



## IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS ALVO PARA USO EM RNAi COMO CONTROLE DA PRAGA AGRÍCOLA DIABROTICA SPECIOSA (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE)

Palavras-chave: DIABROTICA; RT-qPCR; RNAi

Autores:

LUIZ RENATO ROSA LEME DE SOUZA, UNICAMP  
Prof. Dr. HENRIQUE MARQUES BARBOSA DE SOUZA (orientador), UNICAMP

### INTRODUÇÃO

O agronegócio ocupa uma posição altamente significativa no que concerne aos interesses político-econômico-sociais no Brasil. Um dos grandes desafios da agricultura é a constante ameaça de perdas de produção em diversas culturas, como: milho, soja, feijão, batata, entre outras, decorrente de estresses bióticos (pragas, doenças e ervas daninhas). No Brasil, uma espécie importante é a *Diabrotica speciosa*, também conhecida como larva-alfinete ou vaquinha, uma praga polífaga responsável por graves danos às plantações de batata, milho, trigo e outros cereais [1]. Suas larvas são rizófagas e causam significativa redução do sistema radicular do milho [1, 2]. Os adultos atuam preferencialmente na desfolha de milho, feijoeiro e soja [2]. Para tentar mudar esse cenário, o uso de pesticidas químicos para o controle de pragas agrícolas é um recurso que há anos vem sendo utilizado com alta eficiência. Entretanto, pesticidas químicos possuem algumas desvantagens importantes, como potenciais danos a saúde humana, contaminação de rios [3] e os efeitos que tais moléculas podem causar em organismos não-alvo. A tecnologia de RNAi, um mecanismo celular de regulação da expressão gênica, é uma alternativa sustentável ao uso de agroquímicos, por serem moléculas biodegradáveis, não tóxicas e de mecanismo de ação altamente específico, permitindo sua combinação com outras tecnologias sustentáveis. Seu funcionamento ocorre nas células do inseto através da identificação de sequências de dsRNA homólogas a um gene de função vital para este, permitindo o silenciamento que resulta em sua morte. Várias moléculas alvo já foram identificadas e caracterizadas na espécie *Diabrotica virgifera virgifera*, revelando seu potencial para o controle de *Diabrotica* por RNAi [4, 5, 6]. Este projeto propõe uma abordagem evolutiva, experimental e comparativa, que consiste em, com base em dados moleculares disponíveis da espécie *D. virgifera*, isolar, sequenciar, alinhar e analisar genes ortólogos em *D. speciosa*, bem como seus níveis de expressão nos diferentes estágios de desenvolvimento da praga, definindo assim alvos para o mecanismo de RNAi e possibilitando a validação de estudos empenhados no desenvolvimento de um produto nacional para o controle da praga.

### METODOLOGIA

Este projeto está dividido em três etapas gerais: (1) **análise *in silico***; (2) **procedimentos de bancada** e (3) **análise de dados**. Na primeira etapa foi realizado o desenho de primers e a análise e seleção das sequências da espécie de referência (*D. virgifera virgifera*). Na segunda etapa foram realizadas as atividades de extração

de RNA, síntese de DNA complementar (cDNA), PCR tradicional, eletroforese em gel de agarose, purificação, clonagem, sequenciamento Sanger, RT-qPCR (validação de primers, escolha do gene de referência e análise de expressão gênica). Na última etapa do projeto, foi realizado o tratamento das sequências obtidas, o alinhamento interespecífico das sequências (*Multiple Sequence Alignment*-MSA), a análise de filogenia, identificação dos domínios funcionais e análise da expressão gênica diferencial (qPCR).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados a partir da literatura os genes alvo: V-ATPase subunit D (XM\_028287429.1 [6]; Snf7 (XM\_028287710.1) [4]; Brahma (XM\_028282062.1) [5]; Transport protein SEC23 (XM\_028286618.1) [7]; V-ATPase subunit A (XM\_028294206.1) [6]. As sequências foram alinhadas pela ferramenta BLAST-NCBI, utilizando as sequências dos genes selecionados em *D. virgifera virgifera*, com seus homólogos em *Diabrotica undecimpunctata*, com o intuito de identificar regiões conservadas para o desenho dos primers. Com o cDNA de *D. speciosa* sintetizado a partir do RNA total extraído, junto dos primers desenhados e o reagente DreamTaq Green PCR Master Mix (2x) da *Thermo Scientific*<sup>TM</sup>, foram realizadas reações de PCR tradicional, que resultaram na amplificação de fragmentos gênicos para todos os genes de *D. speciosa* selecionados. Tais fragmentos foram encaminhados para sequenciamento Sanger e suas sequências foram pré-processadas, concatenadas e alinhadas para construção do cladograma (Figura 1).

