

## Avaliação da tecnologia do RNA interferente (RNAi) para controle de *Rhopalosiphum maidis* e *Schizaphis graminum* em milho

Ana Laura Magalhães Verdolin<sup>(3)</sup>; Beatriz de Almeida Barros<sup>(1)</sup>; Meire de Cassia Alves<sup>(1)</sup>; Roberto Willians Noda<sup>(2)</sup>; Andrea Almeida Carneiro<sup>(2)</sup>; Newton Portilho Carneiro<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Analista de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG; <sup>(2)</sup> Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG; <sup>(3)</sup> 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 que irão controlar tais ataques. RNA de interferência (RNAi) é um processo biológico que ocorre em todas as células eucarióticas que permite o silenciamento dos genes a nível pós-transcricional, diminuindo a atividade de genes específicos. Afídios como *Rhopalosiphum maidis* e *Schizaphis graminum* são considerados pragas com efeitos significativos na cultura do milho e sorgo. Esse trabalho teve por objetivo identificar genes nessas duas espécies que possam ser utilizados pela tecnologia do RNA interferente como alvo para o seu controle. A estratégia foi avaliar metodologias para a identificar dietas artificiais capazes de fazer ensaios biológicos confiáveis e identificar os genes expressos de *R. maidis* e *S. graminum* que possam ser usados como candidatos para controle dessas pragas. Os resultados iniciais mostraram um gene cuja expressão foi inibida em função de um controle interno, contudo não foi possível verificar efeito sob mortalidade do inseto. Os resultados obtidos neste trabalho fornecem informações promissoras que podem ser utilizados em trabalhos envolvendo a técnica de RNA interferente no controle desses dois afídios.

**Termos de indexação:** milho, RNAi, *Rhopalosiphum maidis*.

### INTRODUÇÃO

O milho é um dos cereais mais cultivados no mundo (155 milhões de ha). Dentre os grandes prejuízos enfrentados pela agricultura encontram-se os ataques de pragas e doenças. Os afídios são uma das principais pragas nas culturas e causam grande

perdas. Afídios tanto jovens (ninfas) quanto adultos, alimentam-se de seiva, causando danos diretamente, através da sucção da seiva e de suas consequências no rendimento de grãos, como diminuição de tamanho, número e peso de grãos. Um dos principais danos indiretos é a transmissão de agentes fitopatogênicos que reduz o potencial de produção do milho e sorgo. Comparados com insetos mastigadores, os afídios são mais difícil de controlar devido aos pesticidas pulverizados nem sempre são absorvidos pelo trato digestivo. Sob condições de estigagem, a população de afídios pode aumentar rapidamente, infestando todos os tecidos novos, como pendão e gemas florais. Os sintomas mais frequentes são morte de plantas, perfilhamento de espigas, espigas atrofiadas e espigas com granação deficiente. O RNA interferente (RNAi) 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 e Sontheimer, 2009). Esse mecanismo é ativado pelo aparecimento na célula de moléculas de RNA dupla fita (dsRNA), homólogas ao gene que será alvo do silenciamento. O princípio do uso do RNAi para o controle de insetos pragas é identificar genes importantes para a sua sobrevivência, mas que não interfira na em insetos não alvo. Esse processo envolve sequenciamento do transcriptoma do inseto, identificação de genes candidatos, isolamento desses fragmentos por PCR utilizando primers específicos, produção de dsRNA *in vitro* e aplicação desses em concentrações conhecidas na dieta do inseto. Moléculas de RNA dupla fita absorvidas no intestino do inseto ativarão o mecanismo de RNAi, levando à degradação do RNA mensageiro homólogo ao dsRNA levando conseqüentemente à distúrbios no ciclo ou morte do inseto. O objetivo do presente trabalho foi identificar genes de *R. maidis* e *S. graminum* que possam ser utilizados como alvo durante a aplicação do RNAi para o controle desse inseto-praga em cultura de milho.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material Genético

Amostras de *R. maidis* e *S. graminum* foram obtidos em criação no 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, folhas de sorgo.

