

Resumen

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleóptera: Curculionidae), es un insecto plaga que causa grandes daños y pérdidas económicas en el cultivo del café en numerosos países productores del grano. Las estrategias tradicionales de manejo de la broca del café han sido insatisfactorias, por lo que se hace necesario implementar otras medidas y estrategias de manejo para este insecto plaga. Disponer de información genómica de insectos plaga representa una importante contribución para el estudio detallado de su biología y para la identificación de genes que puedan eventualmente ser blanco de silenciamiento. En esta investigación se obtuvo el transcriptoma de tres estados de desarrollo de *H. hampei* (L2, hembras y machos), el cual fue secuenciado utilizando para ello la plataforma Illumina y posteriormente ensamblado *de Novo*. El análisis de la expresión diferencial de genes se realizó a través de las diferentes etapas de desarrollo del insecto. El ensamble final produjo 29.434 unigenes, de los cuales 4.664 transcripciones se expresaron diferencialmente.

Una de las estrategias más recientes para el manejo de insectos plaga en cultivos lo constituye el uso de ARNi, un mecanismo biológico mediante el cual ARN de cadena doble (ARNcd), aplicado exógenamente, conduce a la degradación del ARN mensajero (ARNm) específico, regulando la expresión específica de un gen. Con el fin de evaluar el efecto de la aplicación de secuencias de ARNcd sobre la expresión de los genes *Snf7*, *vATPase-A* y *Ssk* en la broca del café, *H. hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), se sintetizó en el laboratorio de biología molecular de la Universidad de Caldas ARNcd (63 pb) específico para cada gen. Durante siete días, 192 hembras adultas (96 por repetición) provenientes de granos de café cereza fueron alimentadas en una placa tipo Elisa que contenía café pergamino molido con una solución de ARNcd específica para cada gen (2 µg/100 µl). El nivel de expresión de cada gen se midió mediante RT-qPCR, utilizando para ello ADN complementario (ADNc) y cebadores específicos. Los resultados obtenidos indican que el nivel de silenciamiento génico en el tratamiento con ARNcd para *Snf7*, *vATPase-A* y *Ssk*, comparado con el tratamiento control, fue en promedio 71.9%, 83.8% y 42.44% respectivamente. Se concluye que el silenciamiento de los genes *vATPase-A* y *Snf7*, en adultos de la broca de café es efectivo y en consecuencia podrían considerarse como genes candidatos a silenciamiento génico como estrategia futura de manejo y control de este insecto plaga.

La expresión relativa de los genes *Snf7* y *Ssk* en el estado larval L2 de la broca del café (*H. hampei*) fue 22 y 11 veces mayor que en huevos (estado de referencia), respectivamente. El aumento en la expresión de *Snf7* en L2 de broca del café sugiere un aumento en la degradación de proteínas de estructuras larvales. La sobreexpresión de *Ssk* en L2 podría indicar que este gen es necesario para la digestión, así como también para la regulación osmótica e iónica del sistema renal (túbulos de Malpighi) en larvas de *H. hampei*. La sobreexpresión de estos genes contribuye con el crecimiento y desarrollo de L2, además sugiere que este instar podría ser blanco de silenciamiento para futuros experimentos con ARNcd.

Palabras clave: *H. hampei*, transcriptoma, ARNm, silenciamiento génico, control de insectos plaga.

Abstract

The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* F., is the most serious insect pest of coffee in many of the major coffee-producing and coffee-exporting countries in the world, causing severe economic damage and crop losses. Traditional management strategies against the Coffee Berry Borer (CBB) have not been satisfactory. However, it is necessary to develop novel technologies for the management of this insect. Genomic resources related to insect pests makes an important contribution to the study of their biology and to the identification of genes that may eventually be a target for silencing. In this research, *de novo* assembly of sequenced transcriptome of three different developmental stages of *H. hampei* (L2, males and females) was obtained using RNA-seq with Illumina HiSeq. Differential gene expression analysis was performed between the developmental stages. The final assembly produced 29,434 unigenes, of which 4,664 transcripts were differentially expressed.

RNA interference (RNAi) is one of the recent biotechnological tools that may be useful in crop protection and pest management. RNAi is a biological mechanism that induces rapid and sustained degradation of specific mRNAs when exogenous double-stranded RNA (dsRNA) is introduced into the cells of diverse eukaryotic organisms. This mechanism can

inhibits or activates gene expression. With the main goal to evaluate the effect of exogenous application of dsRNA on the expression of *Snf7*, *vATPase-A* and *Ssk* genes to CBB, *H. hampei* females (Coleoptera: Curculionidae), dsRNA-specific (63 bp) against each gene was synthesized in the molecular biology laboratory of the University of Caldas. 192 CBB female adults (96 per repetition) from coffee berries were maintained on ground parchment coffee bean treated with dsRNA-specific (2 µg/100 µl) in an ELISA Microplates for seven days. The expression levels of three *H. hampei* essential genes candidates were quantified by RT-qPCR, using for this purpose cDNA and specific primers. Results suggest that feeding of *Snf7*-dsRNA, *vATPaseA*-dsRNA and *Ssk*-dsRNA resulted in suppression of *Snf7*, *vATPase-A* and *Ssk* expression in female adults with an average of 71,9%, 83,8% and 42,44% suppression relative to controls at seven days after feeding, respectively. In this research we conclude that silencing on *vATPase-A* and *Snf7* genes of CBB female adults is evident, so these could be candidate genes for gene silencing, a future strategy for control and management of this insect pest.

The relative expression of the *Snf7* and *Ssk* genes in the larval stage L2 of the CBB (*H. hampei*) was 22 and 11 times higher than in eggs (reference developmental stages), respectively. The up-regulation of *Snf7* and *Ssk* genes in the L2 larval stage suggested the possibly increased digestion activity of larval structural proteins. The up-regulation of *Ssk* in L2 suggested that the *Ssk* gene plays a critical role in the regulation of important functions such as digestion and it could be involved in osmotic and ionic regulation of the renal system (Malpighian tubules) in L2 larval stage of *H. hampei*. The up-regulation of these specific target genes in L2 larval stage contributes to the growth and development of L2 instar, which suggests that this instar could be a target of silencing for future experiments with dsRNA.

Key words: *H. hampei*, transcriptome, mRNA, gene silencing, insect pest control