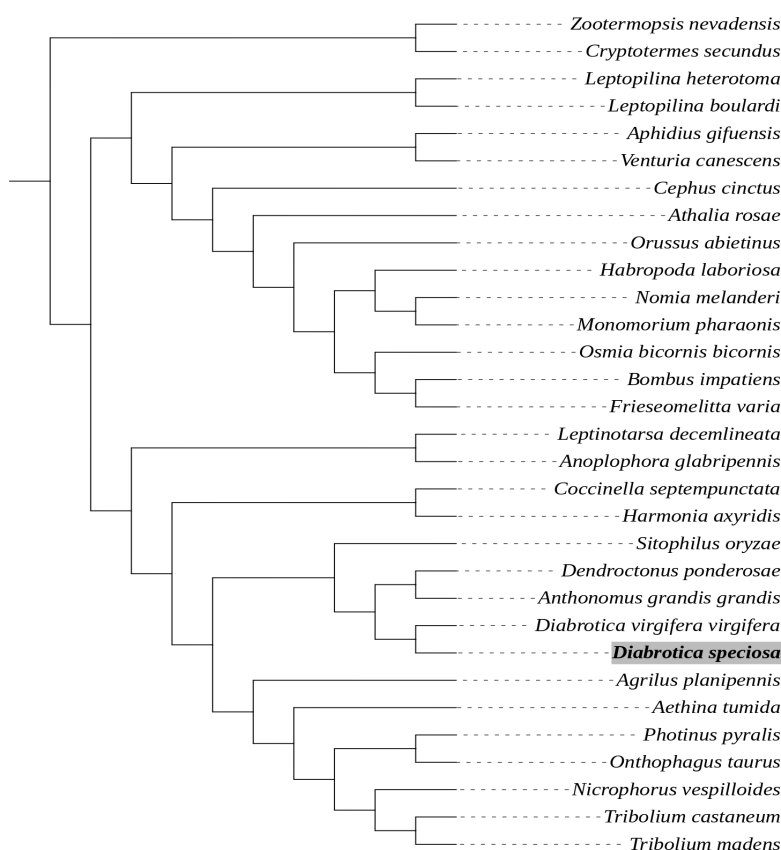


Figura 1: Cladograma gerado pela ferramenta [The Interactive Tree Of Life](#) a partir do alinhamento das sequências concatenadas dos genes alvo obtidas para *D. speciosa*. A proximidade das espécies *D. virgifera virgifera* e *D. speciosa* confirma a alta similaridade das sequências analisadas.

Uma vez sequenciados os fragmentos, foram desenhados primers de qPCR específicos para os alvos em *D. speciosa*. Ademais, em função da necessidade de empregar genes de referência nas reações de RT-qPCR, foram selecionados quatro genes: ( $\beta$ -actin, GAPDH,  $\beta$ -tubulin, EF1 $\alpha$ , com base em um estudo [8] feito em

*D. virgifera virgifera*. Todos os primers foram validados por meio da construção de curvas padrão e cálculo de eficiência (Figura 2) a partir de reações de RT-qPCR com o reagente SYBR Green. Todas as curvas apresentaram um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) muito próximo de 1, i.e. praticamente toda a variação observada na variável dependente (Ct) é explicada pela variação promovida na variável independente (Log Q). Ademais, todos os valores de eficiência estão dentro da faixa aceitável (90-110%).

