

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Soja
Ministério da Agricultura e Pecuária*

Eventos Técnicos & Científicos

3

Junho, 2024

RESUMOS EXPANDIDOS

39^a Reunião de Pesquisa de Soja

**26 e 27 de junho de 2024
Londrina, PR**

*Embrapa Soja
Londrina, PR
2024*

Embrapa Soja

Rodovia Carlos João Strass, acesso Orlando Amaral, Distrito de Warta
Caixa Postal 231, CEP 86001-970, Londrina, PR
Fone: (43) 3371 6000
Fax: (43) 3371 6100
www.embrapa.br/soja
https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Comitê de Publicações da Embrapa Soja

Presidente: *Adeney de Freitas Bueno*

Secretário-executivo: *Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite*

Membros: *Claudine Dinali Santos Seixas, Clara Beatriz Hoffmann-Campo, Fernando Augusto Henning, Ivani de Oliveira Negrão Lopes, Leandro Eugênio Cardamone Diniz, Maria Cristina Neves de Oliveira, Mônica Juliani Zavaglia Pereira e Norman Neumaier*

Edição executiva: *Vanessa Fuzinatto Dall'Agnol*

Normalização: *Valéria de Fátima Cardoso*

Diagramação: *Marisa Yuri Horikawa*

Organização da publicação: *Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite, Claudine Dinali Santos Seixas*

1ª edição

Publicação digital: PDF

As opiniões emitidas nesta publicação são de exclusiva e de inteira responsabilidade dos autores, não exprimindo, necessariamente, o ponto de vista da Embrapa.

É de responsabilidade dos autores a declaração afirmando que seu trabalho encontra-se em conformidade com as exigências da Lei nº 13.123/2015, que trata do acesso ao Patrimônio Genético e ao Conhecimento Tradicional Associado.

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Soja

Reunião de Pesquisa de Soja (39. : 2024 : Londrina, PR).

Resumos expandidos 39ª Reunião de Pesquisa de Soja, Londrina, PR, 26 e 27 de junho de 2024

-- Londrina : Embrapa Soja, 2024.

PDF (195 p.) -- (Eventos técnicos & científicos / Embrapa Soja, ISSN 0000-0000 ; 3).

1. Soja. 2. Pesquisa agrícola. I. Título. II. Série.

CDD (21. ed.) 633.34072

MÉTODOS DE DELIVERY DE dsRNA PARA ESTUDOS DE SILENCIAMENTO GÊNICO VIA RNAi EM *Euschistus heros* (PERCEVEJO-MARROM)

ROSA, J. DA⁽¹⁾; VIANA, A. J. C.⁽¹⁾; ROGGIA, I.⁽¹⁾; MORAES, J. S.⁽¹⁾; BUENO, A. DE F.⁽²⁾; MARIN, S. R. R.⁽²⁾; NEPOMUCENO, A. L.⁽²⁾; MERTZ-HENNING, L. M.⁽²⁾

⁽¹⁾Bolsista de Estímulo a Inovação - Fundação Arthur Bernardes/Embrapa Soja; ⁽²⁾Embrapa Soja, Londrina, PR

Introdução

O silenciamento da expressão de um gene via RNA de interferência (RNAi) é um processo biológico natural observado em organismos eucariotos. Esse processo é ativado pela presença de um RNA de fita dupla (dsRNA). Dentro do citoplasma da célula o dsRNA é processado pela maquinaria de RNAi, a ribonuclease DICER reconhece e cliva em fragmentos menores de 19 a 22 nucleotídeos. Esses fragmentos menores, denominados de *small-interfering RNA* (siRNA), são então ligados ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (Lee et al., 2010). O complexo RISC se liga a um mRNA que tenha sequência complementar a uma das fitas do siRNA e promove a clivagem e a degradação de mRNAs, culminando no silenciamento da expressão daquele gene e conseqüentemente levando a redução do nível de proteínas. O conhecimento desse sistema tem levado ao desenvolvimento de novos produtos com ação sobre os insetos-praga de importância na sojicultura, tal como o percevejo-marrom.

O percevejo-marrom (*Euschistus heros*) é considerado a principal praga da cultura da soja no Brasil, em virtude de seu difícil controle. Estima-se que em torno de 40% dos inseticidas químicos aplicados na soja sejam para o controle de percevejos (Tuelher et al., 2018). O percevejo-marrom apresenta o hábito de se alimentar da seiva, podendo causar o abortamento de vagens e sementes, e ainda impactar no peso e na qualidade de grãos e sementes. Desse modo, é fundamental o desenvolvimento de uma nova alternativa para o controle desses percevejos.

