

Comportamento de dsRNA GFP em Plantas de Milho Visando Controle de Pragas pela tecnologia do RNAi

Raquel Oliveira Moreira⁽¹⁾; Paloma Alessandra Alves⁽²⁾; Beatriz de Almeida Barros⁽³⁾; Eduardo de Andrade Chumbinho⁽⁴⁾; Fernando Hercos Valicente⁽⁵⁾; Andréa Almeida Carneiro⁽⁵⁾; Newton Portilho Carneiro⁽⁵⁾.

⁽¹⁾ Estudante do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Sete Lagoas – UNIFEMM, Sete Lagoas, Minas Gerais; raqueloliveiramoreira@ymail.com; ⁽²⁾ Estudante do Curso de Biotecnologia da Faculdade Ciências da Vida; ⁽³⁾ Analista da Embrapa Milho e Sorgo; ⁽⁴⁾ Pesquisador da Embrapa LABEX-USA, USDA-ARS, EUA; ⁽⁵⁾ Pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo.

RESUMO: A infestação de insetos pragas pode causar grandes perdas de produção em cultivares agrícola. Portanto, é essencial a identificação de tecnologias alternativas de manejo, que irão controlar as perdas de produção causadas pelo ataque de pragas. Uma delas é o uso da tecnologia do RNA interferência (RNAi). O objetivo desse trabalho foi estudar a estabilidade em solução e a mobilidade de moléculas de dsRNA em plântulas de milho. Para avaliar a estabilidade do dsRNA em solução foram testados água ultrapura, meio MS e solução nutritiva de Magnavaca, contendo dsRNA em três concentrações 6, 1,2 e 0,6 ng/uL. Coletas foram realizadas 0, 1, 3, 6 e 24h após o preparo de cada solução. O volume coletado foi utilizado para síntese de cDNA e a detecção dos fragmentos referentes ao dsRNA foi feita por meio de RT-PCR. Para verificar a mobilidade do dsRNA, plântulas de milho foram colocadas em contato com essas moléculas e, durante um período de 8 horas após a exposição, foram realizadas cinco coletas (0, 2, 4, 6 e 8h) das partes distais das folhas. A detecção do dsRNA foi feita utilizando PCR em tempo real. As moléculas de dsRNAs se apresentaram estáveis em todas as condições, mas a solução nutritiva de Magnavaca forneceu melhores resultados. Plântulas absorveram rapidamente moléculas de dsRNA e sua detecção aumentou gradualmente atingindo um nível máximo após 6 h de contato com a solução contendo dsRNAs. Nesse sentido, novos experimentos devem ser conduzidos para a determinação da durabilidade dessas moléculas em organismos vegetais.

Termos de indexação: *Zea mays*, RNA interferência, GFP.

INTRODUÇÃO

A infestação de insetos pragas pode causar grandes perdas de produção nas culturas. Muitas tecnologias já foram desenvolvidas para combater esses insetos que vão desde a prática do controle biológico e inseticidas químicos até a produção de plantas GM (geneticamente modificadas). Nas últimas décadas, foram desenvolvidas plantas

transgênicas expressando os genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Essas bactérias gram-positivas, encontradas no solo, produzem proteínas tóxicas (Cry) que quando ingeridas pelo inseto, são convertidas para a sua forma tóxica (endotoxina delta), provocando perturbações no intestino do inseto, causando a morte do mesmo. Apesar do isolamento de um grande número de genes *cry* e a potencialidade de se utilizar várias combinações por meio de piramidização, as indústrias do setor agrícola não foram capazes de sobressair-se diante o aparecimento de indivíduos resistentes dentro das populações de insetos pragas. Portanto, torna-se urgente a identificação de tecnologias alternativas que irão controlar o inseto Bt- resistente.

