

Comportamento de dsRNA GFP em plantas de milho visando controle de pragas pela tecnologia do RNAi¹

Raquel Oliveira Moreira², Beatriz de Almeida Barros³, Newton Portilho Carneiro⁴

¹ Trabalho financiado pelo CNPq/ Embrapa; ² Estudante do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq – Embrapa; ² Analista da Embrapa Milho e Sorgo; ³ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

RESUMO

A infestação de doenças e insetos-pragas pode causar grandes perdas de produção em cultivos agrícolas. Portanto, é essencial o desenvolvimento de tecnologias alternativas de manejo, que irão reduzir as perdas de produção causadas pelo ataque de pragas. Uma delas é o uso da tecnologia do RNA interferência (RNAi). O objetivo desse trabalho foi estudar a estabilidade em solução e a mobilidade de moléculas de dsRNA em plântulas de milho. Para avaliar a estabilidade do dsRNA em solução foram testados três tratamentos: água ultrapura, meio MS e solução nutritiva de Magnavaca, contendo dsRNA em três concentrações diferentes: 6, 1,2 e 0,6 ng/uL. Foram realizadas coletas em diferentes tempos após o preparo de cada solução (0, 1, 3, 6 e 24h). O volume coletado foi utilizado para a síntese de cDNA e a detecção dos fragmentos referentes ao dsRNA foi feita por meio de RT-PCR. Para verificar a mobilidade do dsRNA, plântulas de milho foram colocadas em contato com solução contendo essas moléculas e, durante um período de 8 horas após a exposição, foram realizadas cinco coletas (0, 2, 4, 6 e 8h) das partes distais das folhas. A detecção do dsRNA foi feita utilizando PCR em tempo real. As moléculas de dsRNAs se apresentaram estáveis nos diferentes tratamentos, mas a solução nutritiva de Magnavaca apresentou melhores resultados. Plântulas de milho absorveram rapidamente moléculas de dsRNA e sua detecção aumentou gradualmente, atingindo um nível máximo após 6h de contato com a solução contendo dsRNAs. Nesse sentido, novos experimentos devem ser conduzidos para a determinação da durabilidade dessas moléculas em organismos vegetais.

Palavras-chave: Milho, Insetos-praga, RNA interferência, dsRNA.

Introdução

A infestação de insetos-pragas pode causar grandes perdas de produção nas culturas. Muitas tecnologias já foram desenvolvidas para combater esses insetos que vão desde a prática do controle biológico e inseticidas químicos até a produção de plantas GM (geneticamente modificadas) (MOREIRA et al., 2012).

Entre os biopesticidas existentes, que são poucos no mercado, os mais comuns são aqueles à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt). Essa bactéria gram-positiva, encontrada no solo, produz proteínas tóxicas (Cry) que quando ingeridas pelo inseto, são convertidas para a sua forma tóxica (delta endotoxina), provocando alterações no intestino do inseto e causando a morte dele (HANSEN; SALAMITOU, 2000). Em contrapartida, com a utilização da tecnologia e a redução gradativa dos indivíduos suscetíveis, vem ocorrendo uma seleção dos indivíduos resistentes à toxina Bt, aumentando assim a frequência dos insetos resistentes e a recorrência de acasalamento entre estes indivíduos. Mais uma vez o setor agrícola busca a produção e eficiência de novas tecnologias que visam o combate de populações Bt-resistentes (MENDES; WAQUIL, 2013). Apesar do isolamento de um grande número de genes *cry* e a

potencialidade de se utilizar várias combinações por meio da piramidação de genes, as indústrias do setor agrícola não foram capazes de sobressair-se diante da seleção de indivíduos resistentes dentro das populações de insetos-pragas. Portanto, torna-se urgente a identificação de tecnologias alternativas que irão controlar os insetos Bt-resistentes.

RNA de interferência (RNAi) é um processo biológico que ocorre em todas as células eucarióticas e permite o silenciamento de genes a nível pós-transcricional, reduzindo a atividade de genes específicos (AGRAWAL et al., 2003). Utilizando essa tecnologia, tem sido possível verificar a regulação negativa da expressão de genes do inseto quando RNAs de dupla fita (dsRNA) específicos são adicionados em sua dieta (CHRISTIAENS; SMAGGHE, 2014). Vê-se, portanto, a potencialidade da utilização desses fragmentos como biopesticidas através de pulverização nos tecidos vegetais ou pela obtenção de plantas transgênicas capazes de expressá-los constitutivamente. Nesse sentido, torna-se de grande importância o estudo do comportamento dessas moléculas no solo, na planta e principalmente no inseto, a fim de viabilizar esse processo comercialmente.

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a estabilidade em solução e a mobilidade de moléculas de dsRNA em plântulas de milho.

Material e Métodos

Inicialmente, moléculas de dsRNA referentes ao GFP foram gentilmente cedidas pelo Dr. Eduardo de Andrade Chumbinho (Embrapa LABEX-USA, USDA-ARS, EUA). O fragmento GFP (**Figura 1A**) foi amplificado utilizando primers contendo o fragmento referente ao promotor T7 na extremidade 5' (**Figura 1B**) e clonado no vetor pGEM para a produção do dsRNA. Para a síntese de dsRNA GFP utilizou-se o kit T7 Megascript (Ambion) conforme instruções do fabricante.

