



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



JULIANA DA ROSA

**PRODUÇÃO E ENTREGA DE MOLÉCULAS DE dsRNA
PARA O CONTROLE DE *Digitaria insularis* (CAPIM-
AMARGOSO)**

LONDRINA
2022

JULIANA DA ROSA

**PRODUÇÃO E ENTREGA DE MOLÉCULAS DE dsRNA
PARA O CONTROLE DE *Digitaria insularis* (CAPIM-
AMARGOSO)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutora.

Orientador: Alexandre Lima Nepomuceno
Coorientadora: Silvana Regina Rockenbach
Marin

LONDRINA
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Elaborado por André Luiz Ferreira Vidal - CRB 9/1767

R788p

Rosa, Juliana da.

Produção e entrega de moléculas de dsRNA para o controle de *Digitaria insularis* (capim-amargoso)/ Juliana da Rosa. - Londrina, 2022.
82 f.

Orientador: Alexandre Lima Nepomuceno

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Londrina, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Produção de dsRNA. 2. Escherichia coli HT115 (DE3). 3. RNA de interferência I. Nepomuceno, Alexandre Lima. II. Universidade Estadual de Londrina. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDD 21. ed. – 632.5

JULIANA DA ROSA

**PRODUÇÃO E ENTREGA DE MOLÉCULAS DE dsRNA
PARA O CONTROLE DE *Digitaria insularis* (CAPIM-
AMARGOSO)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

BANCA EXAMINADORA

Alexandre Lima Nepomuceno
EMBRAPA Soja

Fernando Storniolo Adegas
EMBRAPA Soja

Natália Lima de Sousa
EMBRAPA Agroenergia

Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Américo José Carvalho Viana
EMBRAPA Soja

Londrina, 31 de Março de 2022.

*Todos os frutos desse trabalho ao Pai das Misericórdias.
Dedico!*

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, de onde provém todo o meu sustento espiritual e minha força para enfrentar todas as dificuldades ao longo de todos esses anos dedicados à minha formação profissional e intelectual. “À Ele meu louvor, à Ele minha adoração.”

Aos meus pais Lourdes e José, inabalável fortaleza que motiva a ser forte, à vocês todo meu amor e gratidão.

À todos meus familiares, Jovana, Helô, tio João, tia Marlei, tio Luiz que me apoiaram desde muito pequena a estudar, crescer e me desenvolver, meu sincero agradecimento!

De modo especial quero agradecer à minha avó Nely ou “Dona Nerita” (*in memorian*) que nos ensinou sobre cuidado e carinho. Obrigada!

Ao André, meu namorado, amigo e parceiro para todos os momentos, por todo apoio, ajuda e motivação para eu seguir meus sonhos e projetos, à você minha gratidão e meu reconhecimento!

Ao meu orientador Alexandre Nepomuceno, por ter acreditado no meu potencial, por todas as oportunidades e ensinamentos valiosos, muito obrigada!

À minha coorientadora Silvana Rockenbach Marin, gratidão por todos os ensinamentos e apoio na realização desse trabalho!

À Dra. Liliane Henning por todo suporte e oportunidades a mim concedidas, agradeço!

À Embrapa Soja e Laboratório de Biotecnologia Vegetal, e todos que passaram por lá, obrigada por todo aprendizado, por cada café e conversa nos intervalos, cada um de vocês contribuíram para minha formação, obrigada!

Aos meus pazeiros de laboratório que contribuíram para a realização desse trabalho Jéssika, Viviani, Américo, Natália, Roberta. Obrigada!

À equipe de Plantas Daninhas, em especial Ademar, agradeço por todo o suporte no desenvolvimentos dos experimentos com capim-amargoso.

Aos professores da UTFPR Renato Viana e Luis Cabeça, pelo apoio no desenvolvimento de soluções para a entrega do dsRNA. Gratidão!

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, por viabilizar a realização do doutorado.

À Capes, pela concessão da bolsa.

Finalizando, agradeço a todos aqueles que passaram pelo meu caminho e motivaram minha formação profissional, à vocês, minha gratidão! Enfim, ao terminar esses anos de doutorado sou grata à vida, à mim e a tudo e todos que me fizeram ser e estar aqui!

Obrigada!

“As pessoas amam aquilo que os outros fazem com paixão.”

La La Land: Cantando estações

“Descobri que há uma harmonia maravilhosa nas verdades complementares da fé e da ciência. O Deus da Bíblia é também o Deus do genoma. Deus pode ser encontrado na catedral e no laboratório. Investigando a criação incrível e majestosa de Deus, a ciência pode na verdade ser uma forma de louvor”.

Francis Collins

ROSA, J. **Produção e entrega de moléculas de dsRNA para o controle de *Digitaria insularis* (capim-amargoso)**. 2022. 82 p. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

Capim-amargoso é uma planta daninha que causa redução de produtividade e prejuízos econômicos nas lavouras de todo Brasil. Novas tecnologias como RNAi podem contribuir para o atual portfólio de herbicidas. O objetivo desse trabalho foi desenvolver estratégias de produção e entrega de dsRNAs para o silenciamento do gene *Phytoene desaturase (PDS)* via RNAi em capim-amargoso. Para a produção de dsRNAs de boa qualidade e especificidade foram testados dois vetores: L4440 e New-Vector. New-vector se mostrou mais eficiente na produção de dsRNAs com tamanho esperado. Com relação à extração de dsRNAs dois métodos foram testados: Trizol e Etanol. O método trizol garantiu um maior rendimento comparado ao método por Etanol (3,9 µg/mL e 2,5 µg/mL), apesar disso o método de extração por Etanol se mostrou mais eficiente na extração de dsRNAs com tamanho esperado. Utilizando o vetor L4440 o indutor alternativo proporcionou um rendimento maior quando comparado ao New-vector (5,7 µg/mL e 3,5 µg/mL). Entre os métodos de aplicação de dsRNAs em capim-amargoso os mais eficientes foram aplicação por folhas e em pré-emergência. A aplicação em folhas, em 3 e 5 dias após a aplicação, e em pré-emergência, 5 dias após a aplicação, levou a redução da expressão do gene *PDS* em 35%. Ainda, o tratamento que recebeu dsPDS em pré-emergência apresentou uma redução da massa seca em 24%. Já na aplicação em raízes houve redução do número de transcritos 10 dias após a aplicação dos dsRNAs. Os resultados desse trabalho abrem perspectivas para novos estudos e desenvolvimento de produtos baseados em RNAi para controle de plantas daninhas.

Palavras-chave: produção de dsRNA; *Escherichia coli* HT115 (DE3); *Phytoene desaturase*; RNA de interferência; entrega de dsRNA;

ROSA, J. **Production and delivery of dsRNA molecules for the control of *Digitaria insularis* (sourgrass)**. 2022. 82 p. PhD Thesis (Graduate Program in Genetics and Molecular Biology) - State University of Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Sourgrass is a weed which reduce productivity and cause economic losses in crop all over Brazil. New Technologies such as RNAi can contribute to current herbicide portfolio. The goal of this work was develop strategies for production and delivery of dsRNAs for *Phytoene desaturase (PDS)* gene through RNAi in sourgrass. For the dsRNA production with high quality and specificity two vectors were tested: L4440 e New-Vector. New-vector was more efficient in producing dsRNA with expected size. To extract dsRNAs, two methods were tested: Trizol and Ethanol. The trizol method result a higher yield compared to Ethanol metod (3,9 µg/mL e 2,5 µg/mL), although Ethanol extraction method was more efficiency in extracting dsRNA of the expected size. Using the L4440 vector the alternative inductor provided a higher yield compared to New-vector (5,7 µg/mL e 3,5 µg/mL). Among the delivery methods of dsRNAs in sourgrass, the most efficiency were leaf and pré-emergence application. Leaf delivery, 3 and 5 days after application, and pre-emergence delivery 5 days after application resulted in the reduction of PDS gene expression by 35%. In addition, the treatment that received dsPDS in pre-emergence had a 24% reduction in dry mass. In roots delivery, there was a reduction in the number of transcripts 10 days after the application of dsRNAs. The results of this work open perspectives for new studies and development of RNAi-based products for weed control.

Keywords: dsRNA production; *Escherichia coli* HT115 (DE3); *Phytoene Desaturase*; interfering RNA; dsRNA delivery;

LISTA DE TABELAS

3. REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Aplicação de dsRNA e siRNAs exógenos para silenciamento gênico em plantas	24
--	----

4. PRODUÇÃO DE dsRNA EM BACTÉRIA *E. coli* HT115 (DE3)

Tabela 1: <i>Primers</i> utilizados nas clonagens da sequência de <i>PDS</i> nos vetores L4440 e New_Vector	49
--	----

5. SILENCIAMENTO GÊNICO POR APLICAÇÃO TÓPICA DE dsRNA EM CAPIM-AMARGOSO

Tabela 1. <i>Primers</i> para sequenciamento do gene <i>PDS</i> de capim-amargoso e RT-qPCR.....	66
Tabela 2. Sequências de dsRNA utilizadas nos experimentos de aplicação em raiz, folhas e pré-emergência	67
Tabela 3. Germinação e massa seca de capim-amargoso após aplicação de dsRNA em pré-emergência.....	75

LISTA DE FIGURAS

3. REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** Estruturas vegetativas de capim amargoso.....18
- Figura 2.** Mecanismos de silenciamento gênico por RNAi em plantas22
- Figura 3.** Via biossintética dos carotenoides..... 39

4. PRODUÇÃO DE dsRNA EM BACTÉRIA *E. coli* HT115 (DE3)

- Figura 1.** Vetores de expressão e produção de dsRNA em *E. coli* HT115..... 54
- Figura 2.** Gel de agarose após extração de dsRNA a partir da fermentação líquida em sistema HT115/L4440..... 55
- Figura 3.** Rendimento de dsRNA após extração com os métodos de extração utilizando Trizol e Etanol 56
- Figura 4.** Indutores de expressão para produção de dsRNA em *E. coli* HT115 (DE3) 58

5. SILENCIAMENTO GÊNICO POR APLICAÇÃO TÓPICA DE dsRNA EM CAPIM-AMARGOSO

- Figura 1.** Expressão relativa do gene *PDS* após aplicação foliar de dsRNA em capim-amargoso..... 71
- Figura 2.** Fenótipo aos 5 e 10 dias após a aplicação de dsRNA em folhas de capim-amargoso..... 72
- Figura 3.** Expressão relativa do gene *PDS* após aplicação de dsRNA via imersão de raízes de capim-amargoso.....73
- Figura 4.** Expressão relativa do gene *PDS* após aplicação pré-emergente de dsRNA em capim-amargoso75
- Figura 5.** Aplicação de dsRNA em pré-emergência e massa seca de capim-amargoso.....76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RNAi	RNA de interferência
OGM	Organismo Geneticamente Modificado
dsRNA	RNA de fita dupla
RR	<i>Roundup Ready</i>
EPSPS	Enzima 5-enolpiruvatochiquimato-3-fosfatase sintase
ACCase	Acetyl CoA Carboxylase
siRNAs	<i>small-interfering RNA</i>
microRNAs	miRNAs
CHS	<i>Chalcona sintase</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
AGO	Argonauta
DCLs	<i>DICER-Like</i>
PTGS	Silenciamento Gênico Pós-transcricional
RdRP6	RNA polimerase 6
RdDM	Metilação do DNA direcionado por RNA
Pol-V	RNA polimerase IV
<i>PDS</i>	<i>Phytoene desaturase</i>
<i>STM</i>	<i>Shoot meristemless</i>
<i>WER</i>	<i>Werewolf</i>
GUS	<i>Beta-glucuronidase</i>
<i>R2R3-MYB</i>	<i>Myeloblastosis R2R3</i>
<i>GFP</i>	<i>Green fluorescent protein</i>
<i>NPTII</i>	<i>Neomycin phosphotransferase II</i>
<i>CHL-I</i>	<i>Magnesium chelatase subunidade I</i>
<i>CHL-H</i>	<i>Magnesium chelatase subunidade H</i>
<i>GUN4</i>	<i>Genomes uncoupled</i>
LDH	Hidróxidos duplo lamelares
PMMoV	<i>Pepper Mild Mottle Virus</i>
CMV	<i>Cucumber Mosaic Virus</i>
DdRP	RNA polimerase
GGPP	Geranylgeranil pirofosfato
GAs	Giberelinas
MSC	Múltiplos Sítios de Clonagem

