

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

ISSN 3085-9514

***Eventos Técnicos
& Científicos***



Junho, 2026

**Resumos expandidos
21ª Jornada Acadêmica
da Embrapa Soja**

30 de junho e 1º de julho de 2026
Londrina, PR

Embrapa Soja
Londrina, PR
2026

Embrapa Soja

Rod. Carlos João Strass, s/n
Acesso Orlando Amaral, Caixa postal
4006, CEP 86085-981, Distrito de
Warta, Londrina, PR
(43) 3371 6000
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente

Roberta Aparecida Carnevali

Secretária-executiva

*Regina Maria Villas Bôas
de Campos Leite*

Membros

*Adonis Moreira, Clara Beatriz
Hoffmann-Campo, Claudine Dinali
Santos Seixas, Claudio Guilherme
Portela de Carvalho, Fernando
Augusto Henning, Leandro Eugênio
Cardamone Diniz, Liliane Márcia
Mertz-Henning, Maria Cristina Neves
de Oliveira*

Organização da publicação

*Regina Maria Villas Bôas
de Campos Leite
Liliane Márcia Mertz-Henning
Kelly Catharin*

Normalização

Valéria de Fátima Cardoso

Capa

Vanessa Fuzinatto Dall'Agnol

Diagramação

*Vanessa Fuzinatto Dall'Agnol e
Marisa Yuri Horikawa*

Publicação digital: PDF

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

Jornada Acadêmica da Embrapa Soja (21. : 2026: Londrina, PR).

Resumos expandidos [da] XXI Jornada Acadêmica da Embrapa Soja, Londrina,
PR, 30 de junho e 1 de julho de 2026 – Londrina : Embrapa Soja, 2026.

PDF (157 p.) - (Eventos técnicos & científicos / Embrapa Soja, ISSN 3085-9514; 8)

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

CDD (21. ed.) 630.2515

Otimizações dos métodos de produção e extração de dsRNA em *Escherichia coli* HT115 (DE3)

Giovana Zanella Gusmão⁽¹⁾, Juliana da Rosa⁽²⁾, Leonardo Adabo Cintra⁽³⁾, Júlia Sebben⁽⁴⁾, Alexandre Lima Nepomuceno⁽⁵⁾, Liliâne Márcia Mertz-Henning⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Estudante de Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Bolsista da Fundação de Apoio à Pesquisa e ao Desenvolvimento (FAPED), Londrina, PR. ⁽²⁾ Bióloga, doutora, bolsista da Fundação de Apoio à Pesquisa e ao Desenvolvimento (FAPED), Londrina, PR. ⁽³⁾ Biólogo, doutor, bolsista da Fundação de Apoio à Pesquisa e ao Desenvolvimento (FAPED), Londrina, PR. ⁽⁴⁾ Bióloga, mestre, bolsista da Fundação de Apoio à Pesquisa e ao Desenvolvimento (FAPED), Londrina, PR. ⁽⁵⁾ Engenheiro-agrônomo, doutor, pesquisador da Embrapa Soja, Londrina, PR.

Introdução

O controle de plantas daninhas, insetos-praga e patógenos enfrenta desafios crescentes, incluindo a evolução de resistência aos métodos convencionais de manejo, além de preocupações com contaminação ambiental e de efeitos sobre organismos não alvo. Nesse contexto, o uso de tecnologias de controle alvo-específicas, eficientes e ambientalmente sustentáveis têm recebido crescente atenção. Entre essas abordagens destaca-se o RNA de interferência (RNAi), uma ferramenta baseada em silenciamento gênico pós-transcricional que apresenta potencial para o desenvolvimento de princípios ativos seletivos e amigáveis ao meio ambiente (He et al., 2022; Li et al., 2026).