Após a síntese, a qualidade do dsRNA GFP foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience) em diluição de 1:1000 na amostra. A concentração do dsRNA GFP foi determinada no Espectrofotômetro Nanodrop modelo 1000 UV-VIS.

(A)

```

1 taatacgaactcactatagggcgaAGGTAATGGTGTCTGTTAAAGGACAGGGCCATCGC
61 CAATTGGAGTATTTTGTGATAATGATCAGCGAGTTGCACGCCGCCGCTCTTCGATGTTGT
121 GCGGGGTCTTGAAGTTGGCTTTGATGCCGTTCTTTGCTTGTCGGCCATGATGTATACGT
181 TGTGGGAGTTGTAGTTGTATCCAACTGTGGCCGAGGATGTTCCGTCCTCCTTGAAAT
241 CGATTCCTTAAGCTCGATCCTGTGTGAGGAGGTGTCCTCCTTAAGTACCTCAGCAC
301 GTGCTTGTAGTTCCCGTCGCTTGAAGAAGATGGTCTCTCTGCAAGTATCCCTCAG
361 GCATGGCGCTCTTGAAGAAGTCGTGCCGCTTCATATGATCTGGGTATCTTGAAAAGCATT
421 GAACACCATAAGAGAAAGTAGTGCAAAAGTGTGGCTcgcacctatagtgagtcgtattaaa
481 t

```

(B)

```

GFP T7F: 5'tGCCAACACTTGTCACTACTTTCTCTT 3'
GFP T7R: 5'taatacgaactcactatagggcgaAGGTAATGGTGTCTGTTAAAGGAC 3'

```

Figura 1. Sequência GFP (A) e os primers promotores T7_GFP nas extremidades (B).

Os experimentos para avaliar a mobilidade do dsRNA em plantas de milho são montados de forma que as plântulas sejam colocadas em contato com uma solução contendo dsRNA, que deve permanecer estável durante todo o experimento. Para a montagem desse experimento, foram testados os tratamentos compostos por água ultrapura, meio Murashigue-Skoog (MS) líquido e solução de Magnavaca

(MAGNAVACA et al., 1987) contendo dsRNA em três concentrações diferentes de 6,0, 1,2 e 0,6 ng/uL. As soluções foram mantidas em temperatura ambiente e 10,0 uL foram coletados após o preparo de cada solução, em diferentes tempos: 0, 1, 3, 6 e 24h.

O volume coletado foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante. A RT PCR foi preparada em um volume final de 20µl, utilizando 3µl do cDNA (diluído 1:10), 2,5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM KCl; 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen), 0,125 mM dNTPs e 0,0125 pmols de cada iniciador (F: 5' – TCAAGGAGGACGGAAACATC – 3' e R: 5' - GGTCCTCTCCTGCACGTATC – 3'). Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, 35 ciclos de 94 °C por 20 s, 55 °C por 20 s e 72 °C por 20 s, seguido por uma elongação final de 72 °C por 5 min. Os resultados finais foram avaliados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,0%.

Para avaliar a mobilidade do dsRNA foram utilizadas plântulas pertencentes à linhagem de milho L3, no 8º dia de germinação, imergindo a planta com seu sistema radicular em um recipiente contendo a solução de Magnavaca e dsRNA GFP (0,6 ng/uL) (**Figura 2**).



Figura 2. Aparato para avaliação da mobilidade do dsRNA GFP em plântulas de milho.

Durante um período de 8 horas após a exposição das plântulas ao dsRNA, foram realizadas cinco coletas (0, 2, 4, 6 e 8h) das partes distais das folhas das plântulas para serem utilizadas na extração de RNA. Foram coletadas três repetições biológicas por tratamento.

O RNA foi extraído utilizando o RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) e o cDNA foi sintetizado a partir de 1,0 ug de RNA total conforme descrito anteriormente.

A detecção do dsRNA GFP foi analisada por PCR em tempo real utilizando Fast SYBR® Green Master Mix 2x (Applied Biosystems) e os primers específicos para GFP, denominados F4 (5'- CGATGGCCCTGTCCTTTTAC- 3') e R4 (5'- TTTTCGTTGGGATCTTTCGAA- 3'). As reações foram realizadas em triplicatas no equipamento Real-Time PCR System 7500 (Life Technologies).

Resultados

A análise do dsRNA GFP por espectrofotometria e por eletroforese indicou que a amostra sintetizada apresenta qualidade e concentração satisfatória para a realização dos experimentos (**Figura 3**).

Por meio da RT-PCR foi possível verificar que as moléculas de dsRNA permaneceram estáveis, pois o amplicon esperado (~400 pb) foi observado sob todas as

condições testadas (**Figura 4**). No entanto, baseando-se na intensidade de banda obtida, foi estabelecido que a solução nutritiva de Magnavaca apresentou melhor resultado (**Figura 4**), sendo, então, a solução indicada para a realização do experimento seguinte.

