



## Metodologia para extração e detecção de dsRNA em solo

Jonatha dos Santos Silva<sup>1</sup>, Eduardo Chumbinho de Andrade<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Mestrando em Ciências Agrárias pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA; <sup>2</sup> Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

**Introdução:** A tecnologia do RNA interferente (RNAi) tem sido uma das apostas mais promissoras para a proteção de plantas contra pragas. O RNAi é um mecanismo natural que ocorre em células eucarióticas e que está envolvido na regulação gênica e defesa antiviral. O mecanismo é ativado por moléculas de RNA fita dupla (dsRNA), que atuam como um silenciador gênico pelo impedimento da tradução ou pela degradação de RNAs mensageiros (mRNAs), resultando na diminuição da expressão ou supressão total do gene homólogo ao dsRNA. Um dos pontos-chave para o funcionamento da tecnologia é como fazer a molécula de dsRNA adentrar as células do organismo alvo para desencadear o silenciamento gênico. A aplicação de moléculas de dsRNA no solo pode ser uma boa alternativa para culturas irrigadas, uma vez que o dsRNA pode ser absorvido pelas raízes. Entretanto, evidências sugerem que as moléculas de dsRNA aplicadas no solo são rapidamente degradadas, permanecendo no solo por até 72 horas.

**Objetivo:** Estabelecer protocolo de extração e detecção de dsRNA no solo visando avaliar o tempo de permanência desta molécula quando aplicadas em solo.

**Material e Métodos:** Com o auxílio de um tubo galvanizado de 5/8" foi coletada uma amostra de solo na área do BAG de citros do CNPMF, até a profundidade de 20 cm. Após a coleta, a amostra foi encaminhada ao laboratório de virologia, onde foi dividida em duas subamostras: de 0-10 e de 10-20 cm de profundidade. Cada subamostra foi homogeneizada e delas foram retirados 50 g de solo, aos quais foram adicionados 3 mL de uma solução aquosa contendo 7,5 µg de dsRNA homólogo ao gene GFP (dsGFP). Após a adição, a subamostra foi homogeneizada e cerca de 1 grama de solo com dsRNA foi transferido para tubos de 15 mL, os quais foram vedados com papel alumínio a fim de simular a baixa luminosidade da rizosfera, e mantidos à temperatura ambiente. Em cada um dos intervalos pré-estabelecidos (1, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120 e 136 horas) dois tubos eram submetidos à extração do dsRNA do solo. Para isso, ao solo presente no tubo era adicionado 10 mL tampão PBS-T (1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,0, 0,1% Tween 20). Após agitação em vortex, 1,5 mL do sobrenadante foi coletado com o auxílio de uma seringa (5 mL) e passado pelo filtro Chromafil® Xtra PET 25 mm 0,45 µm. Cerca de 100 µL do filtrado foi utilizado para extração de RNA total com o reagente TRIzol®, seguindo o protocolo do fabricante. O RNA total extraído foi submetido à reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR). Para reação qRT-PCR foram utilizados oligonucleotídeos específicos e o kit SYBR Green Master Mix.

**Resultados:** Foi possível extrair e detectar a presença das moléculas de dsRNA em todos os tempos amostrados, indicando que estas moléculas podem se manter estáveis no solo, nas condições experimentais utilizadas, por períodos mais longos que os relatados na literatura científica. Novo experimento foi estabelecido para avaliar a permanência de dsRNA no solo por períodos mais longos.

**Significado e impacto do trabalho:** Esclarecer questões relacionadas à tecnologia do RNA interferente (RNAi) é importante para se compreender melhor aspectos de segurança da tecnologia e possíveis estratégias para seu uso no controle de pragas que afetam a agricultura.