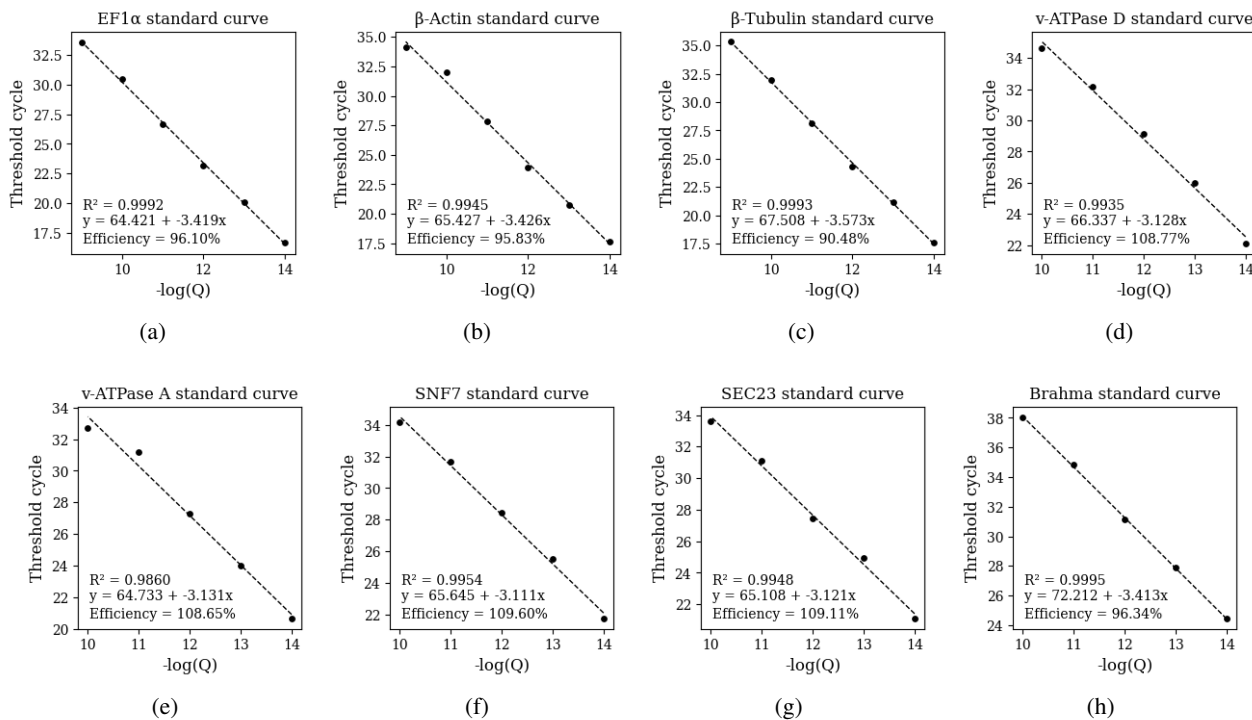


Figura 2: Curvas padrão construídas para validação dos primers de qPCR para os genes alvo e referência. Todas as curvas apresentam a equação da reta, o coeficiente de determinação  $R^2$  e o valor de eficiência (E)

Validados os primers, estes foram empregados na análise da estabilidade dos genes de referência selecionados. Para isso foram realizadas reações de RT-qPCR a partir de um *pool* de cDNA de *D. speciosa* sintetizado a partir do RNA extraído de diferentes estágios de desenvolvimento da espécie (ovo, neonato, larva de 3º instar, pupa e adulto). Os valores de Ct resultantes foram submetidos à análise por diferentes algoritmos para escolha dos mais estáveis. Com base nos resultados (Figura 3), os genes escolhidos para uso como controle endógeno nas reações foram: EF1 $\alpha$ ,  $\beta$ -actin e  $\beta$ -tubulin.

Por fim, as amostras de cDNA obtidas para as condições experimentais desejadas, junto dos primers validados e dos controles endógenos selecionados, foram realizadas reações de RT-qPCR com o reagente SYBR Green Master Mix em triplicatas técnicas para cada réplica autêntica de cada estágio (ovo, neonato, larva, pupa e adulto) para todos os genes alvo e referência, junto dos respectivos controles NTC. Os valores de Ct obtidos foram devidamente tratados e aplicados no método de Pfaffl para análise da expressão gênica com eficiência corrigida. Os resultados (Figura 4) mostram ao menos uma variação significativa ( $p > 0,05$ ), marcada por “\*”, entre dois estágios para cada gene alvo (com exceção do SNF7, Figura 4c). Foram empregados os testes de Shapiro-Wilk ( $\alpha = 0,05$ ) para teste de normalidade, Kruskal-Wallis ( $\alpha = 0,05$ ;  $df = 4$ ) para análise da variância nos conjuntos de dados que não apresentaram distribuição normal e ANOVA [ $\alpha = 0,05$ ;  $df = (4, 10)$ ] para o conjunto de dados que apresentou distribuição normal.