### Testes de dieta para afídios

Foram feitos experimentos em placas de Petri de 5 cm utilizando parafilm e em tubo de eppendorf contendo folha de sorgo (Figura 1). As dietas foram feitas com sacarose 15% e componentes protéicos (extrato de levedura e aminoácidos) esterilizado por filtração. Foram utilizadas as concentrações de 0,1, 0,2, 0,5, 1,0 e 2,0% de extrato de levedura e componentes protéicos.

### Clonagem de genes candidatos

A escolha dos genes a serem avaliados foi feita baseada em casos de sucesso do uso da técnica de RNAi para controle de outros insetos (ex: *Diabrotica virgifera virgifera* 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 do inseto alvo por meio do algoritmo *blastp* no caso de proteínas e *blastn* para o caso de genes. A partir das similaridades encontradas foram desenhados 12 pares de iniciadores com auxílio do software *Primer3 Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/>). Os primers 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

Para clonagem dos genes candidatos, o RNA total foi extraído a partir de 100 mg de amostra 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 e clonagem dos genes alvo

Para a padronização das condições de reação, os genes alvo foram amplificados em reações contendo cerca de 2  $\mu$ 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  $\mu$ L. A amplificação foi feita no termociclador *Veriti* (ThermoFisher Scientific) empregando as seguintes condições térmicas: desnaturação a 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 15 seg, sendo a etapa de anelamento testada em três temperaturas (50°C, 55°C e 60°C) por 15 seg e a etapa de alongação ocorreu a 72 °C por 15 seg. Ao final dos 35 ciclos, ocorreu a etapa de extensão final das reações, realizada a 72°C por 2 min. Em seguida as amplificações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 2%.

### Amplificação, sequenciamento e Realtime PCR

Para a padronização das condições de reação, os genes alvo foram amplificados em reações contendo cerca de 2  $\mu$ 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  $\mu$ 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 *R. maidis* e *S. graminum*

Os ensaios utilizaram 3 repetições de 10 afídios de cada uma das espécies em cada tratamento (água, GFP e gene 3). Os tratamentos contendo dsRNA foram utilizados a concentração de 200 ng/ $\mu$ l de dieta sólida. A dieta líquida (volume 100  $\mu$ l) 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 e comparado com o gene de referência.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira etapa desse trabalho foi a identificação de uma dieta que pudesse manter 80% da população por um período de 10 dias. Insetos foram submetidos a diferentes concentrações de sacarose

e aminoácidos em diferentes períodos. De acordo com os testes realizados foi determinado que a adição de aminoácidos não melhora a manutenção da cultura de insetos. A melhor concentração de sacarose foi a de 15%. Como controle foi adicionado corantes de alimentos (não tóxico) as dietas para determinar a ingestão pelos insetos (Figura 1). Foram feitos dois testes de modo que a ingestão da dieta: placa de Petri e tubo eppendorff. Para o *R. maidis* funcionou o eppendorff e para o *S. graminum* funcionou a placa (Figura 2). Resultados mostrando o efeito do tempo da dieta é mostrado na figura 3. Dos vários genes pesquisados no banco de dados públicos do NCBI, quatro deles, expressos em *Diabrotica virgifera virgifera*, foram selecionados para pesquisa de homologia com genes depositados no banco de sequências de *R. maidis* e *S. graminum* (Figura 4 e 5).

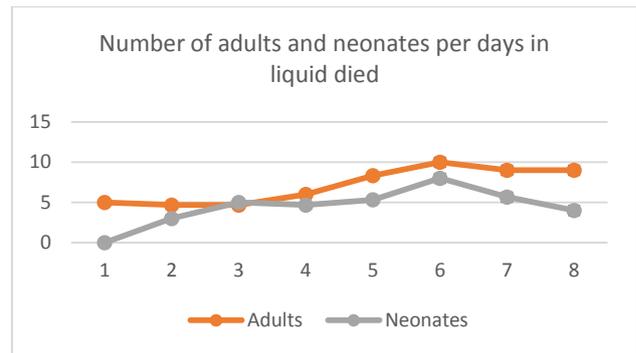


Figura 3. Número de adultos e neonatos em dieta líquida após 8 dias.



