

OBTENÇÃO DE RNA DE BICHO-MINEIRO (*Leucoptera coffeella*) PARA TRANSCRITÔMICA E SILENCIAMENTO GÊNICO

Leonardo de Amorim Vidal¹; Juliana Dantas de Almeida²; Eduardo Romano de Campos Pinto³; Adriano Dely Veiga⁴; Diana Fernandez⁵; Oliveiro Guerreiro Filho⁶; Érika Valéria Saliba de Albuquerque⁷

¹ Bolsista CNPq, Agronomia, Universidade de Brasília-UnB, leonardoamorimvidal@gmail.com

² Pesquisadora, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, juliana.dantas@embrapa.br

³ Pesquisador, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, eduardo.romano@embrapa.br

⁴ Pesquisador, PhD, Embrapa Cerrados, Brasília-DF, adriano.veiga@embrapa.br

⁵ Pesquisadora, PhD, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier-França, diana.fernandez@ird.fr

⁶ Pesquisador, PhD, Centro de Café Alcides Carvalho, Instituto Agronômico (IAC), Campinas-SP, oliveiro@iac.sp.gov.br

⁷ Pesquisadora, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, erika.albuquerque@embrapa.br

RESUMO: O Brasil é o maior produtor de café do mundo, com uma produção de aproximadamente 59 mil toneladas em 2018 gerando uma receita aproximada de 22 bilhões de reais. Para garantir uma alta produtividade, a cultura exige adubação e manejo fitossanitário adequado. Dentre as principais pragas que afetam a cultura está o bicho-mineiro do cafeeiro *Leucoptera coffeella* (*Lepidoptera: Lyonetiidae*), que em altos níveis de infestação pode causar até 100% de desfolha e queda de até 72% de produtividade. Considerando-se a dificuldade em fontes de resistência para melhoramento genético do cafeeiro para a praga em foco e as limitações na eficiência e durabilidade dos tratamentos químicos e de controle biológico, um método alternativo promissor de controle como o silenciamento gênico por RNA interferente (RNAi) pode ser desenvolvido. As sequências de genômica e a transcritômica de *L. coffeella* necessárias para a seleção de genes-alvo do RNAi ainda são desconhecidas. Visando o sequenciamento do transcritoma de *L. coffeella*, o presente trabalho objetivou o estabelecimento de protocolos para a obtenção de insetos em diferentes fases do desenvolvimento e a respectiva extração do RNA das amostras, tendo em vista o fato de não haver referências de extração do transcritoma da praga na literatura. Foram realizadas em laboratório a coleta de ovos, larvas recém eclodidas, larvas em alimentação, pupas e adultos, para extração do RNA. Obtivemos material suficiente dos insetos para proceder à extração de RNAs das fases de larva, pupa e adultos. O resultado em duplicata da extração de RNA total da fase adulta indica que o protocolo foi estabelecido com sucesso, pois obtivemos a quantidade necessária para o sequenciamento (mínimo de 10 µg). O estudo da expressão gênica do inseto permitirá maior conhecimento de suas características para a criação de estratégias de controle desta praga nas lavouras cafeeiras do país.

PALAVRAS-CHAVE: *Leucoptera coffeella*, RNAi, RNA, Transcritoma.

COFFEE LEAF MINER (*Leucoptera coffeella*) RNA OBTAINMENT TO TRANSCRIPTOMIC AND GENE SILENCING