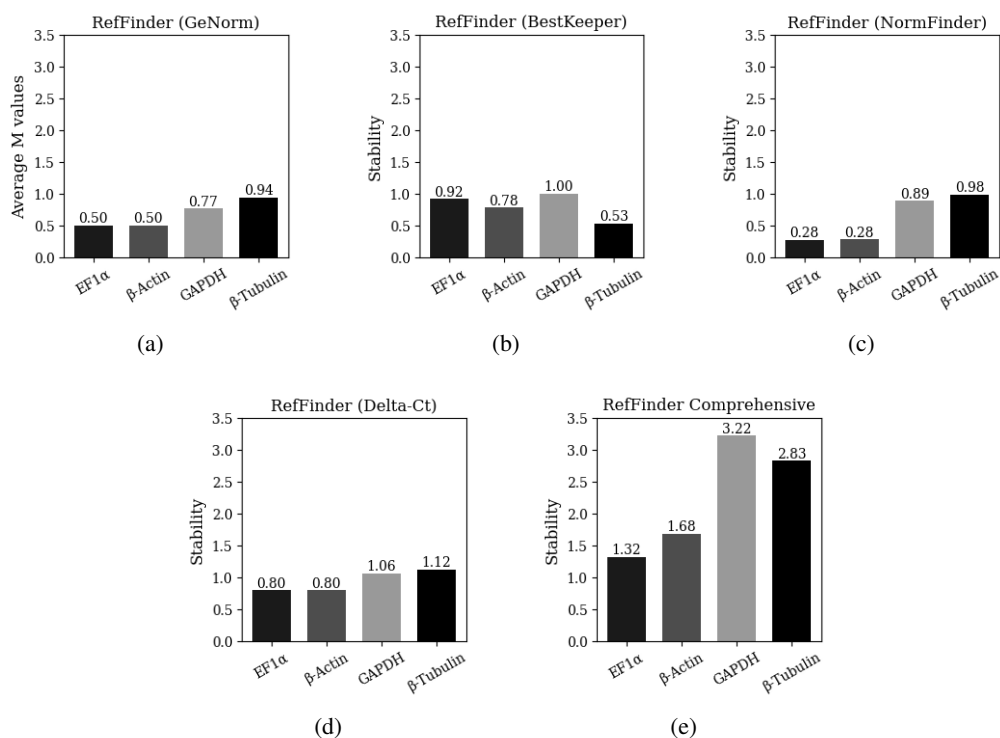


Figura 3: Resultado de cada algoritmo: (a) GeNorm, (b) BestKeeper, (c) NormFinder e (d) Delta Ct. O gráfico (e) apresenta o resultado já ranqueado para os os valores de estabilidade obtidos em cada algoritmo a partir dos valores de Ct gerados na reação de RT-qPCR.

