

Otimização da produção de dsRNA em *Escherichia coli* para controle da *Diaphorina citri* via RNA interferente

Márcio Leandro da Silveira Fonseca¹, Layanna Rebouças de Santana Cerqueira² e Eduardo Chumbinho de Andrade³

¹Estudante de Bacharelado em Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bolsista da FAPESB, Cruz das Almas, BA; ²Mestranda em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA; ³Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

RNA interferente (RNAi) é um mecanismo que ocorre naturalmente em plantas, animais e fungos, exercendo um importante papel na regulação da expressão gênica e atuando na defesa celular contra ácidos nucleicos invasores, tais como transposons e vírus. A via de RNAi é desencadeada pela presença de moléculas de RNA fita dupla (double stranded RNA ou dsRNAs), resultando na degradação sequência-específica de RNAs homólogos dos dsRNAs ativadores. Diversas pesquisas empregam bactérias como *Escherichia coli* para a produção de dsRNA, utilizando sistemas fermentativos, devido à facilidade de manuseio, alta taxa de crescimento e baixo custo. A tecnologia de RNAi é uma potencial ferramenta para combater o Huanglongbing do citros (HLB), por meio do uso de dsRNA para controle do inseto vetor do HLB, o psílídeo *Diaphorina citri*. O objetivo deste estudo foi de otimizar os parâmetros de crescimento bacteriano e da cinética de produção de dsRNA, visando o desenvolvimento de fábricas bacterianas de dsRNA mais eficientes, potencializando sua produtividade e expandindo a aplicação dessa tecnologia. Para os testes foram avaliados os parâmetros temperatura (30°C ou 37°C), velocidade de agitação (180 ou 250 rpm) e meios de cultura (LB, 2YT, SOC). Os testes foram realizados utilizando 10 mL de meio de cultura contendo a estirpe engenheirada de *E. coli* HT-115 com o plasmídeo T7 express, que consiste no plasmídeo pUC-57 contendo uma construção gênica composta de um fragmento do gene MET-1 do psílídeo flanqueado em ambas extremidades com a sequência do promotora e terminadora da T7 RNA polimerase. O crescimento bacteriano foi acompanhado pela leitura da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro. Ao atingir um DO₆₀₀ igual a 0,4, a suspensão bacteriana foi induzida pela adição de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) a uma concentração final de 0,4 mM e mantida nos agitadores até atingir uma leitura de DO₆₀₀ igual a 1,0, quando a bactéria foi coletada por centrifugação à 5000 rpm/5 minutos e o dsRNA extraído utilizando o reagente Trizol. Os resultados demonstraram que, entre os meios testados, o meio LB obteve maior produção de dsRNA atingindo um rendimento de 700 ng/mL, muito superior ao obtido com os meios 2YT (221,30 ng/mL) e SOC (36,82 ng/mL). O cultivo a uma temperatura de incubação de 37 °C obteve um rendimento de 1803,57 ng/mL de dsRNA, quase três vezes maior que o rendimento obtido com um cultivo a temperatura de 30 °C, 730,81 ng/mL. O parâmetro agitação não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, de acordo com o teste t a 5% de probabilidade. Assim, para a produção de dsRNA utilizando *E. coli* HT-115, é proposto utilizar o meio LB, com incubação a 37°C e 250 rpm, para que obtenha o melhor valor possível. Outros parâmetros ainda precisam ser ajustados.

Significado e impacto do trabalho: A tecnologia de RNA interferente pode controlar patógenos e vetores de doenças com mais especificidade e menos danos ambientais. Os resultados deste trabalho auxiliam no aprimoramento do sistema bacteriano para produção de dsRNA, permitindo a produção em larga escala e baixo custo, potencializando a futura utilização do controle via RNAi na agricultura.