

## Otimização da produção de dsRNA em *Escherichia coli* (HT-115) para controle de *Diaphorina citri*

Layanna Rebouças de Santana Cerqueira<sup>1</sup>; Thais de Jesus dos Santos<sup>2</sup>; Eduardo Chumbinho de Andrade<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Estudante de Mestrado da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, lay\_anna1@hotmail.com bolsista CAPES ; <sup>2</sup>Estudante de Biomedicina da Faculdade Maria Milza, Mangabeira, BA, bolsista FAPESB, thais.js16@hotmail.com; <sup>3</sup>Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Eduardo.andrade@embrapa.br

O uso da tecnologia de interferência de RNA (RNAi) para o manejo de pragas se abre para uma estratégia de controle ecologicamente correta, chamada “Controle de Pragas Altamente Específico” (HiSPeC). Assim, o dsRNA apresenta-se como ingrediente ativo de uma nova classe de biopesticida. Um método de produção de dsRNA que tem sido explorado é o uso de sistemas fermentativos usando cepas de *Escherichia coli* modificadas, como o HT-115 (DE3). O objetivo deste trabalho foi determinar os melhores parâmetros para o crescimento de *E. coli* (HT-115) e produção de dsRNA. Inicialmente foi estabelecido um protocolo padrão, a saber: um pré-inóculo foi preparado transferindo uma colônia de *E. coli* HT-115 / T7 express para 5 mL de meio LB com ampicilina e incubado a 37 °C / 250rpm por 16 horas. Em seguida, 1 mL da suspensão bacteriana foi transferido para um tubo contendo 10 mL de meio LB com ampicilina e incubado a 37 °C / 250 rpm. O crescimento bacteriano foi acompanhado pela leitura da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro. A suspensão bacteriana foi induzida pela adição de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) a uma concentração final de 0,4 mM quando a DO<sub>600</sub> atingiu 0,4. Ao atingir uma leitura de DO<sub>600</sub> igual a 1,0, a bactéria foi coletada por centrifugação a 5000 rpm / 5 minutos. A extração do dsRNA foi realizada pelo método de lise por temperatura associado à extração orgânica e a concentração foi estimada em gel de agarose 1% e compradas com o DNA Lambda (λ). A partir desse protocolo foi montado o experimento, modificando apenas o parâmetro a ser avaliado. Os parâmetros avaliados foram meio de cultivo (LB, 2YT e SOC); momento da indução (DO<sub>600</sub> 0,4 e 0,7); concentração do indutor (0,4; 0,6 e 0,8 mM) e temperatura de crescimento/indução (30 e 37 °C). O crescimento de bactérias em meio LB promoveu a maior produção de dsRNA em comparação aos demais meios, atingindo um rendimento de 700 ng / mL. Induzir a produção de dsRNA em DO<sub>600</sub> 0,4 resultou em um rendimento 70% superior comparado ao DO<sub>600</sub> 0,7. Entre as concentrações de IPTG, maior produção de dsRNA foi obtida com IPTG a 0,8 mM e o cultivo a uma temperatura de incubação de 37 °C levou a um rendimento quase três vezes maior do que a temperatura de 30 °C. Desse modo, até o momento ficaram estabelecidos os seguintes parâmetros: meio de cultivo LB; momento de indução na DO<sub>600</sub> 0,4; e temperatura de incubação de 37 °C. A otimização desses parâmetros permitiu um aumento significativo na produção em 157%.

**Significado e impacto do trabalho:** A produção de dsRNA usando o sistema bacteriano pode ser eficazmente empregada para produzir uma grande quantidade de dsRNA com custo relativamente baixo para possibilitar o desenvolvimento de produtos baseados na tecnologia de RNAi tanto para o controle de *D. citri* quanto para outras pragas.