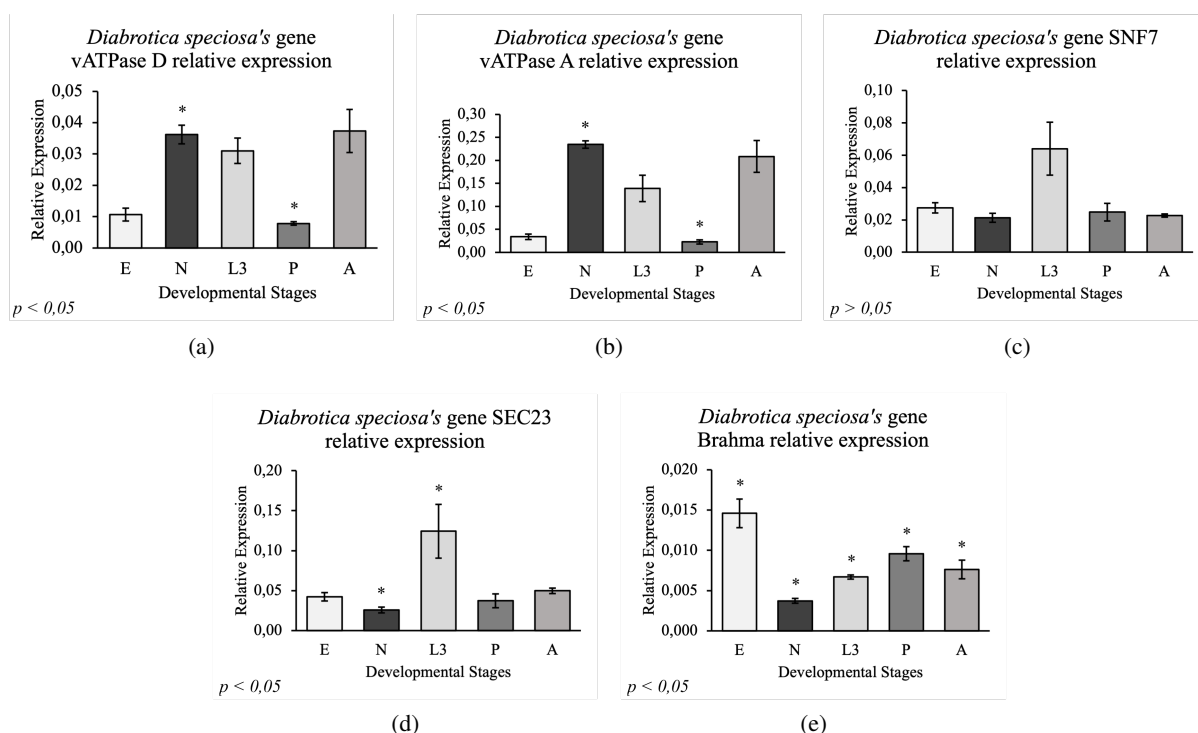


Figura 4: Gráficos de expressão relativa dos genes alvo nos estágios: ovo (E), neonato (N), larva de 3<sup>o</sup> ínstar (L3), pupa (P) e adulto (A). Os valores de expressão relativa obtidos foram tratados separadamente para cada gene ao longo das quinze réplicas biológicas analisadas. As colunas marcadas com "\*" indicam os grupos que diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) de pelo menos um dos demais grupos

## Conclusão

Este trabalho demonstra que os genes *EF1 $\alpha$* ,  *$\beta$ -actin* e  *$\beta$ -tubulin* são adequados para uso como controles endógeno em análises de RT-qPCR em *D. speciosa* em seus diferentes estágios de desenvolvimento. O resultado das análises de expressão dos genes alvo em tais estágios revelou o perfil transcricional destes, informação essencial para o estudo da técnica de RNAi como método de controle dessa praga de importância nacional.

## Referências

- [1] Dirceu Neri Gassen. Insetos subterrâneos prejudiciais às culturas no sul do Brasil. *Embrapa Trigo-Documents (INFOTECA-E)*, 1989.
- [2] Gilberto Batista Castor Marques, Crêbio José Ávila, and José Roberto Postali Parra. Danos causados por larvas e adultos de *diabrotica speciosa* (coleoptera: Chrysomelidae) em milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34:1983–1986, 1999.
- [3] Danielle Ferreira de Siqueira, Romero Marinho de Moura, Glória Elizabeth Carneiro Laurentino, Anderson José de Araújo, and Simara Lopes Cruz. Análise da exposição de trabalhadores rurais a agrotóxicos. *Revista Brasileira em Promoção da Saúde*, 26(2):182–191, 2013.
- [4] Renata Bolognesi, Parthasarathy Ramaseshadri, Jerry Anderson, Pamela Bachman, William Clinton, Ronald Flannagan, Oliver Ilagan, Christina Lawrence, Steven Levine, William Moar, et al. Characterizing the mechanism of action of double-stranded rna activity against western corn rootworm (*diabrotica virgifera virgifera* leconte). 2012.
- [5] Chitvan Khajuria, Ana M Vélez, Murugesan Rangasamy, Haichuan Wang, Elane Fishilevich, Meghan LF Frey, Newton Portilho Carneiro, Premchand Gandra, Kenneth E Narva, and Blair D Siegfried. Parental rna interference of genes involved in embryonic development of the western corn rootworm, *diabrotica virgifera virgifera* leconte. *Insect biochemistry and molecular biology*, 63:54–62, 2015.
- [6] Murugesan Rangasamy and Blair D Siegfried. Validation of rna interference in western corn rootworm *diabrotica virgifera virgifera* leconte (coleoptera: Chrysomelidae) adults. *Pest management science*, 68(4):587–591, 2012.
- [7] Ana M Vélez, Elane Fishilevich, Murugesan Rangasamy, Chitvan Khajuria, David G McCaskill, Adriano E Pereira, Premchand Gandra, Meghan LF Frey, Sarah E Worden, Shannon L Whitlock, et al. Control of western corn rootworm via rnai traits in maize: lethal and sublethal effects of *sec23 dsrna*. *Pest management science*, 76(4):1500–1512, 2020.
- [8] Thaís Barros Rodrigues, Chitvan Khajuria, Haichuan Wang, Natalie Matz, Danielle Cunha Cardoso, Fernando Hercos Valicente, Xuguo Zhou, and Blair Siegfried. Validation of reference housekeeping genes for gene expression studies in western corn rootworm (*diabrotica virgifera virgifera*). *PLoS one*, 9(10):e109825, 2014.