PCR	Reação em cadeia da polimerase
(TB)	Terrific broth
ABA	Ácido abscísico
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
CPS	<i>Copalyl diphosphate synthase</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 CAPIM-AMARGOSO	18
3.2 MECANISMO RNAI.....	20
3.3 SILENCIAMENTO GÊNICO VIA RNAI EM PLANTAS	23
3.4 USO DA TECNOLOGIA DE RNAI EM PLANTAS NA AGRICULTURA.....	28
3.4.1 Absorção e Translocação de dsRNAs e siRNAs	28
3.4.2 Sistemas Estabilizantes e Carreadores de dsRNAs	31
3.4.3 Produção de dsRNA ou siRNAs para Aplicação em Larga Escala	34
3.4.4. Riscos e Desafios de Produtos Baseados em RNAi	36
3.4.4.1 <i>Saúde humana</i>	36
3.4.4.1 <i>Efeitos fora do alvo</i>	37
3.5 GENE <i>PHYTOENE DESATURASE (PDS)</i>	38
REFERÊNCIAS.....	40
4. PRODUÇÃO DE dsRNA EM BACTÉRIA <i>E. coli</i> HT115 (DE3)	46
4.1. INTRODUÇÃO	46
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.2.1 Clonagem das Sequências <i>PDS</i>	48
4.2.2 Transformação em Bactérias <i>E. coli</i> HT115 (DE3) via Choque Térmico.....	50
4.2.3 Produção de dsRNA	51
4.2.4 Extração de dsRNA	51
4.2.4.1 <i>Protocolo de Extração de dsRNA por Trizol</i>	51
4.2.4.2 <i>Protocolo de Extração Alcoólica de dsRNA</i>	52
4.2.5 Tratamento com DNase e RNase.....	52
4.2.6 Purificação de dsRNA ou Segunda Extração	52
4.2.7 Análise Estatística.....	53
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53

4.4 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
5. SILENCIAMENTO GÊNICO POR APLICAÇÃO TÓPICA DE dsRNA EM CAPIM-AMARGOSO.....	63
5.1 INTRODUÇÃO.....	63
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	65
5.2.1 Material Biológico.....	65
5.2.2 Extração de RNA e Síntese de cDNA.....	65
5.2.3 Sequenciamento do Gene <i>PDS</i> de Capim-amargoso.....	65
5.2.4 Obtenção das Moléculas de dsRNA dos Genes <i>PDS</i> e <i>GFP</i>	66
5.2.5 Bioensaios de Entrega de dsRNAs em Capim-Amargoso.....	67
5.2.5.1 <i>Bioensaio de Aplicação em Raízes</i>	67
5.2.5.2 <i>Bioensaio de Aplicação em Folhas</i>	68
5.2.5.3 <i>Bioensaio de Aplicação Pré-emergente</i>	68
5.2.6 Análise Da Expressão Gênica por RT-qPCR.....	69
5.2.7 Análises estatísticas.....	69
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
5.4 CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS.....	79

1. INTRODUÇÃO

A demanda por uma agricultura sustentável fomentada por diversos países que buscam por alimentos livres de pesticidas químicos tem levado ao desenvolvimento de práticas e tecnologias economicamente viáveis e ambientalmente sustentáveis que visem redução dos efeitos das mudanças climáticas (IPCC, 2014). Nos últimos anos a utilização de pesticidas (herbicidas, nematicidas, inseticidas, entre outros) têm gerado diversas discussões a respeito da segurança para o meio ambiente e saúde humana, além de baixa aceitação por parte da opinião pública. Métodos baseados em biotecnologia como o RNAi têm quebrado barreiras no desenvolvimento de novas tecnologias para a proteção dos cultivos.

Os biopesticidas baseados em RNA de interferência (RNAi) ganham destaque como uma das alternativas ao controle químico contra pragas, patógenos e plantas daninhas, sendo considerada uma ferramenta biotecnológica para o desenvolvimento de “pesticidas de próxima geração”, que no futuro poderão agregar ao atual portfólio de pesticidas do mercado.

A potencial utilização de RNAi como um bioherbicida para controle de plantas daninhas é uma promissora abordagem, pois apresenta diversas vantagens, dentre elas a especificidade de alvos e um impacto mínimo sobre o meio ambiente, organismos não alvos, e culturas agrícolas como a soja, o milho, o algodão entre outras. Os bioherbicidas baseados em RNAi apresentarão baixa toxicidade, baixa persistência no ambiente e menor risco de desenvolvimento de tolerância ou resistência por parte das pragas e patógenos (PARKER et al., 2019). Devido ao seu modo de ação, ou seja, a aplicação de moléculas de dsRNA exógenos, os bioherbicidas poderão ser empregados na formulação de produtos para serem aplicados sozinhos tendo como alvo genes letais ou essenciais em plantas ou em combinação com herbicidas convencionais tendo como alvo genes envolvidos no mecanismo de resistência a herbicidas. Acredita-se que a utilização desses produtos possibilitará uma redução da dose e conseqüentemente redução do impacto ambiental e também a possibilidade do controle de populações de plantas daninhas resistentes.

Um exemplo de que a tecnologia de RNAi já está iniciando uma revolução na proteção dos cultivos é o Ledprona, inseticida baseado em RNAi lançado recentemente pela empresa GreenLight Biociences. O produto é destinado ao controle do besouro da

batata (*Leptinotarsa decemlineata*), um inseto importante para as culturas de batata e solanáceas no hemisfério norte (RODRIGUES et al., 2021). A empresa Monsanto é outro exemplo, em 2013 lançou a tecnologia BioDirect™ para o desenvolvimento de produtos utilizando RNA interferente para controle de insetos, plantas daninhas e até mesmo proteção de abelhas, mas até o momento não lançou nenhum produto, embora possua diversas patentes na área (SAMMONS et al., 2014).

Outro passo rumo ao desenvolvimento da tecnologia é a regulamentação. A legislação brasileira vem se adaptando às novas tecnologias, um exemplo, é a publicação da Resolução Normativa Nº 16 da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). A RN 16 propõe que a aplicação de dsRNAs ou siRNAs que não modifiquem o genoma permanentemente sejam consideradas como não OGM (Organismo Geneticamente Modificado), o que permite que esses produtos não precisem passar por longos processos de regulamentação, como no caso dos OGMs. Essa flexibilidade na legislação abre espaço para que empresas e instituições de pesquisa avancem no desenvolvimento de novos produtos.

A obtenção de produtos comerciais com alto valor agregado necessita de estudos de base para estabelecer os conceitos e desenvolver novas tecnologias. Poucos são os relatos na literatura de aplicação de dsRNAs em folhas, a maioria deles apresentam siRNAs de 21 e 22 pb como mais eficientes para o silenciamento gênico via RNAi. Outros trabalhos utilizam técnicas como abrasão, alta pressão, ou mesmo nanopartículas para realizar a entrega de tais moléculas (DALAKOURAS et al., 2016; HENDRIX et al., 2021a; NUMATA et al., 2014). Por isso nesse trabalho foi escolhido o gene *PDS* de capim-amargoso para responder algumas questões em aberto. Afinal, dsRNAs longos têm a capacidade de causar silenciamento gênico quando aplicados sobre folhas de capim-amargoso? Qual a forma mais eficiente de aplicação de dsRNA tópico para o silenciamento gênico via RNAi em capim-amargoso?

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver estratégias de produção e entrega de dsRNAs para o silenciamento de genes via RNAi em capim-amargoso.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficiência dos vetores plasmidiais L4440 e pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp modificado (New-Vector) para a produção de dsRNA em *Escherichia coli* HT115 (DE3).
- Otimizar as condições de extração de dsRNA.
- Utilizar indutor alternativo para produção de dsRNA.
- Sequenciar o gene *Phytoene desaturase (PDS)* de capim-amargoso.
- Silenciar o gene *Phytoene desaturase (PDS)* em capim-amargoso.
- Otimizar a entrega de dsRNA sem proteção via folhas, raízes e pré-emergência.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CAPIM-AMARGOSO

Digitaria insularis (L.) Mez ex Ekman, conhecido popularmente como capim-amargoso, é natural da América tropical e subtropical e se tornou uma planta daninha importante devido à competição com culturas anuais e perenes no Brasil (DE CARVALHO et al., 2011). O capim-amargoso pertence à família Poaceae, é uma planta monocotiledônea perene que possui folhas de bainha longa e pilosa (Figura 1), além de panículas muito vistosas e elevado número de sementes com alta taxa de germinação (KISSMANN, 1997). A reprodução do capim amargoso se dá pela propagação de sementes e rizomas. A alta capacidade de produção e dispersão de sementes confere um alto valor adaptativo. *D. insularis* é uma planta diploide ($2N=36$), possui a via fotossintética C4 (KISSMANN, 1997; TAKANO et al., 2018).

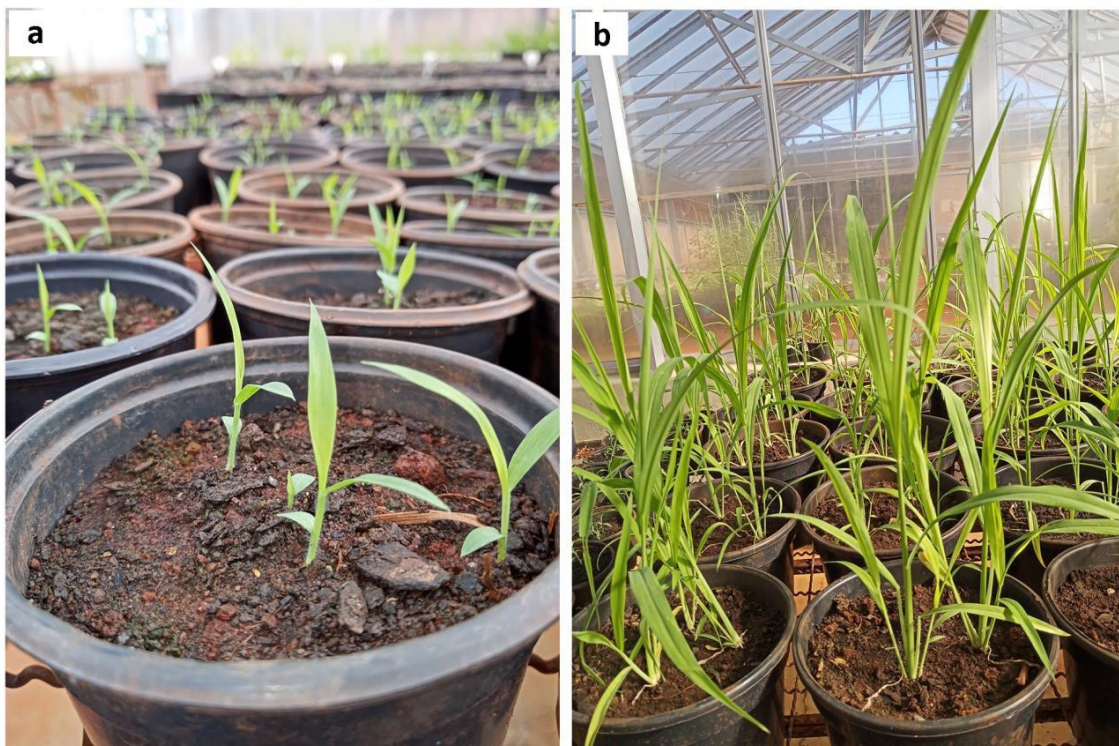


Figura 1. Estruturas vegetativas de capim amargoso. a) 10 dias após a germinação. b) 45 dias após a germinação. Fonte: a autora.

