

Resumo

SANTOS, Éricmar Avila dos. **Prospecção de vírus de RNA para o desenvolvimento de vetor de silenciamento em *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)**. 2019. 52f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

O percevejo marrom, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae), é uma importante espécie de inseto-praga fitófago por causar perdas econômicas consideráveis na cultura da soja. Devido ao súbito aumento na importância econômica desta praga, existem limitadas opções de manejo disponíveis para os produtores. Por esse motivo, existe uma forte dependência do uso de inseticidas de amplo espectro, não seletivos e altamente tóxicos, que podem persistir no meio ambiente e afetar organismos não-alvo. Dessa forma, é fundamental o desenvolvimento de novas ferramentas que sejam eficientes na proteção dos cultivos e que causem menor impacto ambiental. Nesse sentido, a técnica de RNA interferente (RNAi) apresenta potencial para o desenvolvimento de novas estratégias no manejo de insetos. Existem diversas formas de aplicação do RNAi para o manejo de insetos, por vias transformativas ou não-transformativas. Dentre as estratégias não-transformativas, se encontra o silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS). Essa estratégia consiste no uso de um vírus geneticamente modificado para induzir o silenciamento de um gene alvo após a infectar um inseto-hospedeiro. Para que seja possível desenvolver soluções baseadas em VIGS, é necessário realizar a identificação, caracterização molecular, caracterização biológica e construção de um clone infeccioso de uma espécie de vírus capaz de infectar e se replicar no inseto-alvo. Nesse sentido, o objetivo deste estudo é identificar e caracterizar um vírus de RNA em *E. heros* com potencial utilização na construção de um vetor de VIGS. Dessa forma, foi realizado o sequenciamento do transcriptoma de *E. heros* e posterior montagem e identificação dos transcritos virais. O genoma viral com maior número de transcritos por milhão foi selecionado para a realização da caracterização molecular, identificação de sua distribuição nas regiões produtivas do Brasil e para a construção de um clone infeccioso possibilitando estudos mais aprofundados de sua biologia e posterior desenvolvimento de um vetor de VIGS. Foram identificadas 5 espécies de vírus, entre estes, o Halyomorpha halys vírus (HhV) (*Picornavirales, Iflaviridae*) que representou 99,9% da contagem total de transcritos virais identificados, portanto foi selecionado para as etapas seguintes. O HhV é um vírus de +ssRNA com aproximadamente 9kb de comprimento, composto por 5'UTR, uma ORF de poliproteína e um 3'UTR contendo uma cauda poli A. O estudo de sua distribuição indica que existe um padrão de ocorrência ou de diferença de carga viral entre as populações de *E. heros* do sul e das regiões centro-oeste e sudeste do Brasil. Foi possível amplificar o genoma do vírus HhV em 4 fragmentos, dentre estes, os últimos três foram efetivamente clonados em plasmídeos. Os resultados obtidos indicam que o HhV apresenta potencial para o desenvolvimento de um vetor de VIGS em *E. heros*, no entanto, são necessários mais experimentos para elucidar sua distribuição, amplitude de hospedeiros e para construir um clone

infeccioso, que será a base necessária para caracterizar a biologia do vírus e para desenvolver um vetor VIGS em *E. heros*.

Palavras-chave: Percevejo-marrom, Iflaviridae, distribuição espacial, RNAi, VIGS.

Abstract

SANTOS, Éricmar Avila dos. **Prospection of RNA viruses for silencing vector development in *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae).** 2019. 52f. Dissertation (Master degree in Entomology) – Postgraduate Program in Entomology, Institute of Biology, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

The neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae), is a major phytophagous insect pest that causes considerable economic losses in soybean crops. Due to the sudden increase in the economic importance of this pest, there are limited management strategies currently available, mostly relying on highly toxic wide-spectrum insecticides. For this reason, there is a strong dependence on the use of non-selective and highly toxic broad-spectrum insecticides that can persist in the environment and affect non-target organisms. Thus, it is crucial to develop new tools, which are efficient and reduce the environmental impact. In this way, the RNA interference (RNAi) technique represents has potential for the development of new insect management strategies. There are several applications of RNAi in insect management, by means of transformative or non-transformative strategies. The virusinduced gene silencing (VIGS) is among the non-transformative strategies. This strategy is based on a genetically modified virus for target gene silencing after insect host infection. In order to develop solutions based on VIGS, it is necessary to carry out the identification, molecular characterization, biological characterization and construction of an infectious clone of a virus species capable of infecting and replicating the target insect. In this context, the objective of this work is to identify and characterize an RNA virus in *E. heros* with potential use in the construction of a VIGS vector. For this purpose, the sequencing of *E. heros* transcriptome and subsequent assembly and identification of viral transcripts was performed. The viral genome with the highest number of transcripts per million was selected for the molecular characterization, for identification of distribution in the productive regions of Brazil and for the construction of an infectious clone enabling more in-depth studies of its biology and subsequent development of a vector of VIGS. Five virus species were identified, amongst them the Halyomorpha halys virus (HhV) (Picornavirales: Iflaviridae) represented 99.9% of the absolute viral transcripts count, in this way, the HhV was selected for the next steps. HhV is a + ssRNA virus with approximately 9 kb in length, composed of 5'UTR, a polyprotein ORF and a 3'UTR containing a poly A tail. The study of its distribution indicated that there is a pattern of occurrence or difference in viral load between the populations of *E. heros* from the south and from the central-west and southeast regions of Brazil. It was possible to amplify the HhV virus genome in 4 fragments, of which the last three were effectively cloned into plasmids. The results indicate that HhV is potential candidate for the development of a VIGS vector in *E. heros*, however, further experiments are needed to elucidate its distribution, host amplitude and to construct an infectious clone, which will be the necessary base to characterize the biology of the virus and to develop a VIGS vector in *E. heros*.

Keywords: Neotropical stinkbug, Iflaviridae, spatial distribution, RNAi, VIGS.