



## POTENCIAL DE TRANSLOCAÇÃO DE dsRNA EM VAGENS DE SOJA PARA ESTUDOS DE SILENCIAMENTO GÊNICO EM INSETOS

FERNANDES, J.B.<sup>1</sup>; NOMURA, R.B.G.<sup>2</sup>; PASINI, A.<sup>1</sup>; ROGGIA, S.<sup>3</sup>; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.<sup>3</sup>;

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina - UEL, Pós graduação Agronomia, Londrina, PR, joanbrigo@gmail.com; <sup>2</sup>Universidade Estadual de Londrina - UEL, Pós graduação Biotecnologia; <sup>3</sup>Embrapa Soja.

A cultura soja se tornou uma das cadeias agrícola de maior importância para a economia brasileira (MAPA, 2017), possuindo pragas e doenças que cada vez mais ganham resistência aos métodos de controle químico utilizados por seu uso indiscriminado (Oliveira et al., 2016).

A partir da descoberta de moléculas que atuam silenciando genes específicos, sendo nomeado como RNA de interferência (RNAi), vários métodos de utilização e aplicação foram e estão sendo desenvolvidos no intuito de revolucionar métodos de controle de diversos organismos (Hannon, 2002; Boutros & Ahringer, 2008).

O mecanismo de RNA interferente (RNAi) é um processo que ocorre naturalmente em organismos eucarióticos. Trata-se de um processo que causa o silenciamento de genes antes de sua tradução, pela degradação do mRNA (Obbard, et al., 2009). Este processo foi descrito primeiramente em plantas e nomeado como silenciamento gênico pós-transcricional, ou PTGS (Jorgensen, et al., 1996).

O RNAi apresenta grande potencial biotecnológico devido a sua elevada especificidade, podendo assim colaborar para o campo da entomologia (Gordon & Waterhouse, 2007), seja para o estudo funcional de genes ou mesmo como uma ferramenta alternativa para o controle de insetos praga na agricultura (Price & Gatehouse, 2008). De maneira geral, estudos de RNAi nesses insetos são realizados através da utilização de plantas geneticamente modificadas para expressarem RNAs de dupla fita (dsRNAs) ou utilizando moléculas exógenas introduzidas por meio de microinjeção (Fishilevich et al., 2016).

Este trabalho tem como objetivo avaliar a viabilidade da utilização do mecanismo de RNAi para o estudo de genes em insetos, por via alimentar, em vagens de soja. Essa metodologia, conhecida como “Aplicação Ectópica”, se baseia na absorção direta do dsRNA no tecido vegetal, sendo posteriormente absorvida pelo inseto após se alimentar das plantas, resultando no silenciamento gênico. Trata-se de uma metodologia menos onerosa quando comparada às utilizadas tradicionalmente, que já vem sendo empregado com sucesso em estudos em outros organismos e alguns insetos. Neste estudo, foi avaliada a capacidade de translocação do dsRNA em vagens de soja. Para isso, foram utilizadas moléculas de dsRNA sem complementaridade com os transcritos da soja.

O experimento foi conduzido no laboratório de biotecnologia da Embrapa Soja, em Londrina, PR, durante o ano de 2017. Para se avaliar a capacidade de translocação da solução de dsRNA nas vagens, foram preparados 3 tubos de 2 mL com uma microgota no fundo dos mesmos contendo 50 µL de solução com concentração de 10 ng de dsRNA GFP. Após foram coletadas 3 vagens de soja BRS 1001 IPRO padronizadas com 3 sementes. Previamente a introdução da vagem no tubo, foi feito um corte de parte do pedúnculo para manter a parte viva em contato com a solução. Posteriormente o pedúnculo da vagem foi colocado em contato na microgota no interior do tubo e armazenado por 24h em BOD à 26°C com fotoperíodo de 14h sendo o volume totalmente absorvido neste período de tempo. Após, as vagens foram retiradas dos tubos, lavadas com água destilada, seccionadas em três



partes referentes aos segmentos das sementes, separadas as valvas das sementes e congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente foram colocadas em tubos de 2 mL para identificação e armazenamento em freezer à  $-80^{\circ}\text{C}$ . As valvas foram separadas e identificadas da seguinte maneira: VX 1.1, 1.2, 1.3; VX 2.1, 2.2 e 2.3; VX 3.1, 3.2 e 3.3; VX 4.1, 4.2 e 4.3 e VX 5.1, 5.2 e 5.3 sendo referente à repetição da vagem após a secção.