As plantas de capim-amargoso apresentam crescimento lento até 45 dias após a emergência (Figura 1b), período onde o controle da planta é mais fácil. Após este período, há um rápido crescimento das raízes e formação dos rizomas a partir de onde o

controle apresenta os maiores problemas (MACHADO et al., 2006). Os rizomas são estruturas ricas em amido que constituem uma barreira para a translocação dos herbicidas, além disso, são considerados uma fonte de reserva energética que permite uma rebrota vigorosa da planta (MACHADO et al., 2008). A rusticidade do capim-amargoso confere a esta monocotiledônea uma alta adaptabilidade, agressividade, persistência e eficiência em competição por água, luz e nutrientes o que a torna uma planta daninha de interesse em áreas de cultivo de soja e milho no Brasil (DE CARVALHO et al., 2011; FERREIRA; BARBOSA; CORDEIRO, 2019).

Embora existam algumas formas alternativas de controle de capim-amargoso, com o desenvolvimento da tecnologia *Roundup Ready* (RR) a aplicação de glifosato para o controle de plantas daninhas têm sido a principal molécula utilizada em áreas de cultivo de soja. O glifosato inibe a enzima 5-enolpiruvatochiquimato-3-fosfatase sintase (EPSPS) da via metabólica do ácido xiquímico, impedindo o metabolismo de produtos importantes como aminoácidos fenilalanina, tirosina, triptofano que são utilizados na síntese de proteínas (DE CARVALHO et al., 2012). A pressão de seleção sobre as plantas daninhas pelo uso intensivo de glifosato nos cultivos resultou na seleção de espécies resistentes como buva, azevém, caruru-palmeri, capim pé-de-galinha e também o capim-amargoso (DE CARVALHO et al., 2012; LOPEZ OVEJERO et al., 2017). O primeiro caso de capim amargoso resistente ao glifosato no Brasil foi notificado em 2008 e desde então foram notificados casos em diversas regiões de plantio (TAKANO et al., 2018). Já em 2020 um caso de resistência múltipla, em dois sítios de ação: Inibidores da EPSPS e ACCase (Acetyl CoA Carboxylase) foi notificado (HEAP, 2022). Assim, ainda existe a necessidade de novos estudos para elucidar os mecanismos de resistência em capim-amargoso, embora, os mecanismos encontrados até o momento estão relacionados à baixa absorção, translocação e degradação do glifosato (TAKANO et al., 2018). Na prática, a seleção de biótipos resistentes acarreta em um aumento significativo nos custos de produção para o controle de plantas daninhas com aplicação de outras classes de herbicidas, além de diminuir a produtividade das culturas de interesse.

No caso da soja, a produtividade pode ser até 44% menor em áreas com infestação de capim-amargoso comparado a áreas sem infestação (GAZZIERO, 2012). Densidades de seis a oito plantas por m² de capim-amargoso resultou em perdas entre 600 e 1300 kg/ha⁻¹ (GAZZIERO et al., 2019). Além disso, os custos de produção em soja podem aumentar em até 290% com a ocorrência de capim-amargoso resistente ao

glifosato, sendo necessário realizar a aplicação de outros herbicidas (ADEGAS et al., 2017). Além de um aumento nos custos de produção, há uma carga maior de agroquímicos sendo aplicados nas lavouras.

Aplicado como um bioherbicida na forma de spray, o RNAi tem um grande potencial para o controle de plantas daninhas, pois as sequências podem ser desenhadas como alvos seletivos para espécies específicas ou um grupo de espécies próximas filogeneticamente, eliminando o surgimento de populações resistentes como acontece com os herbicidas tradicionais (WESTWOOD et al., 2018). A utilização da tecnologia de dsRNA pode revolucionar a indústria dos herbicidas, gerando produtos com menor impacto ambiental e altamente eficientes no controle de plantas daninhas.

3.2 MECANISMO RNAI

O silenciamento gênico via RNAi é um mecanismo de defesa essencial contra vírus e transposons em organismos eucariotos dentro dos reinos Fungi, Plantae e Animalia (CHRISTIE; CROFT; CARROLL, 2011; MITTER et al., 2017). O silenciamento por RNAi é realizado por pequenos RNAs que podem ser originários de um fonte exógena como o dsRNA (*double-strand RNA*) ou siRNAs (*small-interfering RNA*), ou endógena através da transcrição dos genes *MIR* em microRNAs (miRNAs) (CHRISTIE; CROFT; CARROLL, 2011; MITTER et al., 2017).

O primeiro relato de silenciamento gênico via RNA foi descrito por Napoli e colaboradores (1990) em um estudo com petúnias visando aumentar a expressão da enzima chalcona sintase (CHS) pela inserção de uma cópia adicional do gene endógeno, esperando a intensificação na coloração violeta das flores. Contudo, o fenótipo visualizado foi de flores brancas ou variegadas nas plantas que receberam a cópia adicional do gene *CHS*, enquanto flores das plantas controle apresentaram fenótipo violeta. Esse fenômeno foi descrito como co-supressão ou silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS). Ainda em 1992, outros pesquisadores descobriram que esse fenômeno de silenciamento gênico pós-transcricional também ocorria em fungos e o denominaram *quelling* (repressão) (ROMANO; MACINO, 1992). O mecanismo de silenciamento por RNAi foi elucidado por Fire e Melo (1998) em experimentos com o nematoide *Caenorhabditis elegans*, comprovando que o silenciamento de genes endógenos ocorreria por um mecanismo desencadeado pela entrada de dsRNA na célula, lhes rendendo o prêmio Nobel de Medicina no ano de 2006.

A molécula de dsRNA ao entrar no citosol da célula é clivada pela enzima DICER, uma ribonuclease III (em plantas *DICER-Like*), em pequenos RNAs de interferência denominados como siRNAs. Os siRNAs são compostos de uma fita dupla, uma denominada guia e uma fita passageira com tamanho entre 21 a 24 nucleotídeos (AXTELL, 2013). A fita guia é incorporada ao complexo enzimático de silenciamento gênico denominado RISC (do inglês *RNA-induced silencing complex*), cujo principal componente é a proteína argonauta (AGO). Sua atividade catalítica, além de atuar na clivagem do mRNA, têm a capacidade de inibir a tradução e mediar a metilação de DNA (BAULCOMBE, 2004; YANG; LI, 2018).

No citoplasma, o complexo RISC utiliza a fita guia de siRNA para encontrar a sequência complementar em moléculas de mRNA, uma vez que ocorre o pareamento de bases e a proteína AGO realiza a clivagem do mRNA, impedindo que o mesmo seja traduzido em proteína (BAULCOMBE, 2004).

Em *Arabidopsis* existem três DCLs (*DICER-Like*) parálogas envolvidas no mecanismo de RNAi mediado por dsRNA exógeno, cada uma desempenhando um papel no mecanismo de RNAi: DCL2, DCL3, e DCL4, como demonstrado na Figura 2 (SANAN-MISHRA et al., 2021; YANG; LI, 2018). A enzima DCL4 está envolvida diretamente no silenciamento gênico pós-transcricional pela degradação de mRNAs. DCL4 gera siRNAs de 21 pb a partir de um dsRNA longo, que são responsáveis por iniciar a primeira linha de defesa antiviral da planta. Os siRNAs de 21 pb gerados por DCL4 são carregados pela enzima AGO1 desencadeando o processo de silenciamento gênico pós-transcricional (DALAKOURAS; PAPADOPOULOU, 2020).

Além da degradação o complexo RISC pode se ligar ao mRNA e levar a inibição da tradução do mRNA, pelo nível de complementariedade entre o siRNA e a sequência alvo (BURAND; HUNTER, 2013; YANG; LI, 2018). Quando a complementariedade é completa o resultado gera a degradação do mRNA, já quando a complementariedade é incompleta o resultado é da inibição da tradução pela ligação do complexo à região 3'. A ligação do complexo RISC à região 3' pode levar a desadenilação do mRNA, bloqueando o início da tradução ou fazendo com que o ribossomo se dissocie do mRNA (BURAND; HUNTER, 2013).

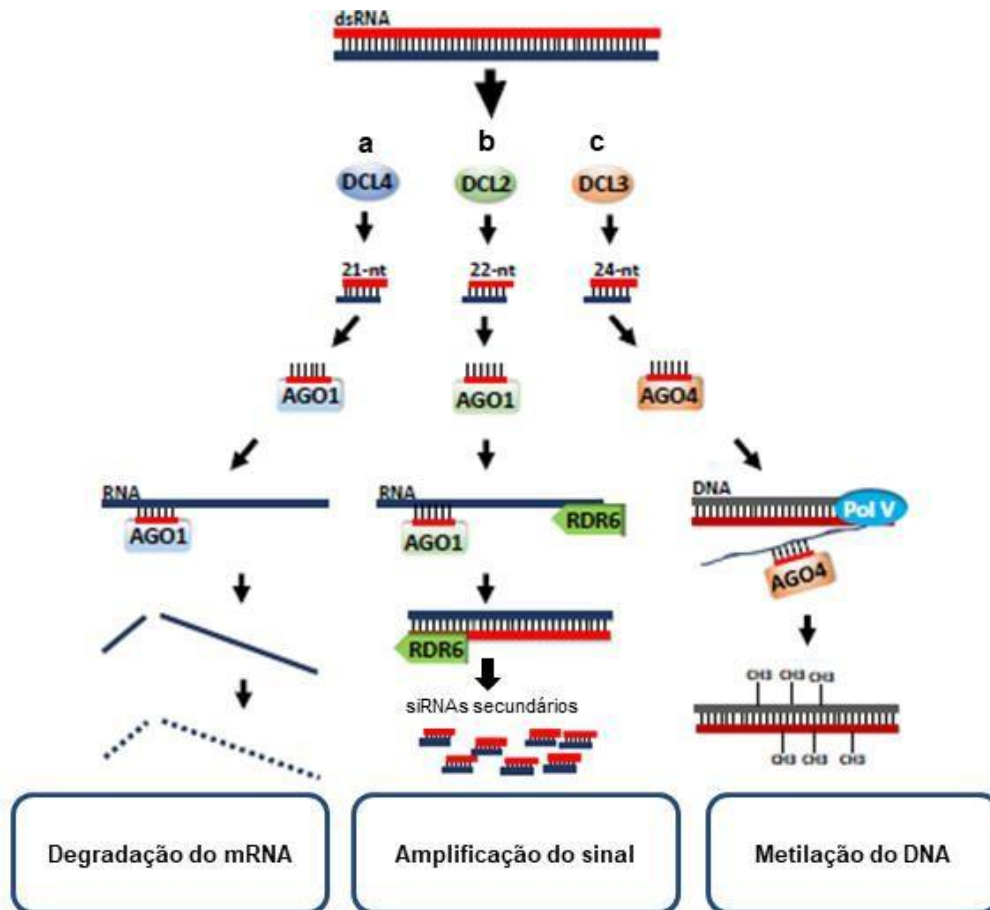


Figura 2. Mecanismos de silenciamento gênico por RNAi em plantas.

a) DCL4 cliva dsRNAs exógenos em siRNAs de 21pb que são recrutados pela enzima Argonauta 1 (AGO1), principal enzima do complexo RISC. A fita passageira do siRNA de 21pb é degradado enquanto que a fita guia é mantida no complexo. O complexo RISC, por complementariedade, degrada mRNAs. b) DCL2 cliva dsRNAs em siRNAs de 22pb, que são recrutado pela AGO1 (RISC) que recrutam RdRP 6 para a extremidade 3' dos transcritos alvo para a geração de siRNAs secundários. c) DCL3 cliva dsRNA em siRNAs de 24pb que são recrutados por Argonauta 4 (AGO4) e desencadeiam a metilação do DNA por hibridização com transcritos de Pol V ou Pol II. Fonte: DALAKOURAS et al., 2019 com adaptações da autora.

