

III SEMANA DO CONHECIMENTO

Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:

Resumo

Relato de Caso

Uso de RNA de interferência visando o controle de *Helicoverpa armigera*

AUTOR PRINCIPAL: William Merlini

CO-AUTORES: Cássia Canzi Ceccon, Dielli Aparecida Didoné, Tiago Teixeira, Marília Rodrigues de Silva, Bruna dos Santos e Matheus Augusto de Abreu

ORIENTADOR: Profa. Ph.D Magali Ferrari Grandó

UNIVERSIDADE: Universidade de Passo Fundo

INTRODUÇÃO:

Helicoverpa armigera se caracteriza pelo ataque a diversas plantas incluindo culturas de importância econômica. Os danos causados estão relacionados à redução de produtividade e qualidade devido ao ataque às estruturas reprodutivas e folhas jovens. Atualmente são utilizadas plantas Bt e inseticidas para controle desta praga, porém, algumas populações têm mostrado resistência a ambas tecnologias. Considerando isso, novas alternativas de controle são necessárias. Neste âmbito, surge o uso de RNA de interferência (RNAi), mecanismo natural de silenciamento gênico que pode ser usado como estratégia de controle de insetos-praga pelo silenciamento de genes vitais ao inseto-alvo. O mecanismo é desencadeado por uma molécula de RNA dupla-fita (RNAdf) que, após entrar na célula, se liga ao RNAm alvo impedindo a tradução e expressão da característica. O objetivo do trabalho foi verificar se o silenciamento do gene *rieske*, envolvido na produção de energia, tem capacidade de controle de *H. armigera*.

DESENVOLVIMENTO:

As larvas utilizadas nos experimentos foram obtidas do Laboratório de Entomologia da Universidade de Passo Fundo. O primeiro experimento buscou determinar a dose de RNAdf do gene *rieske* que causa a maior taxa de mortalidade de *H. armigera*. Foram testadas as doses de 0,03, 0,3 e 3,0 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de RNAdf *rieske*, como controle negativo foi utilizado água. O RNAdf foi aplicado na superfície de discos foliares de soja e disponibilizado as larvas nos dias 0, 2 e 4. O cultivo dos insetos foi mantido até o 17o dia e após o 5o dia as larvas foram alimentadas com folhas não tratadas com RNAdf *rieske*. O delineamento do experimento foi casualizado, com quatro tratamentos e dez repetições. Diariamente foram avaliados mortalidade, desenvolvimento e consumo e a cada 3 dias foram as larvas foram pesadas. A maior taxa de mortalidade

III SEMANA DO CONTECIMENTO

3 a 7 DE OUTUBRO
2016

foi obtida com a dose de 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ RNAdf rieske, 75% quando comparada ao controle (33,3%) e às doses 3,0 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ e 0,03 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, que causaram a mortalidade de 25% e 50%, respectivamente (Figura 1). Além disso, a alimentação com 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ RNAdf rieske reduziu 74% do ganho de peso, enquanto as doses de 3,0 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ e 0,03 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ reduziram o ganho de peso em 40,5% e 21,5%, respectivamente. O consumo médio das larvas também foi menor naquelas alimentadas com 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ RNAdf rieske (71% menor em relação ao controle). A redução de peso e consumo resultou no menor tamanho das larvas alimentadas com 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ RNAdf rieske em relação ao controle (Figura 2).

No segundo experimento se buscou verificar a ocorrência do silenciamento do gene alvo rieske para determinação se a mortalidade e os efeitos subletais observados no primeiro experimento eram resultantes da redução da expressão do gene rieske. As larvas foram alimentadas com discos foliares de soja contendo sob sua superfície 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ RNAdf rieske, as larvas foram mantidas até atingirem o 3o estágio larval, neste momento foi realizada a extração do RNA do sistema digestório e do restante do corpo. Para extração foi utilizado Trizol, seguindo protocolo de Chomczynski & Mackey (1995) e, após realizada a quantificação, transcrição reversa para a produção do cDNA a partir do RNA coletado, foi realizado o RT-qPCR técnica que permite a quantificação da expressão gênica. Para o RT-qPCR foi utilizado o kit Fast SYBR® Green Master Mix, seguindo as instruções do fabricante. A alimentação das larvas de *H. armigera* com folhas de soja contendo o RNAdf rieske provocou redução no nível de expressão do gene, indicando sua efetividade no silenciamento gênico. No sistema digestório foi observado 10% de silenciamento (Figura 3 A). Nas amostras do restante do corpo, a expressão relativa do gene rieske foi 25% menor em relação ao controle não tratado com RNAdf (Figura 3 B).