O uso da tecnologia do RNAi pode ser uma excelente alternativa à utilização de inseticidas químicos devido à especificidade das moléculas, evitando efeitos em polinizadores, por exemplo, além de ser uma molécula biodegradável. Com *E. heros* a realização de bioensaios é um desafio, visto que esse inseto possui enzimas na saliva que degradam o dsRNA. Além disso, a escolha de genes alvo é um ponto importante para a eficiência da técnica, sendo em muitos casos necessário testar um grande número de genes alvo em fases iniciais de estudo. Ademais, nos estudos para desenvolvimento de produtos baseados em RNAi uma dificuldade é a escolha do método mais eficiente para os testes dos dsRNA alvos na fase inicial e um método de entrega que seja mais próximo à realidade do campo, posteriormente.

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o delivery de dsRNA via microinjeção e ingestão oral utilizando substâncias protetoras, com o intuito de desenvolver um protocolo de aplicação para testes de dsRNA alvos para controle de percevejo-marrom.

Material e Métodos

Os espécimes do percevejo-marrom no estágio adulto foram obtidos do Laboratório de Criação de Percevejos da Embrapa Soja. As moléculas de dsRNA alvo utilizadas nos bioensaios foram obtidas em empresa especializada na fabricação de moléculas de dsRNA (RNA Greentech). O gene alvo selecionado tem função no transporte intracelular, portanto, atua no funcionamento basal das células dos eucariotos. Para os bioensaios foram adotados dois sistemas de delivery: o primeiro consistiu na injeção de uma solução contendo dsRNA diretamente na hemolinfa do inseto (microinjeção) e o segundo consistiu em delivery oral via bolinhas de algodão.

Na microinjeção foram aplicados 1 µL de solução de dsRNA no abdômen dos percevejos adul-

tos, ou seja, 28 ng de cada dsRNA mg^{-1} de biomassa corporal dos percevejos adultos. A microinjeção foi realizada com o auxílio de uma seringa com agulha de 29 G acoplada no aparelho auto microapplicator (Burkard, UK). Após a microinjeção, os insetos foram mantidos em caixas tipo gerbox. No delivery oral a solução contendo dsRNA ($100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) foi disponibilizado em pequenas bolas de algodão, umedecida com 1 mL de cada formulação e colocada em caixas tipo gerbox para permitir a alimentação dos percevejos por 24 h. Para os bioensaios foram utilizados percevejos-marrom adultos submetidos a jejum prévio de 16 h. Foram testados três meios de proteção das moléculas de dsRNA: EDTA (3%), encapsulamento com hidróxidos duplo-lamelares (HDL) e quitosana. Após o tratamento quatro réplicas biológicas de 10 insetos foram mantidas em caixas tipo gerbox sob condições controladas no Laboratório de Criação de Percevejos da Embrapa Soja e alimentados com a dieta padrão de manutenção dos insetos. O efeito dos tratamentos foi acompanhado diariamente até o 15º dia após o tratamento.

Os dados de mortalidade dos insetos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e Kruskal Wallis seguidos pelo teste de médias de Tukey e Dunn com $p < 0,05$. Para essas análises foi utilizado o software Prism.

Resultados e Discussão

Diversos métodos de delivery são utilizados nos estudos para controle de insetos, tais como microinjeção, ingestão e pulverização. Neste trabalho, foram escolhidas duas alternativas de delivery de dsRNA: microinjeção e delivery oral via bolinhas de algodão umedecidas utilizando substâncias que garantam a proteção das moléculas de dsRNA.

Após a microinjeção com microapplicator foi observada elevada mortalidade (65%) do percevejo-marrom nove dias após a aplicação, indicando o alto potencial de utilização desse método de delivery para provas de conceito (Figura 1A). A microinjeção, conforme esperado, mostrou-se um método rápido e eficaz de entrega de dsRNA. Tal método supera as barreiras externas e enzimas degradadoras de dsRNA (dsRNases) presentes na saliva desses insetos.