A amplificação do sinal é um processo que ocorre exclusivamente em fungos e plantas através da produção de siRNAs secundários (CHEN et al., 2010). Nesse caso a DCL2 gera siRNAs de 22pb que são recrutados pela RNA polimerase 6 (RdRP6) transcrevendo-os em dsRNA. A dupla fita de RNA é então clivada por DCL4 ou DCL2 gerando os siRNAs secundários de 21 ou 22 pb, respectivamente, em um mecanismo denominado “silenciamento transitivo” (DALAKOURAS et al., 2019; DALAKOURAS; PAPADOPOULOU, 2020; WU et al., 2020).

Além do silenciamento pós-transcricional e da amplificação do sinal, as proteínas AGO4 podem utilizar os siRNAs para reconhecerem regiões homólogas no

DNA genômico e recrutar metiltransferases de DNA a fim de metilar os resíduos de citosina de ambas as cadeias de DNA, em um processo denominado de metilação do DNA direcionado por RNA (RdDM) (BORGES; MARTIENSSEN, 2015; DALAKOURAS et al., 2019). A DCL3 processa siRNAs de 24 pb de transcritos de loci heterocromáticos pela RNA polimerase IV (Pol-V) e depois os convertem em dsRNA por RDR2. Os siRNAs são então carregados pela AGO4 e atuam na metilação do DNA. Em processos onde ocorre a metilação de DNA mediada por RNA, embora as plantas tratadas com dsRNA sejam consideradas, por um lado, livres de OGM, podem ser consideradas modificadas epigeneticamente (DALAKOURAS; PAPADOPOULOU, 2020).

3.3 SILENCIAMENTO GÊNICO VIA RNAI EM PLANTAS

O silenciamento gênico mediado por RNAi ocorre em diversos organismos como fungos, vírus, animais e plantas (DAS; SHERIF, 2020). O mecanismo já é amplamente conhecido e apresenta uma gama de trabalhos publicados, contudo em plantas os dados disponíveis na literatura são limitados e ainda existem diversos pontos a serem elucidados.

O primeiro relato de silenciamento gênico via RNAi, por aplicação de dsRNA exógeno em plantas foi descrito por Sammons et al., (2014). Plantas de *Nicotiana benthamiana* tratadas com dsRNA e siRNAs, utilizando o adjuvante Silwet L-77 por pulverização, desencadearam o silenciamento do gene endógeno *Phytoene desaturase (PDS)* (SAMMONS et al., 2014). Após essa publicação, muitos outros trabalhos foram realizados e obtiveram resultados importantes, utilizando a aplicação de dsRNA para silenciamento de genes em plantas. Diferentes estratégias estão sendo utilizadas para avaliar e validar a tecnologia em plantas (Tabela 1).

Tabela 1. Aplicação de dsRNA e siRNAs exógenos para silenciamento gênico em plantas (continua)

Aplicação em folhas									
Método de aplicação	Espécie	Molécula		Concentração	Dose	Genes	Silenciamento		Referência
		Tipo	Tamanho (pb)				Local	Sistêmico	
Alta pressão (5-6 bar)	<i>N. benthamiana</i>	siRNA	22	1 µM	200 µl / planta	Green fluorescent protein (GFP)	Sim	Sim	Uslu et al., 2021
Abrasão (lixa)	<i>N. benthamiana</i>	siRNA	22 e 21	1 µg/µl	20-25 µl/planta	Green fluorescent protein (GFP)	Sim	Sim	Hendrix et al., 2021 a
				0.2 µg/µl		Magnesium cheletase I (CHL-I)	Sim	Não	
				0.5 µg/µl		Magnesium cheletase H (CHL-H)	Sim	Não	
				0.5 µg/µl		Genomes uncoupled 4 (GUN4)	Sim	Não	
Abrasão (lixa) e pressão	<i>Amaranthus cruentus</i>			3 mg/ml	8 µl/folha	Magnesium cheletase H (CHL-H)	Sim	Não	
Alta pressão (5-6 bar)	<i>N. benthamiana</i>	siRNAs	21, 22, 24	10 uM	1000 uM/folha	Green fluorescent protein (GFP)	Sim	Sim	Dalakouras et al., 2016
Alta pressão (5-6 bar)	<i>N. benthamiana</i>	dsRNA	139 e 322	10, 20, 200 e 240 ng/µl	200 µl / planta	Green fluorescent protein (GFP)	Não	Não	Uslu et al., 2020
Pincel, spray, infiltração, inoculação, pipetagem	<i>Arabidopsis thaliana</i>	dsRNA	599		35 µg/ 100 µl	Neomycin phosphotransferase II (NPTII)	Sim	NA	Kiselev et al., 2021
Inoculação mecânica	<i>Dendrobium hybrid</i>	dsRNA	430	2 µg/µl	50 µl extrato/botão	R2R3-MYB	Sim	NA	Lau et al., 2015
Pincel com cerdas macias	<i>Arabidopsis thaliana</i>	dsRNA	720 e 599	0.1; 0.35; 1 ug/ul.	100ul/planta	Green fluorescent protein (GFP) Neomycinphosphotransferase II (NPTII)	Sim Sim	NA NA	Dubrovina et al., 2019
Nanoestruturas de DNA	<i>N. benthamiana</i>	siRNA	21	100 nM	100ul/folha	Green fluorescent protein (GFP)	Sim	Não	Zhang et al., 2019
Peptídeo carreador	<i>Arabidopsis thaliana</i>	siRNA	21	20pmol	100ul/folha	Chalcone synthase (CHS)	Sim	Não	Numata etl al., 2014

Tabela 1. Aplicação de dsRNA e siRNAs exógenos para silenciamento gênico em plantas. (conclusão)

Método de aplicação	Espécie	Molécula		Concentração	Dose	Genes	Silenciamento		Referência
		Tipo	Tamanho (pb)				Local	Sistêmico	
Carbon dots	<i>N. benthamiana</i>	siRNA	22	12ng/ul	45ng/cm2	Green fluorescent protein (GFP)	Sim	Sim	Schwartz et al., 2020
						Magnesium chelatase H (CHLH)	Sim	NA	
						Magnesium chelatase I (CHLI)	Sim	NA	
	<i>Solanum lycopersicum</i>			2, 4, 8 ng/ul-1		Green fluorescent protein (GFP)	Sim	NA	
Carbon dots	<i>N. benthamiana</i>	siRNA	22	NA	60ul	Green fluorescent protein (GFP)	Sim	Sim	Hendrix et al., 2021 b
Tat2 - peptídeo de penetração celular	<i>Triticale</i>	siRNA	21	250 pmol	100 µl/planta	Phytoene desaturase (PDS)	Sim	Não	Pepper et al., 2017
Aplicação em raízes									
Dendrímeros - Pipetagem nas raízes	<i>Arabidopsis thaliana</i>	dsRNA	450 e 550	NA	5ug	Shoot Meristemless (STM)	Sim	Sim	Jiang et al., 2014
						Werewolf (WER)	Sim	Sim	
Soaking de raízes jovens ou sementes	<i>Arroz e Arabidopsis thaliana</i>	dsRNA	554 e 562	1,0 mg/mL	1mL	Mob1A	Sim	Sim	Li et al., 2014
						WRKY23	Sim	Sim	
Soaking de raízes	<i>Arabidopsis thaliana</i>	dsRNA	504	100ng/ul	100ug/placa	GUS	Sim	Sim	Mitter et al., 2017

NA: Dado não avaliado ou não consta no artigo a informação.

As plantas podem absorver o dsRNA pela raiz e desencadear o mecanismo de interferência de RNA, este método de encharcamento é denominado de *soaking*. Em *Arabidopsis thaliana* o encharcamento de raízes por cinco dias consecutivos com dsRNA encapsulado em nanopartículas fluorescente catiônicas, levou à redução da expressão de genes do desenvolvimento *Shoot meristemless (STM)* e *Werewolf (WER)*. A redução da expressão do gene *STM* promoveu a redução do tamanho dos meristemas apicais enquanto que o silenciamento do gene *WER* levou ao aumento de raízes laterais (JIANG et al., 2014). A mesma estratégia foi empregada para silenciamento do gene *MOB1A*, envolvido na coordenação do padrão de tecidos e crescimento de órgãos. Plantas de *Arabidopsis* tiveram suas raízes encharcadas com dsRNA e resultou em uma significativa redução do comprimento e número de raízes (LI et al., 2015). Em arroz, o encharcamento foi realizado em raízes jovens com dsRNA para silenciamento do gene *Actina*, envolvida na formação do citoesqueleto, ocasionando em significativa repressão do crescimento das raízes (LI et al., 2015). Ainda, o gene *Beta-glucuronidase (GUS)* também foi silenciado por *soaking* em plantas jovens de *Arabidopsis*, com aplicação de dsRNA encapsulado com HDL ou mesmo sem encapsulamento (MITTER et al., 2017).

Em folhas, o uso de dsRNAs longos para aplicação necessita de novos estudos, já que diferentes grupos divergem quanto à capacidade de dsRNAs longos desencadearem silenciamento gênico (DALAKOURAS et al., 2016; DUBROVINA et al., 2019; USLU et al., 2020). No entanto, a associação de estratégias têm permitido evidenciar o silenciamento mesmo com a aplicação de dsRNA.

A aplicação de extratos bacterianos contendo moléculas de dsRNAs sobre as folhas da orquídea *Dendrobium hybrid* silenciou o gene *Myeloblastosis R2R3 (R2R3-MYB)*, responsável pela pigmentação e morfogênese das flores (LAU et al., 2015). De forma similar, a aplicação de dsRNA em folhas de *A. thaliana* expressando os genes que codificam as proteínas marcadoras *Green Fluorescent Protein (GFP)* e *Neomycin Phosphotransferase II (NPTII)* levou ao silenciamento local dos genes (DUBROVINA et al., 2019).