RNAi é um sistema de defesa presente em células eucariontes descoberto por Fire et al. (1998). Esse mecanismo é desencadeado pela entrada de moléculas de *double-stranded RNA* (dsRNA) no citoplasma da célula. Uma vez dentro do citoplasma das células os dsRNAs são clivados por uma Ribonuclease III ou Dicer, em pequenos siRNAs de 21 a 24 pb. Esses siRNAs são incorporados a um complexo enzimático, *RNA induced silencing complexes* (RISC), que utiliza uma das fitas do siRNA como guia para clivar os mRNAs complementares degradando-os (Dalakouras et al., 2020).

Um dos gargalos no desenvolvimento de pesticidas baseados em RNAi é a produção em quantidade e qualidade das moléculas de dsRNA. A produção da molécula pode ser realizada utilizando transcri-

ção *in vitro* por meio de kits comerciais ou *in vivo* utilizando bactérias ou leveduras em fermentações líquidas (Voloudakis et al., 2015). O processo de extração e purificação da molécula também representa uma etapa crítica que limita sua aplicação em larga escala (Nwokeoji et al., 2019). Nesse contexto, a otimização das etapas de *downstream processing* é considerada um dos principais desafios para a consolidação do uso do dsRNA em aplicações agrícolas (Ahn et al., 2019).

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo otimizar o meio de cultivo de *Escherichia coli* HT115 (DE3) e avaliar a eficiência de recuperação de dsRNA utilizando os métodos de extração fenólica e extração etanólica, visando identificar alternativas mais eficientes e economicamente viáveis para aplicações em RNAi.

Material e Métodos

Vetor, sequências e bactérias

Os ensaios de produção de dsRNA foram realizados utilizando o vetor de expressão pCloneEZ, que possui dois promotores T7 flanqueando a região de Múltiplos Sítios de Clonagem (MSC) e dois terminadores T7 posicionados após cada promotor. Sequências dos genes *phytoene desaturase* (*PDS*) e *5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase* (*EPSPS*) de *Digitaria insularis* (capim-amargoso) foram inseridas no vetor por clonagem molecular utilizando enzimas de restrição (*BsmBI*) para a produção dos respectivos dsRNAs. Os vetores recombinantes foram posteriormente inseridos na bactéria *E. coli* HT115 via choque térmico.

Produção das moléculas de dsRNA

Para os ensaios de otimização da produção de dsRNA foram testados dois meios de cultura: Luria-Bertani (LB) e Terrific Broth (TB). Foram produzidos pré-inóculos em 5 mL de meio LB líquido com os antibióticos tetraciclina (12,5 µg/mL) e ampicilina (100 µg/mL) e incubação por 16 h a 37°C sob agitação de 180 rpm.

Para a produção de dsRNA foram inoculados 5 mL de cada pré-inóculo em 100 mL de meio LB ou TB para os ensaios de otimização de meios para produção de dsRNA. Ao atingir a OD₆₀₀ nm de 0,4 iniciou-se a indução da expressão por adição do indutor Lactose a 16mM. Após o início da indução os frascos foram alimentados com meio

contendo lactose e antibióticos por duas vezes com 1h de intervalo, e mantidos por 4 h nas mesmas condições supracitadas. Em seguida, a suspensão bacteriana foi coletada por centrifugação a 4000 xg por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet de bactérias foi mantido em freezer -80°C até o momento da extração.

Extração e purificação das amostras

Foram avaliados dois métodos de extração de dsRNA: Trizol e etanol. No método com Trizol, os *pellets* bacterianos foram ressuspensos em SDS 0,1% em PBS 1X, submetidos a aquecimento a 100°C por 2 min e incubados com Trizol. Após adição de clorofórmio e centrifugação, o sobrenadante foi precipitado com isopropanol. O *pellet* obtido foi lavado duas vezes com etanol 75%, seco e ressuspensionado em água livre de nucleases.

No método de extração por etanol, os *pellets* bacterianos foram ressuspensos em etanol 70% contendo PBS 1X, incubados a 4°C e centrifugados. O pellet foi então ressuspensionado em NaCl 150 mM, incubado a 4°C por 3 h e novamente centrifugado. O sobrenadante foi precipitado com isopropanol, seguido de lavagem com etanol 70%, secagem e ressuspensão em água livre de nucleases.