ABSTRACT: Brazil is the largest coffee producer in the world, producing over 59 thousand tons in 2018, this production generated 22 billions of reais to Brazil. To ensure this high production, this culture demands the correct fertilizing and management of pests and diseases. Among the most harmful pests to coffee plants is the coffee leaf miner *Leucoptera coffeella* (*Lepidoptera: Lyonetiidae*), that in Brazil, when in high population, can cause 100% of defoliation and 72% of production losses. Considering the difficulty to obtain genetical enhancement sources to this prague and the limitations at biological and chemical products efficiency and durability, an alternative and promising method to control this insect is the control by gene silencing per RNA interference (RNAi). The genomic and transcriptomic sequences of *L. coffeella* that are needed to the selection of target genes to RNAi are still unknown. Aiming at sequencing of the *L. coffeella* transcriptome, the research group objectified the establishment of protocols for obtaining insects at its various life stages and the extraction of the sample's RNA, in view of not existing references to the transcriptome extraction in literature. Eggs were harvested, newly hatched larvae, feeding larvae, pupae and adults were collected for RNA extraction. Were obtained enough insects to proceed to the extraction the insects at the larval, pupae and adults. The results show that the protocol were successfully established, having been obtained enough material to the sequencing (minimum of 10 µg). The genic expression study will allow major knowledge of the insect allowing the creation of control strategies at the coffee crops over the country.

KEY WORDS: *Leucoptera coffeella*, RNAi, RNA, Transcriptome, coffee leaf miner.

INTRODUÇÃO

O bicho-mineiro do cafeeiro *Leucoptera coffeella* (*Lepidoptera: Lyonetiidae*) apresenta ciclo de vida variando de 27 a 46 dias, onde as larvas vivem entre 7 e 11 dias, as pupas de 5 a 20 dias e os adultos aproximadamente 15 dias

(GUERREIRO FILHO, 2006). Por ser um inseto monófago, alimenta-se apenas de plantas de café, tornando-se uma praga exclusiva do cafeeiro. Entretanto, por se tratar de uma cultura perene, não há a possibilidade de rotação de cultura para controle dessa praga.

Considerando-se o fato de não haver relatos na literatura de protocolo específico de extração de RNA para *L. coffeella*, é necessário adaptar protocolos existentes de tecidos animais para o material biológico coletado desse inseto. Adicionalmente, não existe até o momento dados de genômica e transcritômica disponíveis para esse inseto (TRIAN; CINEL; KAWAHARA, 2018).

Neste trabalho, foram estabelecidos métodos de coleta de folhas infestadas com a praga (Figs. 1 e 2), métodos para eclosão de crisálidas e coleta de adultos em sistema fechado (Figs. 3 e 4) e método de extração de RNA (Fig. 5) em coluna de resina por afinidade.



Figura 1 – Coleta a campo de folhas infestadas com bicho-mineiro do cafeeiro nas fases de ovos, larvas e crisálidas.



Figura 2 – Folhas de café infestadas com bicho-mineiro do cafeeiro: (a) folhas caídas na saia da planta após desfolha e (b) crisálidas de sobre folhas destacadas.

MATERIAL E MÉTODOS

A coleta do inseto se deu na Embrapa Cerrados onde foram coletados insetos em várias fases de desenvolvimento para posterior isolamento em laboratório. As folhas infestadas presas à planta foram levadas para o laboratório para coleta de larvas, pupas e ovos com o auxílio de lupas. As folhas coletadas no solo em torno da saia da planta, portanto secas e com maior número de crisálidas (Fig. 2a) foram colocadas em sistema adaptado para eclosão (Fig. 3) para a coleta dos adultos em frasco de vidro (Fig. 4). Imediatamente após serem coletados, todas as amostras do inseto foram congeladas em nitrogênio (N_2) líquido.

Para a extração do RNA total, foi utilizado o kit Promega ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System - protocolo para tecidos fibrosos, com tratamento de DNase *on column*. A estimativa da quantidade e integridade do RNA foi feita por eletroforese em gel de agarose não desnaturante. A quantificação do material extraído foi feita no NanoDrop™ 2000 Thermopor espectrofotometria da absorbância a 230, 260 e 280 nm.



Figura 3 – Sistema de eclosão de crisálidas de bicho-mineiro do cafeeiro.