Figura 1. Afídeos alimentados por 3 dias em solução de sacarose 15% contendo (B e D) ou não (A e C) corante (10%). *Rhopalosiphum maidis* (A e B) e *Schizaphis graminum* (C e D).

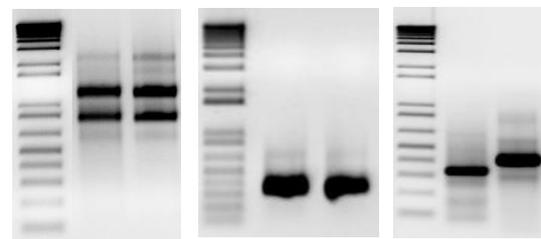


Figura 4. (A) Análise integridade de RNA de *R. maidis* em gel de agarose 1% corado com Reddy; (B) Produto PCR gene P1 e actina; (C) produto de transcrição in vitro P1 e actina



Figura 2. Método de bioensaio de *Rhopalosiphum maidis* (A e B) e *Schizaphis graminum*

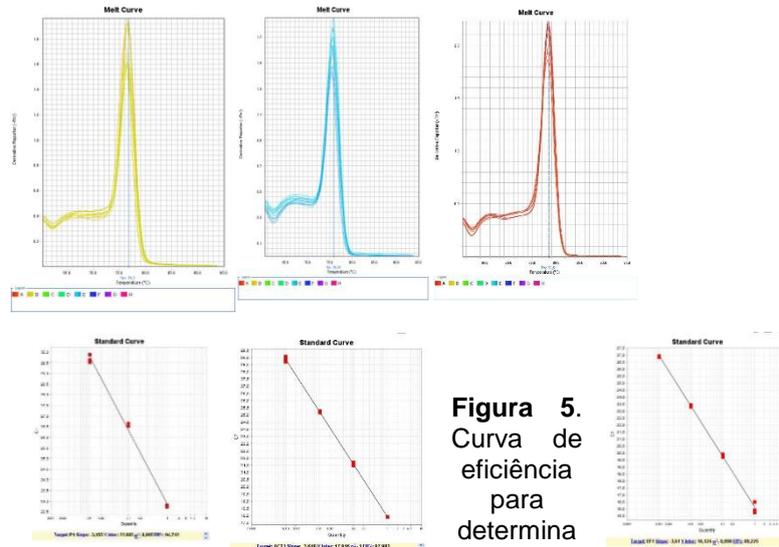
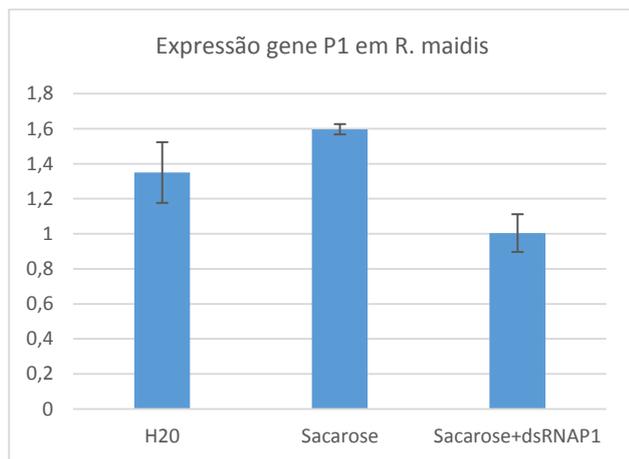


