

Dinâmica da degradação de dsRNA puro e encapsulado aplicado no solo

Márcio Leandro da Silveira Fonseca¹ e Eduardo Chumbinho de Andrade²

¹Estudante de Bacharelado em Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bolsista da Fapesb, Cruz das Almas, BA; ²Engenheiro-agrônomo, doutor em fitopatologia, pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

Introdução

RNA interferente (RNAi) é um mecanismo natural que ocorre em organismos eucariotos, exercendo um importante papel na regulação da expressão gênica, e na defesa celular contra ácidos nucleicos invasores, como transposons e vírus. O processo é ativado pela presença de moléculas de RNA de fita dupla (double stranded RNA ou dsRNAs), ocasionando a degradação de RNAs homólogos ao dsRNA ativador. O uso de RNAi tem se destacado por seu potencial no desenvolvimento de produtos para controle de pragas, por apresentarem grande especificidade ao alvo, e baixo impacto potencial sobre o ambiente. Neste contexto, é importante gerar informações sobre a dinâmica do dsRNA no ambiente agrícola para tomada de decisões regulatórias futuras sobre seu uso.

Objetivo

Analisar a dinâmica de degradação de dsRNAs aplicados no solo na sua forma pura, complexado a hidróxidos duplo lamelar (HDL) ou dentro de nanopartícula de quitosana.

Material e Métodos

Utilizou-se um Latossolo Amarelo Distrocoeso, separado em três amostras de 50 gramas. A complexação do dsRNA com o HDL e o encapsulamento em nanopartículas quitosana (NP) foram realizados seguindo protocolos definidos. Alíquotas de 15 µg de dsRNA puro, dsRNA-HDL e dsRNA-NP foram diluídas em 5 mL de água e aplicadas em cada uma das amostras de solo. O solo foi homogeneizado e alíquotas de 1 g do solo foram transferidas para tubos de 15 mL cobertos com papel alumínio para simular a baixa luminosidade da rizosfera. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente e a presença do dsRNA no solo foi avaliada ao longo do tempo em 20 diferentes intervalos até 60 dias de incubação. Para cada período de incubação havia dois tubos por tratamento (dsRNA, dsRNA-HDL e dsRNA-NP). Após cada período determinado foi realizada a extração do dsRNA. Para isso, o solo (1 g) foi ressuscitado em 10 mL de tampão PBST pH 7,0 e, em seguida, a solução foi filtrada com auxílio de seringas e filtros de 0,22 µm. O RNA total foi extraído das amostras filtradas utilizando Trizol®, tratado com DNase, quantificado no espectrofotômetro NANOVUE, e a concentração de todas as amostras foi padronizada para 50 ng µL⁻¹. A presença do dsRNA nas amostras de solo foi verificada por meio da técnica de PCR em tempo real (qPCR), utilizando o kit PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix. Como controle negativo foi utilizado o RNA total extraído do solo antes da aplicação do dsRNA, e como controle positivo, foi o dsRNA. Foram consideradas positivas as amostras cujo valor do Ct (Cycle threshold) fosse menor que 38. O período máximo de permanência do dsRNA no solo foi definido como aquele que o dsRNA fosse detectado nos dois tubos do tratamento.

Resultados

Analizando os valores do Ct e utilizando os critérios definidos para determinação da presença do dsRNA, foi possível observar que a complexação do dsRNA em HDL permitiu maior permanência no solo, enquanto que o encapsulamento em quitosana (dsRNA-NP) não alterou o tempo de permanência do dsRNA no solo. O dsRNA puro foi detectado até 312 horas após sua aplicação no solo, com Ct médio de 35,97. O dsRNA-HDL foi detectado até 336 horas após sua aplicação no solo, com Ct médio de 34,66. O dsRNA-NP apresentou o limite de detecção de 312 horas com o valor do Ct em 37,90. A análise comparativa dos valores de Ct entre os tratamentos permite inferir que a quantidade de dsRNA no solo é maior no tratamento com HDL em comparação com o dsRNA puro, que por sua vez é maior que no tratamento com quitosana. Esta análise indica que além de possibilitar maior sobrevivência do dsRNA no solo, a complexação com HDL possibilita maior acúmulo, o que pode ser interessante para o desenvolvimento de produtos contendo dsRNA para aplicação via solo.

Conclusão

O dsRNA puro é degradado no solo em até 312 horas, e a complexação do dsRNA em HDL fornece uma proteção, promovendo aumento da permanência no solo.

Significado e impacto do trabalho

O desenvolvimento de novos produtos contendo dsRNA para o controle de pragas é promissor pela alta especificidade e menor impacto ambiental. Gerar informações sobre seu comportamento no solo é necessário para demonstrar a segurança ambiental destes produtos.