Figura 4 – Adultos de bicho-mineiro do cafeeiro coletados de sistema de criação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento da coleta do inseto em diferentes estádios do desenvolvimento foi expressivo: para ovos foram coletados 4 tubos com aproximadamente 10 μL cada, larvas recém eclodidas coletamos 4 tubos com 50 μL cada, para larvas em herbivoria foram coletados 8 tubos com 150 μL , foram coletados 13 tubos de pupas com 300 μL , e adultos foram coletados 15 tubos contendo 500 μL . Os valores de espectrometria obtidos (Tabela 1) indicam que i) o rendimento do RNA da amostra 1 foi de 5,9 μg de RNA e da amostra 2 de 26 μg ; ii) a pureza das amostras apresentou uma relação A260/A280 próximo da faixa esperada de 1,7 a 2,1. Os gráficos da espectrometria mostram boa inflexão da curva (Fig. 5a e b), indicando boa qualidade das amostras. Serão necessários testes adicionais para a verificação da qualidade antes do envio para sequenciamento.

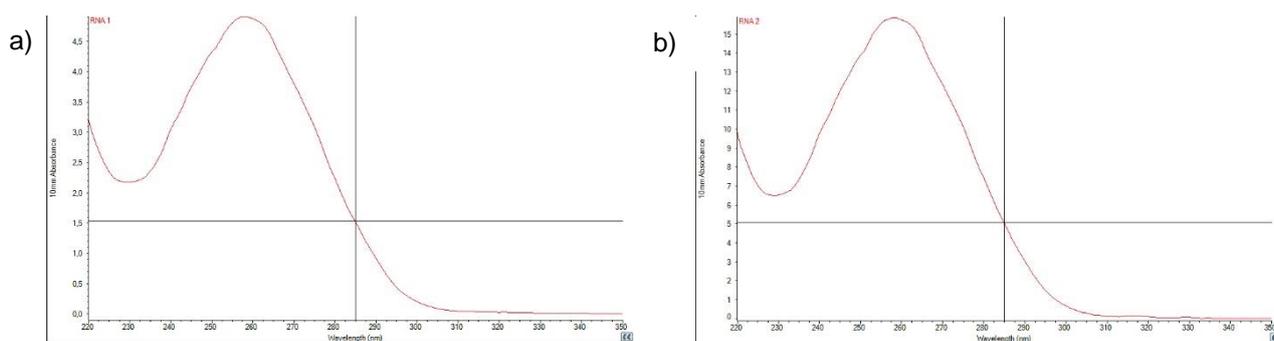


Figura 5 – Gráfico de quantificação das amostras 1 (a) e 2 (b) no NanoDrop™

Tabela – 1: Resultados de absorvâncias das amostras 1 e 2 no NanoDrop™

| Amostra | Quantificação (ng/ μL) | A260 ¹ (nm) | A280 ² (nm) | A260/A280 ³ | A260/A230 ⁴ | RNA Total (μg) |
|-----------|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------------|
| Amostra 1 | 195,1 | 4,878 | 2,239 | 2,18 | 2,22 | 5,858 |
| Amostra 2 | 582,6 | 14,565 | 6,755 | 2,16 | 2,46 | 26,217 |

A260¹: 40 μg de ssRNA/mL

A280²: absorvância relativa

A260/A280³: absorvância relativa

A260/A230⁴: absorvância relativa

CONCLUSÕES

1. Após a análise das amostras em gel de agarose e a quantificação no NanoDrop™ 2000 Thermo, pode-se inferir que os protocolos estabelecidos foram eficazes para a extração do RNA de bicho mineiro do cafeeiro.
2. O RNA obtido possibilitará a elaboração do transcrito do inseto em suas diferentes fases de desenvolvimento.
3. Com os dados obtidos, será possível proceder ao desenvolvimento de ativos biotecnológicos baseados em RNAi para gerar produtos para o manejo dessa praga que vem causando prejuízos em larga escala nas lavouras cafeeiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GUERREIRO FILHO, O. Coffee leaf miner resistance. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 18, n. 1, p. 109–117, mar. 2006.

TRIAN, D. A.; CINEL, S. D.; KAWAHARA, A. Y. Lepidoptera genomes: current knowledge, gaps and future directions. *Current Opinion in Insect Science, Insect genomics * Development and regulation*. v. 25, p. 99–105, 1 fev. 2018.

Boletim Conab Café setembro 2018.

Protocolo *Promega ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System* para tecidos fibrosos.