Pela análise de PCR em tempo real pode-se observar que as plântulas de milho rapidamente absorveram a molécula de dsRNA e que a detecção aumentou gradualmente atingindo um nível máximo após 6h de contato com a solução (**Figura 5**).

MM dsRNA



Figura 3. Análise de qualidade de dsRNA. dsRNA em gel de agarose 1% corado com GelRed (canaleta 2). MM = 1 Kb Plus Ladder (Invitrogen).

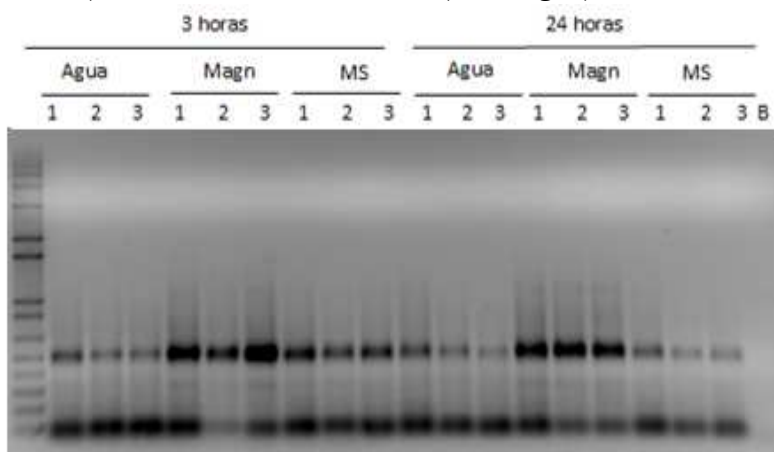


Figura 4. RT-PCR para análise da estabilidade de moléculas de dsRNA em diferentes meios. B = branco. Concentrações de dsRNA foram 6 ng/uL (1), 1,2 ng/uL (2) e 0,6 ng/uL (3).

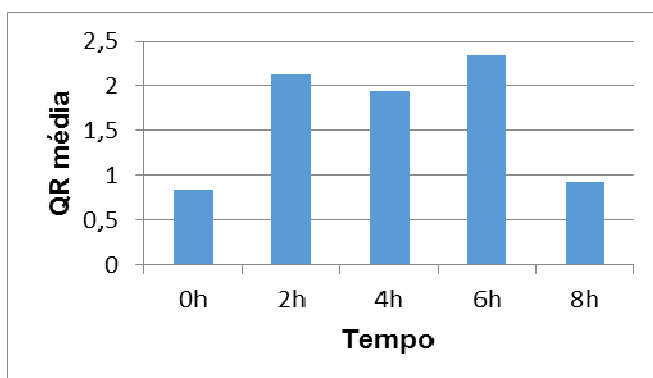


Figura 5. Níveis de detecção de dsRNA em plântulas de milho. QR = quantificação relativa média das três repetições biológicas.

Essa rápida detecção de dsRNA em partes distais das plântulas evidenciou uma alta mobilidade dessas moléculas. Novos experimentos serão desenvolvidos para avaliar

o tempo que essas moléculas ficam estáveis e passíveis de detecção dentro das plântulas analisadas.

Conclusão

As moléculas de dsRNAs apresentaram-se estáveis em temperatura ambiente nas três soluções testadas (água ultrapura, meio MS líquido e solução de Magnavaca), mas a solução nutritiva de Magnavaca forneceu melhores resultados.

Plântulas de milho absorveram rapidamente moléculas de dsRNA e sua detecção aumentou gradualmente atingindo um nível máximo após 6h de contato com a solução contendo dsRNAs. Novos experimentos devem ser conduzidos para a determinação da durabilidade dessas moléculas em organismos vegetais já que essas moléculas foram detectadas após 24 horas.

Referências

AGRAWAL, N.; DASARADHI, P. V.; MOHMED, A.; MALHOTRA, P.; BHATNAGAR, R. K.; MUKHERJEE, S. K. RNA interference: biology, mechanism, and applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 67, n. 4, p. 657-685, 2003.

CHRISTIAENS, O.; SMAGGHE, G. The challenge of RNAi-mediated control of hemipterans. **Current Opinion in Insect Science**, v. 6, p. 15-21, 2014.

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J. F.; DELECLUSE, A.; NIELSEN-LE, R. C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 41-44.

MAGNAVACA, R.; GARDNER, C. O.; CLARK, R. B. Evaluation of inbred maize lines for aluminum tolerance in nutrient solution. In: GABELMAN, H. W.; LOUGHMAN, B. C. (Ed.). **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1987. p. 255-265.

MENDES, S. M.; WAQUIL, J. M. Milho: por que o refúgio é tão importante. **A Granja**, Porto Alegre, v. 69, n. 776, p. 68-73, ago. 2013.

MOREIRA, M. F.; MANSUR, J. F.; MANSUR, J. F. Resistência e inseticidas: estratégias, desafios e perspectivas no controle de insetos. In: SILVA NETO, M. A. C.; WINTER, C. (Org.). **Tópicos avançados em entomologia molecular**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, 2012. cap. 15, p. 1-25.