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Os resultados mostram que a dose de 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ RNAdf rieske causou mortalidade e afetou o desenvolvimento de *H. armigera* além de reduzir a expressão do gene rieske, confirmando o potencial do uso do mecanismo de RNAi para silenciamento do gene rieske como alternativa de controle de *H. armigera*.

REFERÊNCIAS:

CECCON, Cássia Canzi. RNA de interferência como alternativa para o controle de *Helicoverpa armigera* mediante silenciamento genético. 2015. 156 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Agronomia, FAMV, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2016.

CHOMCZYNSKI, P.; MACKEY, K. Short technical report. Modification of the TRIZOL reagent procedure for isolation of RNA from Polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques*, v. 19, n. 1, p. 942-500, 1995.

III SEMANA DO CONHECIMENTO

NÚMERO DA APROVAÇÃO CEP OU CEUA (para trabalhos de pesquisa): Número da aprovação.

ANEXOS:

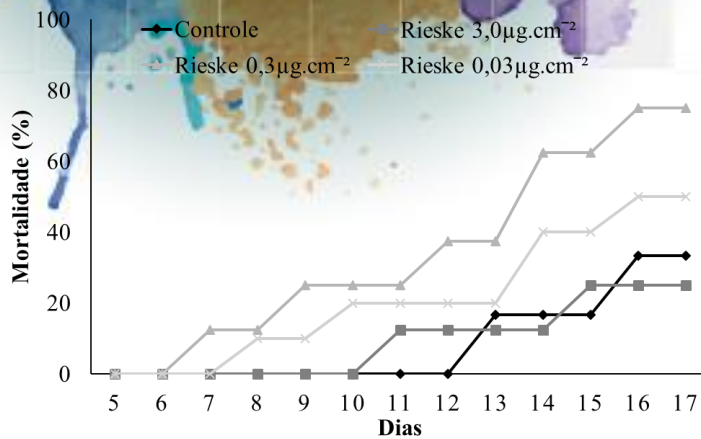


Figura 1 – Dinâmica da mortalidade de *Helicoverpa armigera* alimentada com diferentes doses de RNAdf *rieske* entre o 5º e o 17º dia de experimento. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.

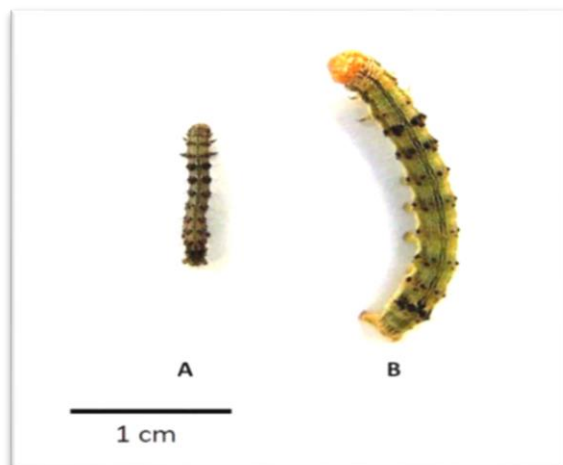


Figura 2 - Redução do desenvolvimento de larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com 0,3 µg.cm⁻² RNAdf *rieske* (A) e controle (B) no 15º dia de experimento. (Cássia Ceccon, 2015).

III SEMANA DO CONHECIMENTO

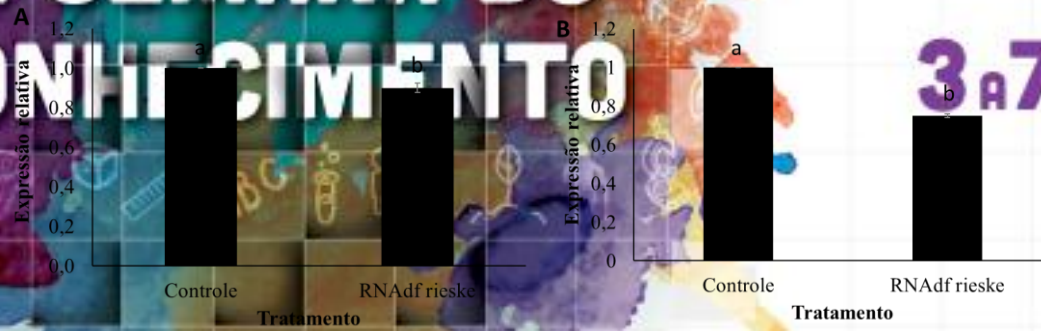


Figura 3 – Expressão relativa do gene *rieske* nas larvas de *Helicoverpa armigera* em 3º estágio de desenvolvimento alimentadas com RNAi *rieske* e controle. Amostras do tecido digestório (A) e corporal (B). Colunas seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste T. As barras indicam o erro padrão da média.