RNA de interferência (RNAi) é um processo biológico que ocorre em todas as células eucarióticas e permite o silenciamento de genes a nível pós-transcricional, reduzindo a atividade de genes específicos. Utilizando essa tecnologia, tem sido possível verificar a regulação negativa da expressão de genes do inseto quando RNAs de dupla fita (dsRNA) específicos são adicionados em sua dieta. Vê-se, portanto, a potencialidade da utilização desses fragmentos como biopesticidas através de pulverização nos tecidos vegetais ou pela obtenção de plantas transgênicas capazes de expressá-los constitutivamente. Nesse sentido, torna-se de grande importância o estudo do comportamento dessas moléculas no solo, na planta e principalmente no inseto, a fim de viabilizar esse processo comercialmente.

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a estabilidade em solução e a mobilidade de moléculas de dsRNA em plântulas de milho.

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, moléculas de dsRNA referentes ao GFP foram gentilmente cedidas pelo Dr. Eduardo de Andrade Chumbinho (Embrapa LABEX-USA, USDA-ARS, EUA). O fragmento GFP (**Figura 1A**), foi amplificado utilizando primers contendo o fragmento referente ao promotor T7 na extremidade 5' (**Figura 1B**) e clonado no vetor pGEM para a produção do dsRNA. Para a síntese de dsRNA GFP utilizou-se o

kit T7 Megascript (Ambion) conforme instruções do fabricante.

(A)

```
1 taatacgaactcactatagggcgaAGGTAATGGTGTCTGGTAAAAGGACAGGGCCATCGC
61 CAATTGGAGTATTTTGTGATAATGATCAGCGAGTTGCACGCCCGCTCTTCGATGTTGT
121 GCGGGTCTTGAAGTTGGCTTTGATGCCGTTCTTTTGTCTGTCGGCCATGATGATACGT
181 TGIGGGAGTTGATGTTGATTTCCAACCTTGTGGCCGAGGATGTTCCGTCCTCCTTGAAT
241 CGATTCCCTTAAGCTCGATCCTGTTGACGAGGGTGTCTCCCTCTAACTTGACCTCAGCAC
301 GTGTCTTGTAGTTCCCGTCGTCCTTGAAGAAGATGGTCTCTCCTGCAGTATCCCTCAG
361 GCATGGCGCTCTTGAAGAAGTGGTCCCGCTTCATATGATCTGGGTATCTTGAAAACATT
421 GAACACCATAAGAGAAAGTAGTGCAAAGTGTGGCTcgccctatagtgagtcgtattaaa
481 t
```

(B)

GFP T7F: 5'tGCCAACACTTGTCACTACTTTCTCTT 3'

GFP T7R: 5'taatacgaactcactatagggcgaAGGTAATGGTGTCTGGTAAAAGGAC 3'

Figura 1. Sequência GFP **(A)** e os primers promotores T7 GFP nas extremidades **(B)**.

Após a síntese, a qualidade do dsRNA GFP foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience) em diluição de 1:1000 na amostra. A concentração do dsRNA GFP foi determinada no Espectrofotômetro Nanodrop modelo 1000 UV-VIS.

Os experimentos para avaliar a mobilidade do dsRNA em plantas de milho são montados de forma que as plântulas sejam colocadas em contato com uma solução contendo dsRNA, que deve permanecer estável durante todo o experimento. Para a montagem desse experimento, foram testadas água ultrapura, meio Murashigue-Skoog (MS) líquido e solução de Magnavaca (Magnavaca et al., 1987) contendo dsRNA em três concentrações 6, 1,2 e 0,6 ng/uL. As soluções foram mantidas a temperatura ambiente e 10,0 uL foram coletados em 0, 1, 3, 6 e 24h após o preparo de cada solução. O volume coletado foi utilizado para síntese de cDNA utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) seguindo as recomendações do fabricante. A RT PCR foi preparada em um volume final de 20µl, utilizando 3µl do cDNA (diluído 1:10), 2,5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM KCl; 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen), 0,125 mM dNTPs e 0,0125 pmols de cada iniciador (F: 5' - TCAAGGAGGACGGAAACATC - 3' e R: 5' - GGTCTCTCCTGCACGTATC - 3'). Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 20 s, 55°C por 20 s e 72°C por 20 s, seguido por uma alongação final de 72°C por 5 min. Os resultados finais foram avaliados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,0%.