O RNA total de cada secção das vagens foi extraído individualmente através do método Trizol (Invitrogen®), seguido de reações de PCR qualitativo utilizando iniciadores específicos para um fragmento de 206pb, para avaliação da presença do dsRNA no tecido vegetal. Para cada reação foram utilizados 100 ng de RNA total.

Através das análises por PCR, foi observado a presença do dsRNA e sua estabilidade e integridade após 24h (Figura 1), sendo principalmente detectado nas secções da vagem próximo ao pedúnculo, local onde foi administrado o dsRNA. A estabilidade do dsRNA 24 horas após a aplicação no tecido vegetal evidenciando o potencial de aplicação dessa tecnologia tanto para ensaios de validação de genes em insetos pragas da soja e/ou seu uso potencial como ferramenta de controle.

Dada a variação no perfil de translocação entre as 5 vagens avaliadas, sugere-se que mais testes sejam conduzidos, tanto variando a dose como tempo de incubação. Adicionalmente, ensaios com manutenção do fluxo hídrico, o que pode favorecer a translocação do dsRNA, podem ser considerados.

## Referências

- BOUTROS, M.; AHRINGER, J. The art and design of genetic screens: RNA interference. **Nature Reviews: Genetics**, London, v. 9, n. 7, p. 554–566, July 2008.
- FISHILEVICH, E., VÉLEZ, A.M., KHAJURIA, C., FREY, M.L.F., HAMM, R.L., WANG, H., SCHULENBERG, G.A., BOWLING, A.J., PENCE, H.E., GANDRA, P., ARORA, K., STORER, N.P., NARVA, K.E., SIEGFRIED, B.D., Use of chromatin remodeling ATPases as RNAi targets for parental control of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) and Neotropical Brown stink bug (*Euschistus heros*), **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, doi: 10.1016/j.ibmb.2016.02.004, 2016.
- GORDON, K.H.J.; WATERHOUSE, P.M. RNAi for insect-proof plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, n. 11, p. 1231-1232, Nov. 2007.
- HANNON, G.J. RNA interference. **Nature**, London, v. 418, p. 244-251, July 2002.
- JORGENSEN, R. A.; CLUSTER, P. D.; ENGLISH, J.; QUE, Q.; NAPOLI, C. A., Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. **Plant molecular biology**, v. 31, n. 5. p. 957-973. 1996.
- MAPA. **Balança comercial brasileira: Dados consolidados**. Brasília: MDIC, 2017.
- OBBARD, D. J.; GORDON, K. H.; BUCK, A. H.; JIGGINS, F. M., The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 364, n. 1513. p. 99-115. 2009.
- OLIVEIRA, J., MARIANO, P., PEREIRA, C., THEODORO, C., TOMQUELSKI, G.V. Eficiência de inseticidas no controle do percevejo-marrom. Resumos expandidos da **XXXV Reunião de pesquisa de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2016. 282 p.
- PRICE, D.R.G., GATEHOUSE, J.A., 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. **Trends in Biotechnology** 26, 393–400.



**Figura 1.** Resultados de reação de PCR e Eletroforese em vagens de soja seccionadas com translocação de dsRNA GFP. VX 1.1 vagem 1 secção 1, VX 1.2 vagem 1 secção 2, VX 1.3 vagem 1 secção 3, VX 2.1 vagem 2 secção 1, VX 2.2 vagem 2 secção 2, VX 2.3 vagem 2 secção 3, VX 3.1 vagem 3 secção 1, VX 3.2 vagem 3 secção 2, VX 3.3 vagem 3 secção 3, VX 4.1 vagem 4 secção 1, VX 4.2 vagem 4 secção 2, VX 4.3 vagem 4 secção 3, VX 5.1 vagem 5 secção 1, VX 5.2 vagem 5 secção 2, VX 5.3 vagem 5 secção 3.