Após a extração, as amostras de ambas extrações foram tratadas com TURBO™ DNase (Ambion) e RNase A (Invitrogen) para remoção de DNA e RNA fita simples, conforme descrito por Ahn et al. (2019). Em seguida, os dsRNAs foram purificados com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), precipitados com NH_4OAc e isopropanol, lavados duas vezes com etanol 70%, secos e ressuspensionados em água livre de nucleases.

Análise da produtividade e da qualidade do dsRNA

A análise de produtividade foi determinada por uma razão entre a quantidade de dsRNA produzido em μg pelo volume total de fermentação bacteriana utilizada no processo de extração. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop e sua qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%.

Análise estatística

Os dados de produtividade de dsRNA dos meios de cultivo testados e dos métodos de extração foram analisados utilizando o teste t de

Student. Os métodos de extração (Trizol vs. Etanol) foram comparados de forma independente para cada alvo gênico (PDS e EPSPS). As análises foram conduzidas adotando-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

A produção de dsRNAs com qualidade adequada é um dos primeiros passos para a consolidação da tecnologia de RNAi para produção de biopesticidas (Ahn et al., 2019). A otimização da produção de dsRNA envolve tanto o incremento da biomassa celular durante a fase de fermentação quanto a escolha de um método de extração que garanta a integridade e a máxima recuperação das moléculas de dsRNA.

O meio de cultura é um dos pontos cruciais para o aumento da produtividade de dsRNA por bactérias *E. coli* HT115 (Papic et al., 2018). Nesse estudo foram testados os meios de cultura LB e TB. Utilizando TB a produtividade de dsRNA do gene *PDS* foi de 20,8 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, enquanto que a produtividade do meio LB foi de 3,4 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, sob as mesmas condições de cultivo e método de extração (Figura 1A). Esse incremento representa um rendimento aproximadamente seis vezes maior no meio TB. A produtividade de dsRNA está relacionada ao crescimento bacteriano, desse modo meios mais nutritivos podem fornecer condições favoráveis para o crescimento bacteriano e consequentemente maior produção de dsRNA (Papic et al., 2018). Essa diferença drástica na produtividade pode ser atribuída à composição nutricional de ambos os meios. O meio LB contém uma quantidade reduzida de nutrientes quando comparado ao meio TB, o que leva à saturação do crescimento celular devido à rápida elevação do pH e esgotamento dos nutrientes. O meio TB, ao contrário, contém maior concentração de peptona e extrato de levedura, além de glicerol como fonte de carbono de transição mais lenta, além de um sistema tampão fosfato (Thammasorn et al., 2015).