As condições fisiológicas foram destacadas como cruciais para levar ao silenciamento gênico via aplicação do dsRNA sem proteção, em folhas de *Arabidopsis* que expressavam o gene *NPTII*. A baixa umidade do solo, estágio fenológico da planta, horário de aplicação e método de aplicação foram fatores relevantes para o silenciamento gênico via aplicação tópica de dsRNA (KISELEV et al., 2021). Em *Nicotiana benthamiana*, o método de aplicação e tamanho da molécula também foram destacados como relevantes na experimentação, quando

não obtiveram silenciamento utilizando dsRNAs longos aplicados com alta pressão, método esse definido como eficaz na indução do silenciamento gênico via RNAi utilizando siRNAs de 22 pb (USLU et al., 2020).

Uma alternativa para provas de conceitos, são o uso de abrasivos como sílica ou lixa, alta pressão e biobalística que causam ferimentos nas folhas, facilitando a permeação da molécula de dsRNA ou siRNA, podendo levar a um sucesso maior nos resultados de silenciamento nos genes alvo.

Quando plantas geneticamente modificadas receberam a aplicação de moléculas tóxicas de siRNAs (21 e 22 pb), o silenciamento de transgenes como o *GFP* e *NPTII* foi efetivo, contudo o silenciamento de genes endógenos ainda parece ser um desafio a ser ultrapassado. A alta pressão (5-6 bar) contribuiu nos estudos de aplicação de siRNAs de 22 pb para o silenciamento do gene *GFP* em *N. benthamiana* (DALAKOURAS et al., 2016; USLU et al., 2021). Contudo a reprodução dos dados apresentados Sammons et al., (2014) por meio da aplicação por pulverização não apresentou reprodutibilidade (DALAKOURAS et al., 2016). Pelo método de abrasão, o uso de siRNAs de 21 e 22 pb associado ao método de abrasão com lixa usada por Hendrix et al., (2021a) levou ao silenciamento local e sistêmico do gene *GFP*, contudo os genes endógenos *Magnesium chelatase subunidades I e H (CHL-I e CHL-H)* e o gene *Genomes uncoupled (GUN4)* apresentaram silenciamento apenas local.

Embora, o uso de abrasivos contribuam para os estudos do silenciamento dos genes, peptídeos de penetração ou mesmo nanopartículas são moléculas promissoras e desempenham um importante papel no processo de aplicação foliar, já que atuam protegendo a molécula de dsRNA/siRNA e auxiliando na entrega e translocação destas moléculas. Além disso, já têm sido utilizadas na aplicação de outras moléculas de interesse agrônômico (BAO; WAN; BALUŠKA, 2017; KARNY et al., 2018).

Em folhas, a infiltração de siRNAs (21pb) complexado com um peptídeo positivamente carregado e combinado a um copolímero de histidina e lisina levou ao silenciamento local do gene que codifica a proteína marcadora *Yellow Fluorescent (YFP)* em plantas de *Arabidopsis* transgênicas, e do gene endógeno *CHS* em plantas não-transgênicas (NUMATA et al., 2014). O peptídeo de penetração celular Tat2 encapsulando siRNAs de 21pb levou ao silenciamento do gene *PDS* em Triticale (PEPPER et al., 2017). As nanopartículas do tipo Carbon dots foram eficazes no silenciamento do gene *GFP*, além de outros dois genes endógenos, *Magnesium chelatase H* e *Magnesium chelatase I* ambos atuantes na via de biossíntese da clorofila (HENDRIX et al., 2021b; SCHWARTZ et al.,

2020). Nanoestruturas de DNA também se mostraram eficazes no silenciamento do gene GFP em *N. benthamiana* (ZHANG et al., 2019).

Há uma escassez de dados para silenciamento de genes alvos endógenos via aplicação tópica de dsRNA. No entanto, em plantas transgênicas que recebem o tratamento tópico de dsRNA, o silenciamento local e sistêmico do transgene é reprodutível. As principais informações a respeito deste fator, estão contidas em patentes, como os destacados pela empresa Bayer. Ela indica que nem todos os genes endógenos são suscetíveis ao silenciamento gênico induzido por RNAi aplicado topicamente (BENNETT et al., 2020), e a redução de mRNAs foi observada em apenas 40% dos genes alvos testados. Além disso, apontam que em genes intrínsecos altamente expressos, o silenciamento pode ser mais factível (BENNETT et al., 2020). Entre as hipóteses para a dificuldade do silenciamento de genes intrínsecos da espécie é a presença de íntrons, o que geralmente não ocorre em plantas onde foi obtido o transgene (CHRISTIE; CROFT; CARROLL, 2011; DALAKOURAS et al., 2020). Genes portadores de menor número de íntrons seriam mais suscetíveis à atuação de RdRP6, enzima que dá início a produção de siRNAs secundários e conseqüentemente à transividade e ao silenciamento sistêmico (CHRISTIE; CROFT; CARROLL, 2011; SANAN-MISHRA et al., 2021). A estrutura secundária do mRNA ou sua interação com proteínas, também podem ser fatores que afetam o silenciamento gênico mediado por RNAi, nesses casos limitando a acessibilidade do complexo RISC ao mRNA (BENNETT et al., 2020; LIU; WANG; AXTELL, 2014).

Nesse contexto, mesmo com tantos desafios relacionado ao uso desta tecnologia em plantas, o desenvolvimento de pesquisas envolvendo o mecanismo de RNAi, se faz necessário e vantajoso para o desenvolvimento de novos produtos para proteção de cultivos, sobretudo, no controle de plantas daninhas. Contudo, para que essa tecnologia se torne amplamente utilizada e comercializada, algumas barreiras ainda precisam sanadas, fazendo com que as estratégias de aplicação possam ser utilizadas para diferentes espécies e avaliadas em campo.

3.4 USO DA TECNOLOGIA DE RNAI EM PLANTAS NA AGRICULTURA

3.4.1 Absorção e Translocação de dsRNAs e siRNAs

A entrega do dsRNA ou de siRNAs via aplicação tópica em folhas é um dos maiores desafios para a aplicação da tecnologia em larga escala. A penetração das moléculas é pré-

requisito para a eficiência da técnica e tal como na aplicação de herbicidas convencionais, depende de vários fatores, entre eles: características da superfície das folhas das plantas como cutícula, estômatos e hidatódios; propriedades físico químicas do ingrediente ativo, peso molecular, lipofilicidade, tipo e concentração do ativo, além de condições ambientais (WANG; LIU, 2007).

A cutícula, ou membrana cuticular, é a primeira e mais importante barreira a ser vencida antes que qualquer produto possa ser absorvido pelo citoplasma e integrado ao metabolismo da planta (ALEXANDER; HUNSCHE, 2016). A função biológica da cutícula é proteger a planta contra ataques de patógenos, múltiplos estresses bióticos e abióticos, como desidratação, excesso de radiação UV, ataques de patógenos ou insetos. É composta por elementos lipofílicos, apolares, como ceras e cutina e também por componentes hidrofílicos, polares como polissacarídeos, secretados pelas células epidérmicas, com espessura de 100 a 250 nm (FERNÁNDEZ et al., 2017; WANG; LIU, 2007). A heterogeneidade estrutural e química da cutícula resulta em grandes diferenças nos fenômenos de contato e nos processos de transporte, podendo a permeabilidade da cutícula variar conforme a espécie e o estágio fenológico (FERNÁNDEZ et al., 2017). Embora estas barreiras estruturais façam a proteção física da planta, compostos lipofílicos e hidrofílicos têm capacidade de permear através da cutícula por meio de diferentes vias: como a via polar ou ‘poros aquosos’ e a via apolar ou ‘matriz de cutina e cera’, tais poros possuem um limite de exclusão de 4 a 5 nm (WANG; LIU, 2007).

Outra barreira física para a permeação dos dsRNAs e/ou siRNAs para o núcleo celular é a parede celular. A célula vegetal é envolvida pela parede celular composta por diversos polissacarídeos. A parede celular não tem apenas a função de manter a estrutura da célula, mas também atua como uma barreira contra injúrias e patógenos, prevenindo que diferentes tipos de partículas entrem na célula (BAO; WAN; BALUŠKA, 2017). Embora, possua poros, seu diâmetro é dependente de fatores ambientais, espécie de planta e tipo celular. Macromoléculas como proteínas globulares e polissacarídeos conseguem ultrapassar a barreira da parede celular (BENNETT et al., 2020). Adjacente à parede celular, a membrana plasmática é mais um fator determinante para a permeação da molécula. A membrana plasmática foi retratada com um limite de exclusão de RNAs de aproximadamente 32 a 55,5 kDa em células vegetais de BY-2. Além disso, foram necessários agentes de transfecção para que as células pudessem absorver o RNA exógeno. Neste caso foi utilizado flg22, um

fragmento de flagelina de 22 aminoácidos, reconhecido por estimular a endocitose induzida por ligantes em plantas (BENNETT et al., 2020).

Os mecanismos de captação de dsRNA exógeno em plantas ainda requer uma investigação mais detalhada. Entre os mecanismos já reconhecidos na interação planta-patógeno, que poderiam ser estendidos para essa comunicação, destacam-se como possíveis vias de entrada de dsRNAs: a) canais transportadores ligados à membrana; b) internalização mediada por vesículas (BHAT; RYU, 2016).

A membrana plasmática possui diversos canais compostos por proteínas transmembrana que podem se ligar e transportar fragmentos de DNA e RNA exógenos para o citoplasma das células vegetais (BHAT; RYU, 2016). Em insetos é mais claro o mecanismo de captação das moléculas de dsRNA. A proteína *systemic RNA interference-defective-1* (SID-1) e a endocitose são os principais meios transportadores, contudo em plantas esses mecanismos ainda não são bem esclarecidos (ADEYINKA et al., 2020).

A presença de nucleases na superfície das folhas também pode ser um fator impeditivo na absorção das moléculas de dsRNAs. As nucleases podem também atuar como uma barreira impedindo a absorção de RNAs íntegros. Responsáveis por degradar o dsRNA exógeno as nucleases embora sejam amplamente estudadas em insetos, em plantas sabe-se pouco a respeito de sua interferência na degradação de dsRNAs/siRNAs em folhas. Após a aplicação de siRNAs na superfície foliar de *N. benthamiana* não foram mais detectados siRNAs íntegros após 6h de aplicação, enquanto que, ao aplicar siRNAs em folhas tratadas com um inibidor de nucleases foram encontrados, demonstrando que as nucleases têm um papel importante na degradação de siRNAs aplicados sobre as folhas (BENNETT et al., 2020).

Entre as portas de entrada apropriadas para a absorção de moléculas de dsRNA estão os estômatos e os hidatódios. Os estômatos são umas das vias de possível entrada de produtos de aplicação foliar, a via estomática é altamente capacitiva devido ao seu grande limite de exclusão de tamanho acima de 10 nm. A entrada de ingredientes ativos por estômatos ocorre com o uso de surfactantes, que quebram a tensão superficial da água (WANG; LIU, 2007).

Os hidatódios são outra via possível de absorção de substâncias. Hidatódios são responsáveis pela gutação, processo fisiológico onde fluidos são liberados ativamente nas partes aéreas das plantas (folhas, sépalas, pétalas) (SINGH, 2013). Diretamente conectados com o sistema vascular da planta, são locais bastante propícios para infecções por bactérias e fungos, mas também possível local de translocação de produtos de aplicação foliar para a sistema vascular das plantas (JAUNEAU et al., 2020)

As propriedades do ingrediente ativo também podem interferir na aplicação foliar. Quando se trata de agroquímicos e outros produtos de aplicação foliar a penetração ocorre por difusão, o gradiente de concentração do produto atua como uma força e direciona a entrada. Características moleculares e propriedades lipofílicas são cruciais na absorção de moléculas pelas folhas (WANG; LIU, 2007).