Para avaliar a mobilidade do dsRNA foram utilizadas plântulas pertencentes à linhagem de milho L3, no 8º dia de germinação, imergindo-se a planta com seu sistema radicular em um recipiente contendo solução Magnavaca e dsRNA GFP (0,6 ng/uL) **(Figura 2)**.

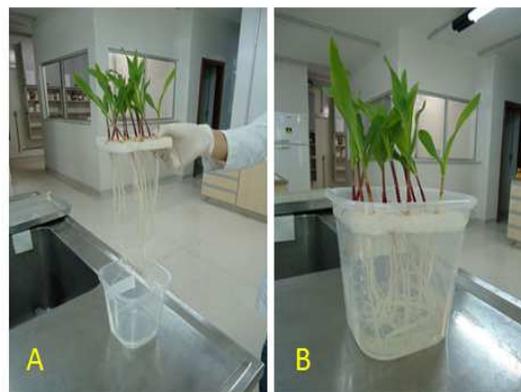


Figura 2. Aparato para avaliação da mobilidade do dsRNA GFP em plântulas de milho.

Durante um período de 8 horas após a exposição das plântulas ao dsRNA, foram realizadas cinco coletas (0, 2, 4, 6 e 8h) das partes distais das folhas das plântulas para serem utilizadas na extração de RNA. Foram coletadas três repetições biológicas por tratamento.

O RNA foi extraído utilizando o RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) e o cDNA foi sintetizado a partir de 1,0 ug de RNA total conforme descrito anteriormente.

A detecção do dsRNA GFP foi analisada por PCR em tempo real utilizando Fast SYBR® Green Master Mix 2x (Applied Biosystems) e os primers específicos para GFP, denominados F4 (5' - CGATGGCCCTGTCCTTTTAC - 3') e R4 (5' - TTTTCGTTGGGATCTTTTCGAA - 3'). As reações foram realizadas em triplicatas no equipamento Real-Time PCR System 7500 (Life Technologies).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do dsRNA GFP por espectrofotometria e por eletroforese indicou que a amostra sintetizada apresenta qualidade e concentração satisfatória para a realização dos experimentos **(Figura 3)**.

Por meio da RT-PCR foi possível verificar que as moléculas de dsRNA permaneceram estáveis, já que o amplicon esperado (~400 pb) foi observado sob todas as condições (solução e concentração de dsRNA) testadas **(Figura 4)**. No entanto, baseando-se na intensidade de banda obtida, foi estabelecido que a solução nutritiva de Magnavaca apresenta melhor resultado **(Figura 4)**, sendo, então, a solução mais apropriada para a realização do experimento seguinte.

MM



CONCLUSÕES

Foi possível sintetizar moléculas de dsRNA de boa qualidade a partir de fragmento de DNA-GFP clonado com primers específicos do genes alinhados com sequências do promotor T7.

As moléculas de dsRNAs se apresentaram estáveis em temperatura ambiente nas três soluções testadas (água ultrapura, meio murashigue-skoog (ms) líquido e solução de magnavaca), mas a solução nutritiva de Magnavaca forneceu melhores resultados.

Plântulas absorveram rapidamente moléculas de dsRNA e sua a detecção aumentou gradualmente atingindo um nível máximo após 6 h de contato com a solução contendo dsRNAs. A detecção por RT-PCR e PCR real time tem pontos ainda a serem explorados já que as moléculas de dsRNA podem sofrer quebra pelo sistema DICER logo que entra no sistema celular. Assume-se que a detecção de moléculas de dsRNA na região distal da folha seja devido a movimentação dessas moléculas pelo xilema.