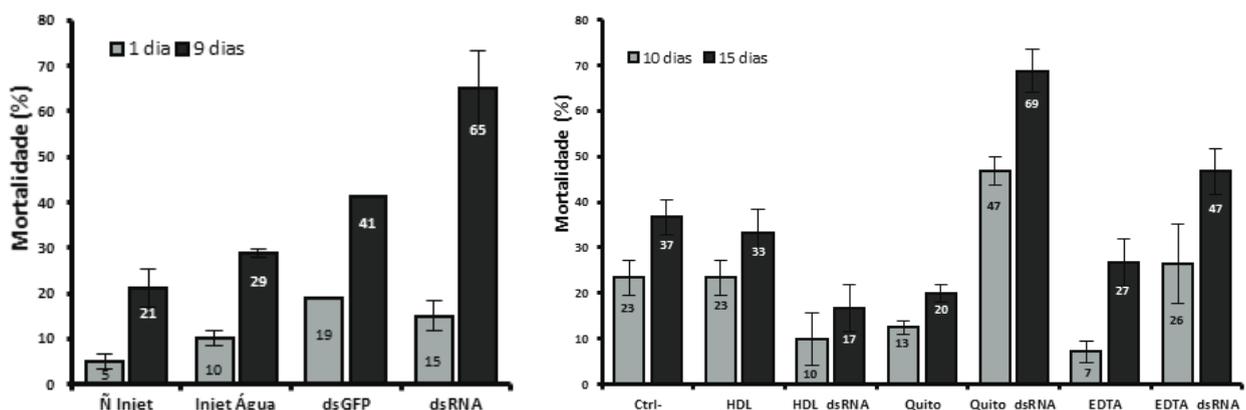


Figura 1. Mortalidade do percevejo-marrom via silenciamento gênico por RNAi. A) Aplicação por microinjeção e B) delivery oral via bolinhas de algodão. As barras indicam as médias de mortalidade e as barras de erro representam o erro padrão. * indicam diferença estatística significativa pelo Teste Tukey, $p < 0,05$ e Dunn $p < 0,05$, respectivamente.

Uma vez confirmada a eficácia do dsRNA alvo em relação à mortalidade do percevejo-marrom via microinjeção, uma abordagem de delivery oral que possui características mais próximas do cenário de campo foi testada. Com a finalidade de proteção do dsRNA para o delivery oral foram escolhidas partículas na escala nanométrica para envolver a molécula do dsRNA: HDL e quitosana. Além disso, também foi testada a adição de um agente quelante, EDTA, na formulação. Foi obtida uma taxa significativa (69%) de mortalidade dos percevejos pela abordagem delivery oral com bolinhas de algodão contendo dsRNAs formulados com quitosana (Figura 1B). As formulações contendo HDL e EDTA não foram efetivas na proteção das moléculas de dsRNA e, portanto,

não foi observada mortalidade significativa. Todavia, apesar dos resultados satisfatórios com a formulação de dsRNA encapsulado com quitosana, efeitos tóxicos sobre os percevejos foram observados quando o composto foi administrado sem a presença de dsRNA.

O delivery via ingestão apresenta algumas barreiras e desafios, como a instabilidade das moléculas de dsRNA frente a condições ambientais, a internalização do dsRNA pela membrana celular e a presença de nucleases, que podem diminuir a eficiência e/ou a ocorrência de silenciamento gênico. O percevejo-marrom ao se alimentar insere seu aparelho bucal (estilete) no tecido vegetal e secreta uma solução de enzimas pela saliva e entre essas enzimas temos aquelas que degradam o dsRNA, as dsRNases. Nessas circunstâncias, as moléculas de dsRNAs, quando desprotegidas podem ser rapidamente degradadas pelo meio ambiente e no corpo do inseto, sendo, portanto, crucial uma formulação que proteja o dsRNA (Song et al., 2019).

O uso de quitosana já é bem descrito associado com diferentes moléculas de RNA para controle de lagartas como *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa armigera* (Gurusamy et al., 2020; Kolge et al., 2021). Contudo, para percevejos, ainda são necessários estudos relacionados à sua formulação, visando reduzir o efeito tóxico. A quitosana associada ao delivery oral por meio de bolinhas de algodão é uma alternativa interessante para o controle de percevejo-marrom, sendo essa viável para testes próximos à realidade de campo, onde os percevejos podem se alimentar das moléculas de dsRNA aplicadas.

Conclusão

O delivery de dsRNA via microinjeção e por alimentação via bolinhas de algodão se mostraram interessantes para estudos de silenciamento gênico via RNAi em percevejo-marrom. Adicionalmente, o encapsulamento com quitosana foi promissor como formulação de proteção, embora novos estudos sejam necessários para avaliar sua toxicidade.

Referências

- GURUSAMY, D.; MOGILICHERLA, K.; PALLI, S. R. Chitosan nanoparticles help double-stranded RNA escape from endosomes and improve RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Archives of Insect Biochemical Physiology**, v. 104, n. 4, e21677, 2020.
- KOLGE, H.; KADAM, K.; GALANDE, S.; LANJEKAR, V.; GHORMADE, V. New Frontiers in Pest Control: Chitosan Nanoparticles-Shielded dsRNA as an Effective Topical RNAi Spray for Gram Podborer Biocontrol. **ACS Applied Biomaterials**, v. 4, p. 5145-5157, 2021.
- LEE, Y. S.; NAKAHARA, K.; PHAM, J. W. Distinct roles for Drosophila DICER-1 and DICER-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. **Cell**, v. 117, p. 69-81, 2010.
- SONG, H.; FAN, Y.; ZHANG, J. Contributions of dsRNases to differential RNAi efficiencies between the injection and oral delivery of dsRNA in *Locusta migratoria*. **Pest Management Science**, v. 75, p. 1707-1717, 2019.
- TUELHER, E. S.; SILVA, É. H. da; RODRIGUES, H. S. Area-wide spatial survey of the likelihood of insecticide control failure in the neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. **Journal of Pest Sciences**, v. 91, p. 849-859, 2018.