

DETECÇÃO DE *HALYOMORPHA HALYS VIRUS* (HHV) NAS FASES DE OVO, NINFA E ADULTO DE *EUSCHISTUS HEROS*

JULIANA WEGNER¹; ERICMAR ÁVILA DOS SANTOS²; LARISSA LONGARAY MACHADO³; BRUNO FREITAS FARIAS⁴; MOISÉS JOÃO ZOTTI⁵

¹ Universidade Federal de Pelotas – juliana.wegner1@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – ericmar.santos@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – larissa.longaraym@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – bruno.f.far@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – moises.zotti@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O RNA de interferência (RNAi) representa uma sequência de processos biológicos que utilizam uma maquinaria celular conservada nos organismos eucariotos para regulação da expressão gênica, controle de transposons e resposta imune a infecções virais (AGRAWAL et al., 2003).

Existem variações que se diferenciam na origem do RNAi e no mecanismo específico pelo qual o silenciamento do gene é realizado, a via mais estudada é desencadeada pela presença de uma molécula de RNA de fita dupla (dsRNA) e seguem uma ordem semelhante de eventos. O dsRNA, ou RNA fita dupla, é processado em pequenos RNAs de interferência chamados siRNAs (*small interfering RNA*), cujo comprimento varia em torno de 21-25 pares de base, pela proteína Dicer ou seus homólogos (RNases) e incorporado em um complexo de proteínas conhecido como RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA) (ELBASHIR et al., 2001). Este complexo usa uma das fitas do siRNA como um guia para encontrar e se ligar a uma sequência complementar em um RNA mensageiro específico (mRNA). O complexo RISC realiza a degradação do mRNA ou a interrupção da tradução do mRNA em proteína. Essas descobertas tiveram um impacto profundo em nossa compreensão da regulação da expressão gênica e forneceram uma ferramenta poderosa para conduzir pesquisas sobre a função dos genes.

Para o manejo de insetos, pode-se utilizar o RNAi por via transformativa, através de transgenia, ou não-transformativa. Os sistemas de silenciamento gênico induzido por vírus (*Virus-induced gene silencing* - VIGS) consiste em uma das formas de entrega de dsRNA por via não-transformativa. Essa técnica consiste na modificação de um vírus a fim de liberar uma dsRNA específica para o inseto de interesse (SANTOS, 2019). Os vírus podem ser transmitidos horizontalmente de indivíduo para indivíduo, ou verticalmente, sendo transmitido de pais para filhos. Alguns vírus podem ser retidos por horas ou dias após a aquisição, e outros podem permanecer até o fim da vida do inseto, ou seja, de forma propagativa persistente (GRAY & BANERJEE, 1999).

O gênero Iflavirus (ordem *Picornavirales*) é composto por espécies capazes de infectar artrópodes, porém o processo de contágio é pouco estudado. A maioria das infecções causadas por vírus desse gênero, não resulta em sinais visíveis de infecção ou distúrbios (VAN OERS, 2010). O iflavirus *Halyomorpha halys virus* (HhV) foi identificado pela primeira vez em *Halyomorpha halys* (SPARKS et al. 2016) e encontrado nos transcriptomas de antenas de três espécies de pentatomídeos no Brasil: *Chinavia ubica*, *Euschistus heros* e *Dichelops melacanthus* (DOS SANTOS et. al., 2019). Cinco espécies de vírus foram reunidas

e identificadas a partir de dados de RNAseq de *E. heros*, entre estes, o vírus HhV foi o predominante, demonstrando potencial como candidato a construção de um vetor de silenciamento (SANTOS et. al., 2018). No entanto, são necessárias mais informações sobre a interação dessa espécie de vírus com o hospedeiro para possibilitar o desenvolvimento de um vetor de silenciamento baseado no HhV. A identificação dos estágios de desenvolvimento do inseto em que o HhV pode ser detectado fornece evidências sobre algumas características dessa interação. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi verificar a presença de HhV nas fases de ovo, ninfa e adulto de *E. heros*.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados aproximadamente 30 ovos, uma ninfa de quarto instar e um adulto de *E. heros*, obtidos em uma criação de laboratório na Universidade Federal de Pelotas. As amostras biológicas foram utilizadas para extração de RNA utilizou-se o reagente RNazol® RT RNA Isolation Reagent (Sigma-Aldrich), seguindo as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% para avaliação da integridade das bandas e armazenadas à -80°C até o momento da sua utilização. Posteriormente, o cDNA foi sintetizado utilizando o kit de transcriptase reversa GoScript™ Reverse Transcription (Promega), seguindo as instruções do fabricante. As amostras de cDNA foram armazenadas à -20°C até sua utilização.