Novos experimentos devem ser conduzidos para a determinação da durabilidade dessas moléculas em organismos vegetais já que essas moléculas foram detectadas após 24 horas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG e CNPq que promovem atividades de fomento, apoio e incentivo a pesquisas científicas e tecnológicas em Minas Gerais, possibilitando a realização do estudo por meio do fornecimento de auxílio financeiro, e à Embrapa Milho e Sorgo pela concessão de bolsa de estudo durante o período de realização do trabalho.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, N.; DASARADHI, P. V.; MOHMED A.; MALHOTRA, P.; BHATNAGAR, R. K.; MUKHERJEE, S. K. RNA interference: biology, mechanism, and applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New Delhi, v. 67, n. 4, p. 657-685, 2003.

AUER, C.; FREDERICK, R. Crop improvement using small RNAs: applications and predictive ecological risk assessments. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 27, n. 11, p. 644-651, 2009.

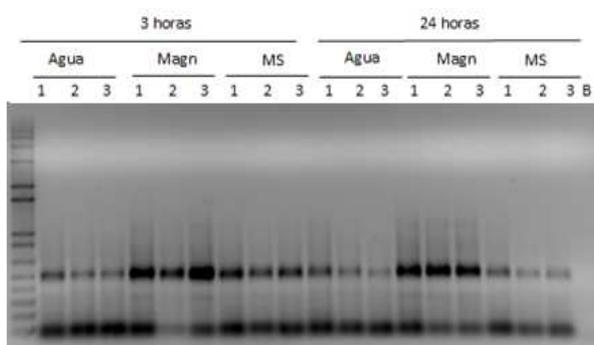


Figura 4. RT-PCR para análise da estabilidade de moléculas de dsRNA em diferentes meios. B = branco. Concentrações de dsRNA foram 6 ng/uL (1), 1,2 ng/uL (2) e 0,6 ng/uL (3).

Pela análise de PCR em tempo real pode-se observar que as plântulas rapidamente absorveram a molécula de dsRNA e que a detecção aumentou gradualmente atingindo um nível máximo após 6 h de contato com a solução (**Figura 5**).

Essa rápida detecção de dsRNA em partes distais das plântulas evidencia uma alta mobilidade dessas moléculas, mas novos experimentos serão agora montados para determinação do tempo durante o qual essas moléculas ficam estáveis e passíveis de detecção dentro das plântulas analisadas.

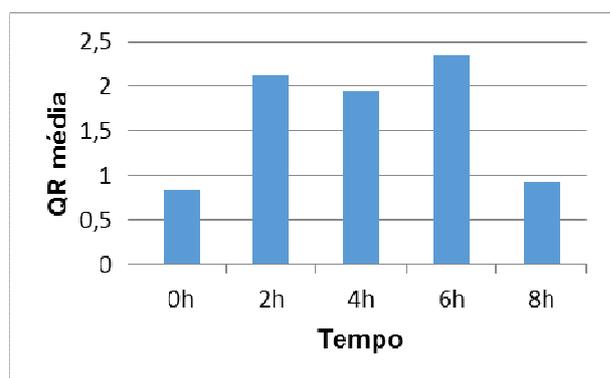


Figura 5. Níveis de detecção de dsRNA em plântulas de milho. QR = quantificação relativa média das três repetições biológicas.