No caso da aplicação de RNAs exógenos o tamanho da molécula também é importante, já que dsRNAs longos são de tamanho superior aos siRNAs (21 - 24 pb). Nos trabalhos publicados até o momento a aplicação foliar de dsRNA longo, acima de 100 pb levou ao silenciamento gênico sistêmico quando aplicado em folhas apenas de transgenes, já a aplicação em raízes proporcionou o silenciamento local e sistêmico (JIANG et al., 2014; LI et al., 2015; MITTER et al., 2017). As moléculas de siRNAs de 21 e 22 pb levaram ao silenciamento local e sistêmico em aplicação foliar (HENDRIX et al., 2021a; SCHWARTZ et al., 2020; USLU et al., 2021). Evidenciando que o tamanho da molécula de dsRNA aplicado têm influência na absorção e translocação em plantas. Segundo os dados já publicados siRNAs de 22 pb apresentam altas taxas de silenciamento local e sistêmico de genes endógenos, isso devido a esse tamanho de siRNA desencadear a produção de siRNAs secundários que podem aumentar o silenciamento do gene alvo (CHEN et al., 2010; DALAKOURAS et al., 2016; HENDRIX et al., 2021a; WU et al., 2020).

As condições ambientais, na aplicação de produtos foliares, são também um fator decisivo na absorção e translocação. A umidade do ar propicia uma maior absorção de íons pela cutícula (WANG; LIU, 2007). A umidade relativa do ar acima de 70% em alguns estudos demonstrou aumentar a penetração de glifosato e CaCl_2 . Sugere-se que a umidade aumenta a capacidade de penetração pelo aumento do tamanho ou número de poros polares (FERNANDEZ; EICHERT, 2009).

O processo de absorção foliar é complexo já que envolve diversos fatores descritos acima (WANG; LIU, 2007), este pode ser um dos fatores que implicam em diferenças de reprodutibilidade nos resultados de aplicação de RNAs de uso tópico em plantas.

3.4.2 Sistemas Estabilizantes e Carreadores de dsRNAs

O desenvolvimento de formulações que auxiliem na entrada de dsRNAs ou siRNAs em plantas é um ponto importante no avanço da tecnologia. Além disso, a estabilidade da molécula no ambiente pode garantir uma permanência por tempo suficiente para melhorar a

absorção (YAN; REN; SHEN, 2021). Para ultrapassar as barreiras impostas pela superfície foliar impedindo a passagem de siRNAs ou dsRNAs diversos métodos foram utilizados, como abrasão com partículas de sílica ou lixa, alta pressão, alagamento abaxial de estômatos, nanopartículas ou adjuvantes (DALAKOURAS et al., 2016; DUBROVINA et al., 2019; HENDRIX et al., 2021b, 2021a; LAKSHMANAN et al., 2015).

Embora os métodos de alta pressão e abrasão sejam eficientes, são métodos muito distantes daqueles empregados pela tecnologia de aplicação no campo. Os adjuvantes e surfactantes agrícolas e as nanopartículas ou a associação destes produtos, são as alternativas mais promissoras na entrega eficiente e proteção das moléculas de dsRNA e siRNAs.

Os adjuvantes são substâncias adicionadas nas formulações de herbicidas ou adicionados no preparo da calda para aumentar a eficiência do produto e/ou modificar determinadas propriedades da solução como pH, visando facilitar a aplicação ou minimizar possíveis problemas (AZEVEDO L; CASTELANI P, 2013). Os adjuvantes aceleram e promovem o processo de penetração foliar, aumentam o tempo de molhamento das folhas, retenção, penetração e, às vezes, umectação. Já são comumente incluídos em formulações de spray e são fundamentais para melhorar a entrega de moléculas de dsRNA. Já os surfactantes podem atuar aumentando a área de contato, dissolvendo ou rompendo as barreiras cuticulares, solubilizando as moléculas, retendo a umidade na folha, e promovendo a infiltração estomática (FERNANDEZ; EICHERT, 2009). Os surfactantes também podem afetar a difusão transcuticular de substâncias via solubilização ou hidratação cuticular e que afetam a permeabilidade da membrana plasmática (FERNANDEZ; EICHERT, 2009).

O campo da nanotecnologia cresceu muito nas últimas décadas e propiciou o que chamamos de tecnologias de bancada para tecnologia aplicada. As partículas nanométricas, surgiram como ferramentas promissoras para entrega de medicamentos, diagnósticos, cosméticos e várias outras áreas biológicas e não biológicas (NAJAH-MISSAOUI; ARNOLD; CUMMINGS, 2021). Na agricultura, a pesquisa está mais focada no desenvolvimento nano-agroquímicos, tanto nanopesticidas como nanofertilizantes visando uma liberação de maior controle e entrega seletiva (KHANNA et al., 2021). Além disso, a aplicação em nanoescala permite integrar transportadores e compostos e conseqüentemente, reduzir o volume de calda sem prejudicar a produtividade contribuir para aumentar a produção sustentável de alimentos (PARISI; VIGANI; RODRÍGUEZ-CEREZO, 2015; RAJPUT et al., 2020).

O nanoencapsulamento de moléculas de dsRNA em nanoestruturas de DNA, peptídeos transportadores, carbon dots e HDLs podem melhorar a absorção via foliar e ainda proteger as moléculas contra as condições adversas do ambiente (BAO; WAN; BALUŠKA, 2017; MITTER et al., 2017; PEPPER et al., 2017; SCHWARTZ et al., 2020; ZHANG et al., 2019). Além de melhorar a absorção de dsRNAs ou siRNAs o encapsulamento dessas moléculas protege da ação de fatores ambientais como radiação UV, temperatura, ação de enzimas microbianas, entre outros, influenciam na disponibilização do dsRNA para as células (DUBELMAN et al., 2014; LI et al., 2015; TENLLADO et al., 2003).

Peptídeos transportadores são outra opção para o direcionamento das moléculas. O encapsulamento de moléculas com peptídeo transportador carregado positivamente combinado a um copolímero de histidina e lisina também aumentaram a eficiência na entrega (LAKSHMANAN et al., 2015; NUMATA et al., 2014). Ainda, infiltração de dsRNA sintético com um peptídeo transportador aumentou a eficiência de entrega levando a um rápido silenciamento pós transcricional (menos de 12h) (NUMATA et al., 2014).

Peptídeos de penetração celular são uma classe de pequenos peptídeos que conseguem penetrar e translocar as membranas celulares alcançando o citosol das células. Diversos peptídeos já foram identificados com a habilidade de penetração celular, variando as sequências de aminoácidos, tamanhos e polaridade (TAI; GAO, 2017). Os CPPs adentram as células por diversas vias, como perfuração da membrana celular ou mesmo por captação endocítica.

Os HDLs ou BioClay™, são nanopartículas de tamanho ajustável que tem sido apontadas como eficientes na entrega de biomoléculas em células vegetais. As nanopartículas de HDL promovem proteção da atividade do RNA e penetração através da parede celular vegetal com danos mínimos (BAO; WAN; BALUŠKA, 2017; MITTER et al., 2017). Moléculas de dsRNA encapsuladas com LDH conferiram ao tabaco imunidade contra os vírus *Pepper Mild Mottle Virus* (PMMoV) e *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) por 20 dias, enquanto que o dsRNA aplicado sem encapsulamento proporcionou imunidade de apenas 5 dias (MITTER et al., 2017).

O uso de *carbon dots*, uma alternativa “verde”, ao uso de quantum dots, que utilizam metais em sua estrutura, foi utilizado para carrear siRNAs (SCHWARTZ et al., 2020). Uma das vantagens da utilização de carbon dots é o seu tamanho, da ordem de 5 nm após o encapsulamento com siRNAs, além de ser utilizado com sucesso na entrega de siRNAs em células animais (WANG et al., 2013).

Embora as nanocápsulas sejam promissoras, considerando a alta demanda de aplicação destas moléculas nos diversos produtos, a aplicação de nanoestruturas no campo pode representar potenciais riscos agroambientais. Portanto, se faz necessário compreender às respostas das plantas às nanopartículas, mas também, adotar monitoramento ambiental para compreensão e desenvolvimento de estratégias sustentáveis e inovadoras de gestão de risco para utilizá-lo de forma racionalizada e integrada (KHANNA et al., 2021; RAJPUT et al., 2020).

3.4.3 Produção de dsRNA ou siRNAs para Aplicação em Larga Escala

O interesse comercial de grandes empresas pelo desenvolvimento de produtos baseados em RNAi estimulou o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para criar tecnologias de produção de dsRNA para utilização na agricultura. Estima-se que nas aplicações em campo serão necessárias doses de 2 a 10g de dsRNAs por hectare a depender do organismo alvo, método de aplicação, proteção com nanopartículas, sensibilidade do organismo, entre outros fatores (DAS; SHERIF, 2020; ZOTTI et al., 2018). Para atender essa demanda no desenvolvimento de novos produtos o fornecimento de dsRNAs em quantidade, qualidade e baixo custo é fundamental.

A produção de dsRNAs pode ser realizada *in vitro* ou *in vivo*, ambos métodos utilizam em seus sistemas a T7 RNA polimerase para a transcrição das sequências destinadas à produção de dsRNA (VOLOUDAKIS et al., 2015). A produção *in vitro* é realizada utilizando kits comerciais, contudo tais sistemas são caros e têm um baixo rendimento (DAS; SHERIF, 2020). A produção *in vitro* é mais recomendada para testes de conceito ou testes pequenos no estágio inicial de pesquisa. Para testes em campo e fabricação de produtos baseados em RNAi outros métodos de produção de dsRNA, como a produção *in vivo*, via fermentação líquida, atendem melhor a esses objetivos.

A produção *in vivo* tem menor custo e capacidade de escalonamento para produção de toneladas de dsRNAs, nesse caso são utilizadas bactérias (*Escherichia coli*, *Pseudomonas syringae* ou *Corynebacterium glutamicum*) ou levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) entre outros microorganismos para atuarem na produção dos dsRNAs (DAS; SHERIF, 2020; GUAN et al., 2021; VOLOUDAKIS et al., 2015). Ainda, é necessário a construção de um vetor de expressão que possibilite a inserção da região desejada para a produção, como o vetor L4440 (PAPIC' et al., 2018), além do uso de indutor de expressão, como IPTG,

amplamente relatado na literatura (AHN et al., 2019; VOLOUDAKIS et al., 2015). O processo de produção de dsRNAs poder ser melhorado levando à alta produtividade e aplicação na indústria.

O papel de empresas no desenvolvimento de tecnologias para a produção em larga escala é fundamental. Atualmente, figuram no cenário internacional algumas empresas que fornecem dsRNAs para estudos de laboratório, mas também com potencial para aplicação em campo. Na escala de produção em baixas quantidades, a empresa RNAGreenTech possui uma plataforma de transcrição *in vitro* que permite a produção de dsRNAs em pequenas quantidades (<https://rnagreentech.com/>). A empresa Nano Sur (<http://www.nanosur.com/mdsrna/>) têm capacidade de produção de dsRNAs quimicamente modificados para impedir a degradação após a aplicação. Na produção escalonável, a empresa RNAgri desenvolveu um método de produção de dsRNA via fermentação líquida com baixo custo, bem como a empresa Genolution (AgroRNA). A Green Light Biosciences desenvolveu um método bastante eficiente na produção de dsRNAs livre de células (MAXWELL et al., 2018).