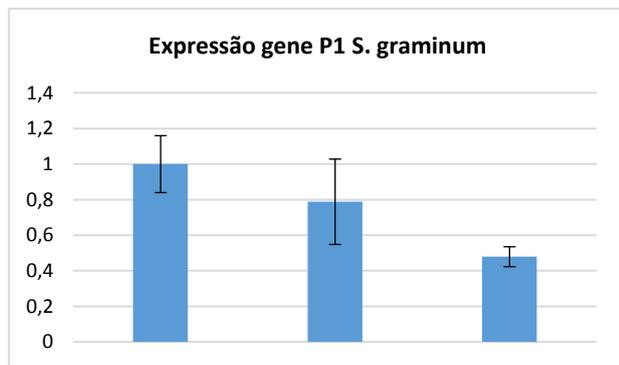
Figura 5. Curva de eficiência para determinação dos

níveis de expressão em tempo real dos genes alvo para o controle de *Rhopalosiphum* via RNAi. Os mesmos resultados foram obtidos para *S. graminum* (não mostrados)

Para o teste de eficiência dos genes, esses foram amplificados por PCR utilizando sequências do promotor T7 na extremidade 5' e submetidos a reação de transcrição *in vitro* para produção de dsRNA. Essas moléculas foram purificadas e adicionadas na dieta em concentração de 200 ng/ul de dieta. A dieta foi trocada a cada dois dias com adição de novo dsRNA em cada vez. Após 8 dias de experimento RNA foi extraído dos insetos submetidos ao dsRNA. Como controle foi utilizado tratamentos apenas com a dieta e outro com dieta e dsRNAGFP na concentração de 200 ng/ul de dieta. Os RNAs foram submetidos a qPCR para cálculo da inibição de expressão do gene alvo utilizando primers que flanqueavam ou a região 5' como a 3 da região representado pelo dsRNA (Figura 6 e 7). Os resultados mostram uma inibição de expressão do gene original de aproximadamente 30%. Não foram registrados dados de mortalidade.



**Figura 6.** Nível de expressão usando qPCR de *R. maidis* alimentada com 200 ng/cm<sup>2</sup> de P1. Sucrose 15% + GFP (200 ng/ul); Sucrose 15% + GeneA (500 ng/ul); Duração da exposição: 8 dias; Dieta foi trocada a cada dois dias; Numero inicial de afidios: 30; Numero de reps = 3; Numero de experimentos = 3



**Figura 7.** Reação qPCR com *S. graminum* exposto a 15% de sucrose (volume de 50 ul). Sucrose 15% + GFP (200 ng/ul); Sucrose 15% + GeneA (500 ng/ul); Duração da exposição: 8 dias; Dieta foi trocada a cada dois dias; Numero inicial de afidios: 30; Numero de reps = 3; Numero de experimentos = 3

## CONCLUSÕES

Por meio deste trabalho, isolamos e clonamos fragmentos referentes a regiões codificadoras de genes essenciais para a sobrevivência assim como genes controles de *Rhopalosiphum maidis* e *Schizaphis graminum*. Avaliamos 3 genes de cada uma dessas espécies com relação a expressão do gene alvo após a exposição com os respectivos dsRNA. Em ambos casos demonstramos inibição de pelo menos um dos genes em cerca de 20-30% após o período de 8 dias. Experimentos com concentrações abaixo e acima desses valores assim como efeito na mortalidade desses insetos em relação ao controle estão sendo avaliados.

## AGRADECIMENTOS

Esse projeto teve a participação da FAPEMIG e Embrapa.

## REFERÊNCIAS

- Carthew RW<sup>1</sup>, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009 Feb 20;136(4):642-55
- Kennerdell JR, Carthew RW (1998). *Cell* 95: 1017–1026.
- Oerke EC (1994) Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops. Amsterdam: Elsevier. 179–296.
- Jaubert-Possamai S et al (2007) *BMC Biotechnol* 7: 63.
- Moreira et al Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, 2012, p. 1-25.
- Price DRG, Gatehouse JA (2008). *Trends Biotechnol* 26: 393–400.
- VILELA, Michelle et al. *EMBRAPA Circular técnica n. 203*. Sete Lagoas, 2014



## XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

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

---