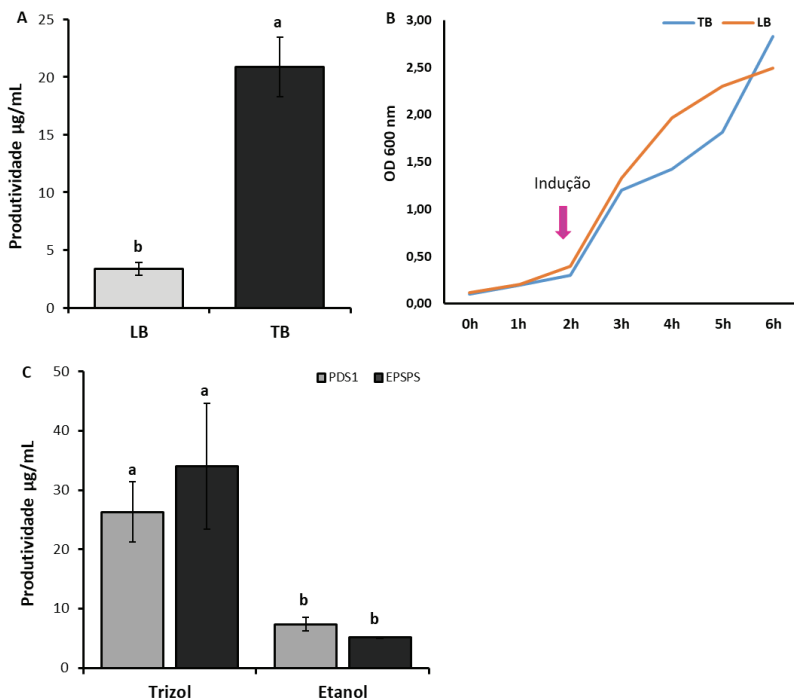


Figura 1. Otimização da produção de dsRNA (µg/mL) em bactérias *E. coli* HT115 (DE3) frente a diferentes meios de cultura e métodos de extração. (A) Rendimento de dsRNA em função do meio de cultura utilizado: Luria-Bertani (LB) e Terrific Broth (TB). (B) Perfil de crescimento de *E. coli* HT115 ao longo de 6 horas nos meios LB e TB. (C) Eficiência da extração de dsRNA para os alvos PDS e EPSPS comparando os protocolos de extração com Trizol e Etanol. As barras representam a média e as barras de erro indicam o erro-padrão da média ($n = 3$). Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

O perfil de crescimento de *E. coli* HT115 (DE3) nos meios TB e LB é demonstrado na Figura 1B. Após a indução da expressão após o atingimento da OD_{600nm} de 0,4 com o meio LB, apresentou crescimento até a 4^a hora de indução onde iniciou uma desaceleração de crescimento atingindo um platô característico do esgotamento de nutrientes e início da fase estacionária. Enquanto que a fermentação utilizando meio TB ainda exibe um crescimento exponencial na 4^a hora de indução, atingindo valores superiores de densidade óptica e consequentemente maior número de células. O aporte nutricional

estendido fornecido pelo meio TB permite que a cepa *E. coli* HT115 atinja altas densidades celulares, sem sofrer com a acidificação precoce do meio de cultivo (Thammasorn et al., 2015).

Em relação à etapa de extração do dsRNA, o método de extração com TRIzol apresentou um rendimento superior à extração por etanol (Figura 1C). Para o dsRNA PDS, a extração com TRIzol alcançou a produtividade de 26,34 µg/mL, enquanto que a extração por etanol recuperou 7,40 µg/mL. Dados semelhantes foram observados na extração do dsRNA EPSPS, onde a extração por TRIzol alcançou a produtividade de 34,04 µg/mL enquanto que a por Etanol 5,14 µg/mL. Esses dados indicam que a extração com TRIzol foi mais eficiente na recuperação das moléculas de dsRNA. Apesar do baixo rendimento, comparado a extração por TRIzol, dados da literatura mostram que o protocolo de extração por etanol desenvolvido neste trabalho mostrou-se superior aos descritos na literatura. Posiri et al. (2013), por exemplo, reportaram uma produtividade média de aproximadamente 0,15 µg/mL via extração etanólica. Desse modo, as otimizações do protocolo de extração por etanol implementadas neste trabalho permitiram um incremento na eficiência desse método de baixo custo.

A análise de viabilidade econômica dos dois métodos demonstrou que o custo de produção de dsRNA pela extração por etanol é de R\$ 22,43/mg de dsRNA, enquanto que o protocolo por TRIzol é de R\$34,77/mg. Apesar da extração utilizando TRIzol ser cerca de 1,6 vezes mais cara, compensa financeiramente a adoção desse método devido ao ganho expressivo em produtividade (30,0 µg/mL). Para aplicações spray de dsRNA que exigem concentrações altas do ativo, a extração por etanol torna-se inviável, devido ao baixo rendimento, tornando a extração por TRIzol uma opção mais adequada para escala laboratorial (Cintra et al., 2025). Apesar disso, novas otimizações no protocolo podem aumentar o rendimento e tornar a extração por etanol viável.

Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a escolha do meio de cultura e do método de extração são fatores determinantes para a produtividade e a qualidade do dsRNA produzido em *E. coli* HT115. O meio TB mostrou-se significativamente superior ao meio

LB, proporcionando rendimento, aproximadamente, seis vezes maior na produção de dsRNA. Com relação aos métodos de extração, o protocolo de extração por TRIzol apresenta maior rendimento que o protocolo de extração por etanol, e apesar de ser mais custoso ainda é a melhor opção para utilização em bioensaios em escala laboratorial. Em conjunto, os dados obtidos contribuem para o avanço do desenvolvimento de um protocolo de produção de dsRNA mais eficiente e economicamente viável, representando um passo importante para a consolidação do uso do RNAi como ferramenta em aplicações agrícolas.

Referências

- AHN, S.-J.; DONAHUE, K.; KOH, Y.; MARTIN, R. R.; CHOI, M.-Y. Microbial-based double-stranded RNA production to develop cost-effective RNA interference application for insect pest management. **International Journal of Insect Science**, v. 11, p. 1-8, 2019. DOI: 10.1177/1179543319840323.
- CINTRA, L. A.; ROSA, J. da; ASSIS, R. de; MARIN, S. R. R.; ADEGAS, F. S.; RECH, E. L.; NEPOMUCENO, A. L.; MERTZ-HENNING, L. M. RNAi spray-induced gene silencing of EPSPS by topical application of dsRNA in the weed *Digitaria insularis*. **Frontiers in Plant Science**, v. 16, 1688755, 2025. 10 p. DOI: 10.3389/fpls.2025.1688755.
- DALAKOURAS, A.; WASSENEGGER, M.; DADAMI, E.; GANOPOULOS, I.; PAPPAS, M. L.; PAPADOPOULOU, K. Genetically modified organism-free RNA interference: Exogenous application of RNA molecules in plants. **Plant Physiology**, v. 182, n. 1, p. 38-50, 2020. DOI: 10.1104/pp.19.00570.
- FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998. DOI: 10.1038/35888.
- HE, L.; HUANG, Y.; TANG, X. RNAi-based pest control: Production, application and the fate of dsRNA. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 1080576, 2022. DOI: 10.3389/fbioe.2022.1080576.
- LI, X.; LU, H.; ZHAO, C.; TANG, Q. Spray-applied RNA interference biopesticides: mechanisms, technological advances, and challenges toward sustainable pest management. **Horticulturae**, v. 12, n. 2, 137, 2026. DOI: 10.3390/horticulturae12020137.

NWOKEOJI, A. O.; KUMAR, S.; KILBY, P. M.; PORTWOOD, D. E.; HOBBS, J. K.; DICKMAN, M. J. Analysis of long dsRNA produced in vitro and in vivo using atomic force microscopy in conjunction with ion-pair reverse-phase HPLC. **Analyst**, v. 144, n. 16, p. 4985-4994, 2019. DOI: 10.1039/c9an00954j.

PAPIĆ, L.; RIVAS, J.; TOLEDO, S.; ROMERO, J. Double-stranded RNA production and the kinetics of recombinant *Escherichia coli* HT115 in fed-batch culture. **Biotechnology Reports**, v. 20, e00292, 2018. DOI: 10.1016/j.btre.2018.e00292.

POSIRI, P.; ONGVARRASOPONE, C.; PANYIM, S. A simple and eco-friendly method for large-scale production of double-stranded RNA in *Escherichia coli*. **Journal of Virological Methods**, v. 193, n. 2, p. 438-444, 2013. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.04.011.

THAMMASORN, T.; SRIBENJARAT, P.; SANEVAS, N.; KIRDMANEE, C.; PROMMEENATE, P. High-yield production of double-stranded RNA in *Escherichia coli* using a nutrient-rich medium and an optimized induction strategy. **Biotechnology Progress**, v. 31, n. 4, p. 912-920, 2015. DOI: 10.1002/btpr.2114.

VOLOUDAKIS, A. E.; HOLEVA, M. C.; PETER SARIN, L.; BAMFORD, D. H.; VARGAS, M.; PORANEN, M. M.; TENLLADO, F. Efficient double-stranded RNA production methods for utilization in plant virus control. **Methods in Molecular Biology**, v. 1236, p. 255-274, 2015. DOI: 10.1007/978-1-4939-1743-3_19.