Métodos econômicos para a produção em massa de dsRNA além da ampla concorrência no mercado futuramente contribuirão para uma redução de custos (ZOTTI et al., 2018). É possível verificar uma queda dos custos de produção ao longos dos anos tanto que em 2008 o custo aproximado para a produção de 1 grama de dsRNA era de US\$12.000. Atualmente, com a otimização de processos e desenvolvimento de novas plataformas os custos foram reduzidos expressivamente, atualmente a empresa RNAgri que têm a capacidade de produzir dsRNAs a US\$1/g utilizando fermentação líquida, já a empresa Greenlight Biosciences, utilizando um método livre de células reduziu ainda mais os custos chegando a US\$0.5/g (MAXWELL et al., 2018; TANING et al., 2020).

A redução dos custos de produção de dsRNA e de produção de nanocápsulas de proteção possibilita que produtos baseados em RNAi possam ser desenvolvidos para o controle de insetos, nematoides, vírus e plantas daninhas e assim revolucionar o mercado de defensivos ecologicamente sustentáveis.

3.4.4. Riscos e Desafios de Produtos Baseados em RNAi

3.4.4.1 Saúde humana

Uma das preocupações no desenvolvimento de herbicidas baseados em RNAi são os riscos que tais moléculas oferecem à humanos. Entre os possíveis alvos de contaminação por dsRNAs estão os consumidores e trabalhadores agrícolas. A população mais exposta a esses produtos são os consumidores devido ao risco de ingestão de produtos com resíduos de moléculas de dsRNAs (SCHUTTER et al., 2022). Embora seja algo novo a aplicação de dsRNAs exógenos para controle de pragas, diariamente humanos consomem essas moléculas em diversos produtos derivados de plantas, animais, insetos e fungos (SCHUTTER et al., 2022). Apesar disso, os dsRNAs utilizados nos produtos baseados em RNAi devem passar por uma ampla abordagem de retirada de sequências que possam ter alvos em humanos, mas por mais que as sequências escolhidas sejam altamente complementares às sequências de mRNAs humanos, a absorção pela via digestiva é muito baixa (RODRIGUES; PETRICK, 2020). O aparato digestório humano dispõe de diversas barreiras que impedem a absorção dessas moléculas, como nucleases e barreiras celulares que impedem a entrada livre dessas moléculas (CHEN et al., 2018; RODRIGUES; PETRICK, 2020).

Os trabalhadores agrícolas também podem ser afetados tanto pelas vias dérmica quanto por inalação. A absorção dérmica de dsRNAs parece ser limitada, já que muitas barreiras são impostas nesse tipo de exposição. Mesmo em medicamentos as vias oral e intravenosa são mais utilizadas devido a dificuldades de absorção pela pele (CHEN et al., 2018). Com relação à exposição de órgãos do sistema respiratório via inalação de dsRNAs, a anatomia complexa das vias aéreas e mecanismos de depuração pulmonar representam desafios para a absorção de dsRNAs pelas vias aéreas (THANKI et al., 2018). Nos casos abordados o uso de equipamentos de proteção individual continuarão sendo importantes para proteção dos aplicadores e outras pessoas que necessitem ter contato direto com essas formulações.

Apesar dos poucos efeitos relatados em humanos sabe-se que a entrada de dsRNAs em animais pode desencadear uma resposta imune independente de sequência (FLETCHER et al., 2020). Especula-se que a resposta imune independente da sequência de dsRNA poderia se parecer com sintomas gripais leves (MENDELSON et al., 2020).

A formulação desses produtos pode aumentar os riscos desses dsRNAs aplicados via tópica. A utilização de nanopartículas que podem proteger tais moléculas da degradação e ainda melhorar a absorção, podem contribuir para a absorção via dérmica, inalação ou mesmo ingestão desses produtos, apesar disso cada formulação deverá ser analisada caso a caso (SCHUTTER et al., 2022) a fim de investigar os casos que gerem riscos à saúde humana.

3.4.4.1 Efeitos fora do alvo

A aplicação de dsRNA tópico poderá afetar diversos organismos, como as plantas do cultivo (soja, milho, algodão, etc), abelhas polinizadoras, além de outras espécies de daninhas. Por esse motivo, análises de bioinformática para o desenho dessas moléculas é fundamental para prever e evitar efeitos fora do alvo, além do desenho do dsRNA ser direcionado para a melhor posição do gene. Contudo, um dos grandes problemas dessa abordagem é o baixo número de organismos sequenciados, onde não seria possível prever *in silico* todos os possíveis efeitos em não alvo. A bioinformática é capaz de indicar quais sequências poderiam atuar em diversos organismos não alvos, contudo a comunidade científica acredita que a bioinformática tem um valor limitado na prevenção de efeitos fora do alvo devido a variabilidade da exposição de organismos, barreiras à exposição sistêmica e diferenças na maquinaria entre organismos, desse modo ela não deve ser usada como a única ferramenta para prever efeitos em organismos não alvo (MENDELSON et al., 2020).

Outra abordagem, além da bioinformática, são os testes utilizando diversos organismos tanto animais quanto plantas. Para verificar os efeitos não alvo ainda devem estabelecidos protocolos de sensibilidade à dsRNA por espécies indicadoras. Ainda é indicado de organismos tanto insetos, microorganismos entre outras espécies com funções biológicas benéficas tenham amostras testadas quanto à exposição por dsRNAs (ROMEIS; WIDMER, 2020).

A exposição de organismos não depende apenas do alvo, mas também do método de aplicação, número de aplicações, estabilidade e persistência do dsRNA no ambiente (SCHUTTER et al., 2022). A estabilidade das moléculas de dsRNA não encapsulado no ambiente é baixa, fatores como radiação UV, temperatura, nucleases podem degradar rapidamente essas moléculas. Entretanto, dsRNAs encapsulados com nanopartículas podem ser mais estáveis no ambiente além de ter sua absorção melhorada, fatores esses que podem influenciar nos efeitos em organismos não alvo.

3.5 GENE *PHYTOENE DESATURASE (PDS)*

O gene *Phytoene desaturase (PDS)* codifica uma das enzimas mais importantes da via de biossíntese de carotenoides (QIN et al., 2007). Os carotenoides atuam como pigmentos acessórios na fotossíntese e formam unidades estruturais básicas das antenas fotossintéticas. Atuam como agentes de fotoproteção, extinguindo o oxigênio singlete que pode danificar a clorofila. E ainda são precursores de vitamin A e ácido abscísico (ABA) (QIN et al., 2007).

A via biossintética dos carotenoides inicia no citoplasma (Figura 2), onde o Geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) é enviado para três possíveis rotas: 1) formação de β -caroteno, que eventualmente leva à síntese de ABA; 2) formação de giberelinas (GAs); e 3) formação da clorofila.

A dessaturação do fitoeno é o passo mais importante da biossíntese do caroteno. A inibição da *phytoene desaturase (PDS)* resulta no acúmulo de fitoeno e paralisação da rota de produção de carotenoides. A produção insuficiente de carotenoides para garantir a fotoproteção da clorofila leva a um branqueamento do organismo. Este é o mecanismo de ação de alguns herbicidas comerciais como o Norflurazon, Fluridone e Diflufenican (BREITENBACH; ZHU; SANDMANN, 2001).

A facilidade em detectar sintomas faz do gene *PDS* um alvo amplamente utilizado em testes de conceito de vários estudos de silenciamento gênico via RNAi, VIGS ou CRISPR (CONG et al., 2010; MAHER et al., 2020; QIN et al., 2007).

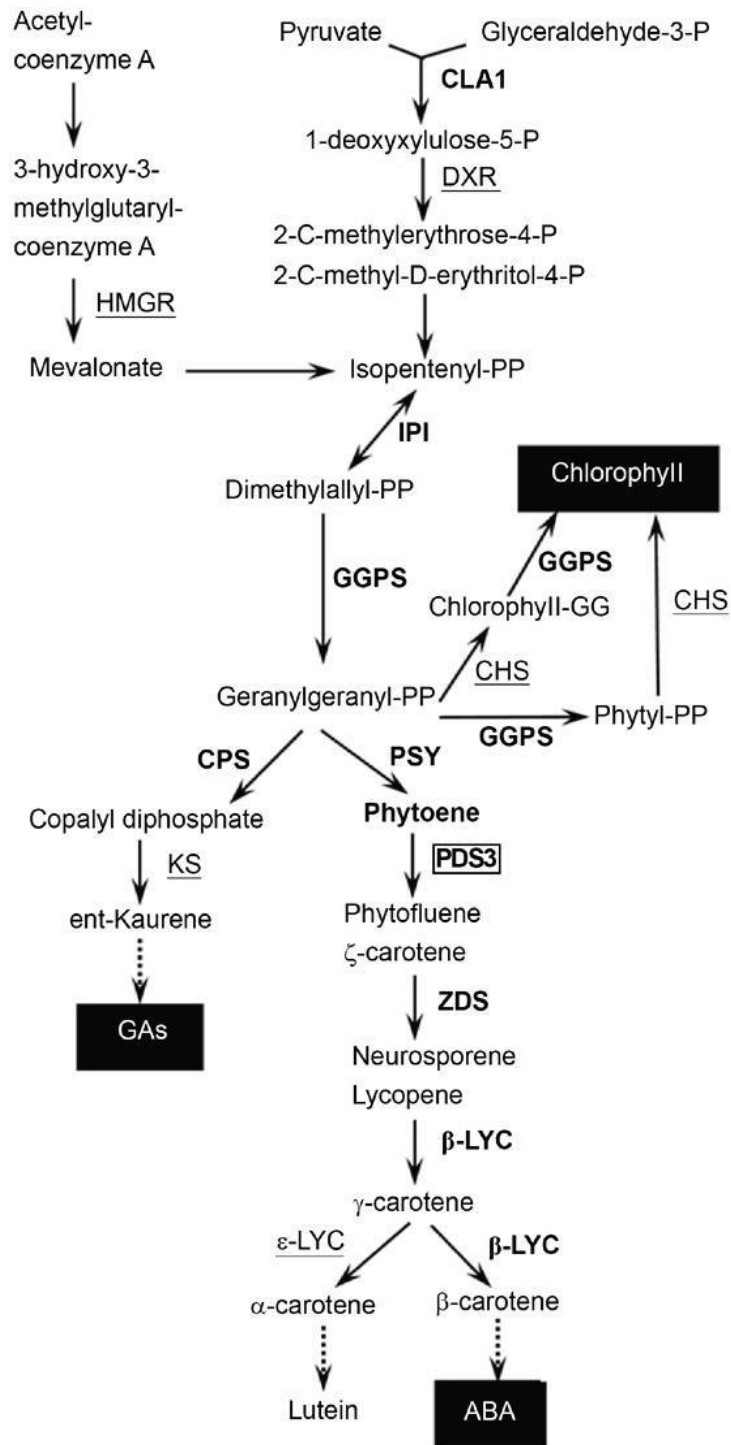


Figura 3. Via biossintética dos carotenoides. A enzima PDs promove a dessaturação do fitoeno. A via ainda está relacionada com a via de síntese de giberelinas (GAs), ácido abscísico (ABA) e clorofila. Fonte: (QIN et al., 2007)