Os primers utilizados para detecção do vírus HhV (HhVD1) foram desenhados por Santos (2019) para detecção do vírus, e utilizados em uma reação de PCR para confirmar a presença do vírus em amostras de cDNA. As reações foram preparadas utilizando o kit GoTaq® DNA Polymerase (Promega), o protocolo utilizado foi otimizado a partir das instruções do fabricante. As reações foram conduzidas em 20,5 µL de volume total, sendo: 4,0 µL de tampão de PCR; 1,2 µL de 25mM MgCl₂; 0,6 µL de 10mM dNTPs; 0,6 µL de primer forward; 0,6 µL de primer reverse; 0,2 µL de Taq DNA polimerase; 0,9 µL de cDNA (de ovos, ninfa ou adulto) e 12,4 µL de água livre de nuclease. As condições de PCR foram ajustadas a 94°C por 2 minutos (desnaturação); 35 ciclos a 94°C por 30 segundos (desnaturação), 60°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 45 segundos (síntese); por fim uma etapa final de síntese a 72°C por 10 minutos. Para a verificação dos fragmentos amplificados, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%. Uma alíquota de 2 µL de cada amostra foi corado com 1 µL de uma solução de GelRed® (Biotium) e 4 µL de BlueJuice™ (Invitrogen). O marcador de DNA 100bp (Kasvi) foi utilizado como referência do tamanho das bandas. Após a eletroforese, o gel foi visualizado através do uso de um equipamento transiluminador de luz ultravioleta.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primer utilizado foi desenhado para amplificar uma sequência de aproximadamente 300 pares de base (pb). Os fragmentos de DNA de mesmo tamanho formam uma "banda" no gel, portanto, após a amplificação das amostras de cDNA com os primers desenhados para detecção do vírus, foram visualizadas bandas evidentes com o tamanho esperado nas reações realizadas nas fases de ovo, ninfa e adulto (Figura 1).

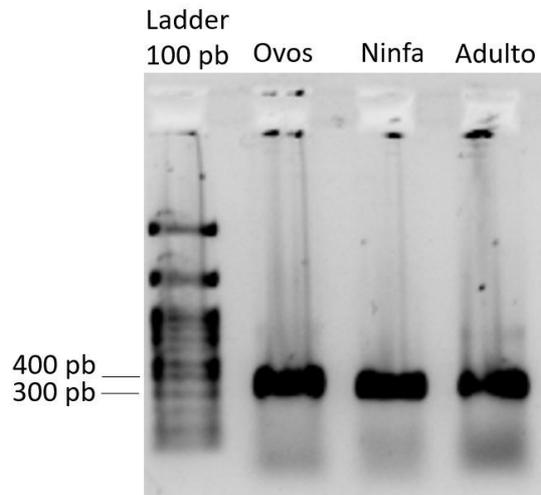


Figura 1 PCR com primer HhVD1 para detectar HhV em amostras de ovo, ninfa de quarto instar e adulto de *E. heros*