- BAUM, J. A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G. R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T.; ROBERTS, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, n. 11, p.1322-1326, 2007.
- CHEN, J.; ZHANG, D.; YAO, Q.; ZHANG, J.; DONG, X.; TIAN, H.; CHEN, J.; ZHANG, W. Feeding-based RNA interference of a trehalose phosphate synthase gene in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. **Insect Molecular Biology**, v. 19, n. 6, p. 777-786, 2010.
- MAGNAVACA, R.; GARDNER, C.O.; CLARK, R. B. Evaluation of inbred maize lines for aluminum tolerance in nutrient solution. In: GABELMAN, H. W.; LOUGHMAN, B. C. (Ed.). **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Kluwer, 1987. p. 255-265.
- ESCOBAR, M. A.; CIVEROLO, E. L.; SUMMERFELT, K. R.; DANDEKAR, A. M.; RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 23, p. 13437-13442, 2001.
- HAMMOND, S. M.; BOETTCHER, S.; CAUDY, A. A.; KOBAYASHI, R.; HANNON, G. J. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. **Science**, Washington, v. 293, n. 5532, p.1146-1150, 2001.
- MAO, Y. B.; CAI, W. J.; WANG, J. W.; HONG, G. J.; TAO, X. Y.; WANG, L. J.; HUANQ, Y. P.; CHEN, X. Y. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, n.11, p.1307-1313, 2007.
- OLIVEIRA, E.; RESENDE, R. O.; GIMÉNEZ PECCI, M. L. P.; LAGUNA, I. G.; HERRERA, P.; CRUZ, I. Incidência de viroses e enfezamentos e estimativa de perdas causadas por mollicutes em milho no Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, n. 1, p. 19-25, jan. 2003.
- TERENIUS, O. et. al. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 2, p. 231-245, 2011.
- THAO, N. P.; CHEN, L.; NAKASHIMA, A.; HARA, S.; UMEMURA, K.; TAKAHASHI, A.; SHIRASU, K.; KAWASAKI, T.; SHIMAMOTO, K. RAR1 and HSP90 Form a Complex with Rac/Rop GTPase and Function in Innate-Immune Responses in Rice. **The Plant Cell**, v. 19, n. 12, p. 4035-4045, 2007.
- TIMMONS, L.; COURT, D. L.; Fire, A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. **Gene**, v. 263, n.1/2, p.103-112, 2001.
- TURNER, C. T.; DAVY, M. W.; MACDIARMID, R. M.; PLUMMER, K. M.; BIRCH, N. P.; NEWCOMB, R. D. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. **Insect Molecular Biology**, v. 15, n. 3, p. 383-391, 2006.
- WANG, Y.; KHEIR, M. M.; CHAI, Y.; HU, J.; XING, D.; LEI, F.; LIJUN, D. Comprehensive study in the inhibitory effect of berberine on gene transcription, including TATA box. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. 1-10, 2011.
- WEI, Q.; LIPARD, I. C.; PATERSON, B. M. Analysis of the 3'(-)-hydroxyl group in *Drosophila* siRNA function. **Methods**, v. 30, n. 4, p. 337-347, 2003.
- WILSON, Z. A.; MORROLL, S. M.; DAWSON, J.; SWARUP, R.; TIGHE, P. J. The Arabidopsis MALE STERILITY1 (MS1) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors. **The Plant Journal**, v. 28, n. 1, p. 27-39, 2001.
- WINSTON, W. M.; MOLODOWITZ, C.; HUNTER, C. P. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. **Science**, Washington, v. 295, n. 5564, p. 2456-2459, 2002.
- WINSTON, W. M.; SUTHERLIN, M.; WRIGHT, A. J.; FEINBERG, E. H.; HUNTER, C. P. *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.104, p. 10565-10570, 2007.
- XIONG, A. S.; YAO, Q. H.; PENG, R. H.; Li X, HAN, P. L.; FAN, H.Q. Different effects on ACC oxidase gene silencing triggered by RNA interference in transgenic tomato. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 639-646, 2005.
- YADAV, B. C.; VELUTHAMBI, K.; SUBRAMANIAM, K. Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.148, n. 2, p. 219-222, 2006.
- ZHAO, Y. Y.; YANG, G.; WANG-PRUSKI, G.; YOU, M. S. *Phyllotreta striolata* (Coleoptera: Chrysomelidae): arginine kinase cloning and RNAi-based pest control. **European Journal of Entomology**, v. 105, p. 815-822, 2008.



XXX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

"Eficiência nas cadeias produtivas e o abastecimento global"