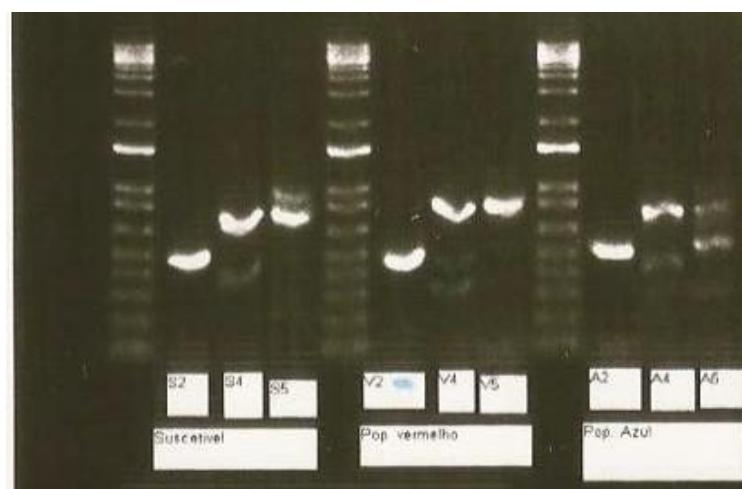
A extração do RNA quando intacta deve ser visualizada no gel de eletroforese, as bandas nítidas da proporção 28S, 18 S e 5S, significando que o método de extração por Trizol foi adequado para extração de RNA total das lagartas de *S. frugiperda*. A leitura em espectrofotômetro apontou uma proporção de A260/ A280 de 1.945, A260/A230 de 2,154 e concentração média de 349 ng/µL (Figura 1).



**Figura 1-** RNA total extraído pelo método do Trizol em gel de eletroforese em agarose

Através da PCR uma sequencia de DNA pode ser amplificada milhões ou bilhões de vezes, produzindo copias suficientes de DNA para serem analisadas por outras técnicas. A *Taq polimerase* utilizada nesse experimento, foi responsável pela síntese do DNA a ser analisado, através dos primers previamente sintetizados, que sinalizam a região que vai ser amplificada. Em nosso estudo o primer da actina (actina 2), caderina, ABCC2, ABCC2 parcial, ABCC 2 trun, ABBC3, prophenoloxidase1, prophenoloxidase 2 e 28S parearam apropriadamente ao molde de DNA das populações e foram amplificados.

Quando submetidos à eletroforese em gel, os fragmentos multiplicados puderam ser vistos em forma de bandas, representando um fragmento de DNA do mesmo tamanho (Figura 2). Já os primers actina 1, actina 3 não foram amplificados, visto que nenhuma banda foi observada no gel, isso pode ocorrer por uma serie de fatores, como temperatura de anelamento dos primers forward e reverse diferentes, desenho das sequencias erradas ou homologas a outros genes. Estes primers não serão utilizados nas análises subsequentes.



**Figura 2-** Fragmentos de DNA amplificados, respectivamente actina 2, caderina e ABCC2 na população suscetível, população resistente à CRY1A.105+ CRY2Ab2 +CRY1F e a resistente ao CRY1A.105+ CRY2Ab2

Com a confirmação da presença e sequencia dos genes alvos e referênci, o próximo passo é quantificar a expressão genica em cada população e analisar se estão de fato sendo superexpressos nas populações resistentes. Com isso, se dará a validação desses genes como alvos para silenciamento.

#### 4. CONCLUSÕES

O método de extração de RNA Total de lagartas pelo método do Trizol forneceu material de ótima qualidade e concentração alta. Os genes da caderina, ABCC e prophenoloxidase estão presentes e foram amplificados propriamente e são possíveis candidatos para o silenciamento via RNAi caso tenham diferenças na expressão. Os genes actin 2, proteína ribossomal, 28S e Ecdysoneless também são fortes candidatos para uso como genes referência na análise da PCR quantitativa.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATSUMI, S.; Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 25, p. E1591–E1598, 19 jun. 2012.
- BANERJEE, R.; Mechanism and DNA-based detection of field-evolved resistance to transgenic Bt corn in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10877, 2017.
- BERNARDI, D.; Cross-Resistance between Cry1 proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) May Affect the Durability of Current Pyramided Bt Maize Hybrids in Brazil. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0140130, 16 out. 2015.
- CRUZ, I.; **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. (Circular Técnica, 21) ed. Sete Lagoas: Embrapa CNPMS, 1995.
- FLAGEL, L.; Mutational disruption of the ABCC2 gene in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, confers resistance to the Cry1Fa and Cry1A.105 insecticidal proteins. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 7255, 2018.
- HAKIM, R. S.; Growth and mitogenic effects of arylphorin in vivo and in vitro. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 64, n. 2, p. 63–73, 2007.
- HAKIM, R. S.; BALDWIN, K.; SMAGGHE, G. Regulation of Midgut Growth, Development, and Metamorphosis. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 593–608, 2010.
- PARK, Y.; ABCC transporters mediate insect resistance to multiple Bt toxins revealed by bulk segregant analysis. **BMC Biology**, v. 12, n. 1, p. 46, 2014.
- XIAO, Y.; Mis-splicing of the ABCC2 gene linked with Bt toxin resistance in *Helicoverpa armigera*. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 6184, 2015.
- ZOTTI, M.J.; RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes: RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. **Pest Management Science**, v. 74, n. 6, p. 1239–1250, 2018.