A detecção do HhV no estágio de ovo indica que há transmissão vertical entre indivíduos de *E. heros*, possivelmente por contaminação transovariana ou transovo. Além disso, a detecção do vírus em todos os estágios de desenvolvimento indica que o tipo de infecção do HhV é persistente. A transmissão vertical do tipo transovariana, ocorre porque o vírus penetra no folículo embrionário, vindo a infectar o embrião, ou durante a oviposição, quando o vírus é transmitido para dentro dos ovos a partir da micrópila (abertura do ovo) no momento em que os ovos passam pelo oviduto. Já a transmissão do tipo transovo, ocorre a partir da infecção dos ovos com o vírus no momento da oviposição, ficando depositado na superfície do ovo. Nesse sentido, a efetividade dos vetores VIGS para indução do silenciamento é afetada, pois devido à infecção persistente o vírus se replica de maneira lenta nas células hospedeiras (VOGEL et al. 2018). Em dados de transcriptoma de antenas, dos Santos et al. (2019) identificou a presença de HhV em menores níveis em estágios ninfais, com um aumento no estágio adulto. Esses resultados reforçam a hipótese de ocorrência de infecção persistente com aumento dos níveis de HhV ao longo do desenvolvimento do inseto. Durante infecções persistentes, a resposta de RNAi pode ser reduzida, vindo a não alcançar o efeito de silenciamento esperado. Além disso, vírus com predominância de transmissão vertical possuem menor velocidade de dispersão do vírus em uma população de insetos, o que é um problema para o desenvolvimento de VIGS (NOURI et al. 2018). Dos Santos et al. (2019) relataram que em dez insetos da espécie *E. heros* coletados aleatoriamente no campo, apenas um foi detectado com o HhV. Esses resultados corroboram com a hipótese de haver predominância de transmissão vertical, no entanto mais estudos são necessários para verificar a ocorrência de transmissão horizontal.

4. CONCLUSÕES

Os resultados indicam que o HhV causa infecção persistente e possui transmissão vertical entre indivíduos de *E. heros*. Novos estudos devem ser conduzidos a fim de verificar se ocorre transmissão horizontal entre indivíduos dessa espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, N., DASARADHI, P.V.N., MOHMMED, A., MALHOTRA, P., BHATNAGAR, R.K., MUKHERJEE, S.K. RNA interference: Biology, mechanism, and applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** Vol. 67: 657–685. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14665679/>.
- DOS SANTOS E. R, TRENTIN L. B, ECKER A, SILVA L. A, BORGES M, MOWERY J. D, RIBEIRO B. M, HARRISON R. L, ARDISSON-ARAÚJO D. M. P. An iflavivirus found in stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) of four different species. **Virology**. 2019 Aug;534:72-79. doi: 10.1016/j.virol.2019.06.002. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31207441.
- ELBASHIR, S.M., HARBORTH, J., WEBER, K., TUSCHL, T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. **Methods** Vol. 26: 199–213. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12054897/>.
- GRAY SM, BANERJEE N. Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal virus. **Microbiol Mol Biol Rev** 63: 128–148. 1999. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/MMBR.63.1.128-148.1999>.
- NOURI, S. et al. Insect-specific viruses: from discovery to potential translational applications. **Current Opinion in Virology**, v. 33, p. 33–41, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.07.006>
- SANTOS, E. A. Prospecção de vírus de RNA para o desenvolvimento de vetor de silenciamento em *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). 52f. Dissertação-Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019. Disponível em: http://quaiaca.ufpel.edu.br/bitstream/prefix/5256/1/resumo_dissertacao_ericmar_a_vila_santos.pdf.
- SANTOS, E. A. KREMER, F.; TANING, C. N. T.; CAGLIARI D.; CHRISTIAENS, O.; BORCHARDT, L.; SMAGGHE, G.; ZOTTI, M.J. First report and characterization of Halyomorpha halys virus in *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). In: **XXVII Congresso Brasileiro de Entomologia e X Congresso Latino-Americano de Entomologia**. Gramado. 2018. **Anais eletrônicos**. 1625. 2018. Disponível em: https://seb.org.br/admin/files/book/book_nfiYsVG2XrzO.pdf.
- VAN OERS, M. Genomics and Biology of Iflaviruses. In: **Insect Virology**. Caister Academic Press, Norfolk, pp. 231–250. 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/254843843_Genomics_and_Biology_of_Iflaviruses.
- VOGEL, E. et al. RNA Interference in Insects: Protecting Beneficials and Controlling Pests. **Frontiers in physiology**, v. 9, n. January, p. 1912, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01912>