REFERÊNCIAS

- ADEGAS, F. et al. Impacto econômico da resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil. **Circular Técnica** **132**, p. 1–12, 2017.
- ADEYINKA, O. S. et al. Advances in exogenous RNA delivery techniques for RNAi-mediated pest control. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 8, p. 6309–6319, 2020.
- AHN, S.-J. et al. 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.
- ALEXANDER, A.; HUNSCHE, M. Influence of formulation on the cuticular penetration and on spray deposit properties of manganese and zinc foliar fertilizers. **Agronomy**, v. 6, n. 3, 2016.
- AXTELL, M. J. Classification and Comparison of Small RNAs from Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 137–159, 2013.
- AZEVEDO L; CASTELANI P. **Agricultural adjuvants for crop protection**. Rio de Janeiro: Imos Gráfica Editora, 2013.
- BAO, W.; WAN, Y.; BALUŠKA, F. Nanosheets for Delivery of Biomolecules into Plant Cells. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 6, p. 445–447, 2017.
- BAULCOMBE, DA. RNA silencing in plants. **Nature**, v. 431, p. 356–363, 2004.
- BENNETT, M. et al. Barriers to Efficient Foliar Uptake of dsRNA and Molecular Barriers to dsRNA Activity in Plant Cells. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. June, p. 1–7, 2020.
- BHAT, A.; RYU, C. M. Plant Perceptions of Extracellular DNA and RNA. **Molecular Plant**, v. 9, n. 7, p. 956–958, 2016.
- BORGES, F.; MARTIENSSEN, R. A. The expanding world of small RNAs in plants. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 12, p. 727–741, 2015.
- BREITENBACH, J.; ZHU, C.; SANDMANN, G. Bleaching herbicide norflurazon inhibits phytoene desaturase by competition with the cofactors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5270–5272, 2001.
- BURAND, J. P.; HUNTER, W. B. RNAi: Future in insect management. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, n. SUPPL.1, p. 1–7, 2013.
- CHEN, H. M. et al. 22-Nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 34, p. 15269–15274, 2010.
- CHEN, X. et al. RNA interference-based therapy and its delivery systems. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 37, n. 1, p. 107–124, 2018.
- CHRISTIE, M.; CROFT, L. J.; CARROLL, B. J. Intron splicing suppresses RNA silencing in

Arabidopsis. **Plant Journal**, v. 68, n. 1, p. 159–167, 2011.

CONG, L. et al. CDNA cloning and expression analysis of wheat (*Triticum aestivum* L.) phytoene and ζ -carotene desaturase genes. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 7, p. 3351–3361, 2010.

DALAKOURAS, A. et al. Induction of silencing in plants by high-pressure spraying of In vitro-synthesized small RNAs. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1–5, 2016.

DALAKOURAS, A. et al. Genetically Modified Organism-Free RNA Interference: Exogenous Application of RNA Molecules in Plants1. **Plant Physiology**, v. 182, p. 38–50, 2019.

DALAKOURAS, A. et al. Genetically modified organism-free RNA interference: Exogenous application of RNA molecules in plants1[open]. **Plant Physiology**, v. 182, n. 1, p. 38–50, 2020.

DALAKOURAS, A.; PAPADOPOULOU, K. K. Epigenetic modifications: An unexplored facet of exogenous RNA application in plants. **Plants**, v. 9, n. 6, p. 1–9, 2020.

DAS, P. R.; SHERIF, S. M. Application of Exogenous dsRNAs-induced RNAi in Agriculture: Challenges and Triumphs. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. June, 2020.

DE CARVALHO, L. B. et al. Detection of Sourgrass (*Digitaria insularis*) Biotypes Resistant to Glyphosate in Brazil. **Weed Science**, v. 59, n. 2, p. 171–176, 2011.

DE CARVALHO, L. B. et al. Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *digitaria insularis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 615–622, 2012.

DUBELMAN, S. et al. Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–7, 2014.

DUBROVINA, A. S. et al. Induction of transgene suppression in plants via external application of synthetic dsRNA. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, 2019.

FERNÁNDEZ, V. et al. Physico-chemical properties of plant cuticles and their functional and ecological significance. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 19, p. 5293–5306, 2017.

FERNANDEZ, V.; EICHERT, T. Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: Current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 28, n. 1–2, p. 36–68, 2009.

FERREIRA, S. D.; BARBOSA, J. DE A.; CORDEIRO, N. K. Germination and Emergence of *Digitaria insularis* (L.) Fedde Susceptible and Resistant to Glyphosate. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 38, n. July 2018, p. 1–7, 2019.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* Andrew. **Nature**, v. 391, n. February, p. 806–811, 1998.

FLETCHER, S. J. et al. A Perspective on RNAi-Based Biopesticides. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. February, p. 1–10, 2020.

GAZZIERO, D. L. P. Efeitos Da Convivência Do Capim-Amargoso Na Produtividade Da Soja. **Xxvii Congresso Brasileiro Da Ciênciadass Plantas Daninhas.**, p. 345–350, 2012.

GAZZIERO, D. L. P. et al. Estimating Yield Losses in Soybean Due to Sourgrass Interference. **Planta Daninha**, v. 37, n. 0, p. 1–10, 2019.

GUAN, R. et al. Advances in the Development of Microbial Double-Stranded RNA Production Systems for Application of RNA Interference in Agricultural Pest Control. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, n. September, p. 1–7, 2021.

HEAP. **The International Herbicide-Resistant Weed Database**. Disponível em: <www.weedscience.org>. Acesso em: 20 mar. 2022.

HENDRIX, B. et al. Topically delivered 22 nt siRNAs enhance RNAi silencing of endogenous genes in two species. **Planta**, v. 254, n. 3, p. 1–16, 2021a.

HENDRIX, B. et al. Systemic gfp silencing is associated with high transgene expression in nicotiana benthamiana. **PLoS ONE**, v. 16, n. 3 March, p. 1–15, 2021b.

IPCC. **Contribuição do Grupo de Trabalho II para o Quinto Relatório de Avaliação do Painel Intergovernamental sobre Alterações Climáticas (IPCC)**. Genebra, Suíça: Organização Meteorológica Mundial (WMO), 2014.

JAUNEAU, A. et al. Anatomy of leaf apical hydathodes in four monocotyledon plants of economic and academic relevance. **PLoS ONE**, v. 15, n. 9 October, p. 1–13, 2020.

JIANG, L. et al. Systemic gene silencing in plants triggered by fluorescent nanoparticle-delivered double-stranded RNA. **Nanoscale**, v. 6, n. 17, p. 9965–9969, 2014.

KARNY, A. et al. Therapeutic nanoparticles penetrate leaves and deliver nutrients to agricultural crops. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

KHANNA, K. et al. Enthraling the impact of engineered nanoparticles on soil microbiome: A concentric approach towards environmental risks and cogitation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 222, 2021.

KISELEV, K. V. et al. Physiological conditions and dsRNA application approaches for exogenously induced RNA interference in Arabidopsis thaliana. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 1–13, 2021.

KISSMANN, K. G. **Plantas infestantes e nocivas**. 2. ed. São Paulo: BASF, 1997.

LAKSHMANAN, M. et al. Double-stranded DNA introduction into intact plants using peptide–DNA complexes. **Plant Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 39–45, 2015.

LAU, S. E. et al. dsRNA silencing of an R2R3-MYB transcription factor affects flower cell shape in a Dendrobium hybrid. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2015.

LI, H. et al. New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. **Plant Cell and Environment**, v. 38, n. 11, p. 2277–2285, 2015.

LIU, Q.; WANG, F.; AXTELL, M. J. Analysis of complementarity requirements for plant

- MicroRNA targeting using a *Nicotiana benthamiana* quantitative transient assay. **Plant Cell**, v. 26, n. 2, p. 741–753, 2014.
- LOPEZ OVEJERO, R. F. et al. Frequency and Dispersal of Glyphosate-Resistant Sourgrass (*Digitaria insularis*) Populations across Brazilian Agricultural Production Areas. **Weed Science**, v. 65, n. 2, p. 285–294, 2017.
- MACHADO, A. F. L. et al. Análise de crescimento de *Digitaria insularis*. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 641–647, 2006.
- MACHADO, A. F. L. et al. CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DE FOLHA, COLMO E RIZOMA DE *Digitaria insularis*. **Planta Daninha**, v. 26, n. 1, p. 1–8, 2008.
- MAHER, M. F. et al. Plant gene editing through de novo induction of meristems. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 84–89, 2020.
- MAXWELL, B. et al. **Enabling the RNA revolution, Cell-free dsRNA production and control of Colorado potato beetle.** Disponível em: <<http://www.globalengage.co.uk/pgc/docs/PosterMaxwell.pdf>>. Acesso em: 1 mar. 2022.
- MENDELSON, M. L. et al. Summary of Discussions From the 2019 OECD Conference on RNAi Based Pesticides. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. May, p. 1–6, 2020.
- MITTER, N. et al. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. **Nature Plants**, v. 3, n. January, 2017.
- NAJAH-MISSAOUI, W.; ARNOLD, R. D.; CUMMINGS, B. S. Safe nanoparticles: Are we there yet? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 1–22, 2021.
- NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-suppression of Homologous Genes in trans. **The Plant Cell**, v. 2, n. 4, p. 279–289, 1990.
- NUMATA, K. et al. Local gene silencing in plants via synthetic dsRNA and carrier peptide. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 8, p. 1027–1034, 2014.
- PAPIĆ, L. et al. Double-stranded RNA production and the kinetics of recombinant *Escherichia coli* HT115 in fed-batch culture. **Biotechnology Reports**, v. 20, p. 10–13, 2018.
- PARISI, C.; VIGANI, M.; RODRÍGUEZ-CEREZO, E. Agricultural nanotechnologies: What are the current possibilities? **Nano Today**, v. 10, n. 2, p. 124–127, 2015.
- PARKER, K. M. et al. Environmental Fate of RNA Interference Pesticides: Adsorption and Degradation of Double-Stranded RNA Molecules in Agricultural Soils. **Environmental Science and Technology**, v. 53, n. 6, p. 3027–3036, 2019.
- PEPPER, J. T. et al. Tetrabutylphosphonium bromide reduces size and polydispersity index of Tat2:siRNA nano-complexes for triticale RNAi. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 4, n. MAY, p. 1–11, 2017.
- QIN, G. et al. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. **Cell**

Research, v. 17, n. 5, p. 471–482, 2007.

RAJPUT, V. et al. Accumulation of nanoparticles in the soil-plant systems and their effects on human health. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 65, n. 2, p. 137–143, 2020.

RODRIGUES, T. B. et al. First Sprayable Double-Stranded RNA-Based Biopesticide Product Targets Proteasome Subunit Beta Type-5 in Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. November, p. 1:15, 2021.

RODRIGUES, T. B.; PETRICK, J. S. Safety Considerations for Humans and Other Vertebrates Regarding Agricultural Uses of Externally Applied RNA Molecules. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. April, p. 1–12, 2020.

ROMANO, N.; MACINO, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 22, p. 3343–3353, 1992.

ROMEIS, J.; WIDMER, F. Assessing the Risks of Topically Applied dsRNA-Based Products to Non-target Arthropods. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. June, p. 1–11, 2020.

SAMMONS, R. D. et al. **polynucleotide molecules for gene regulation in plants** **Nature Protocols** St. US 2014/0018241 A1. Depositante: Monsanto Technology LLC. Deposito: 08/03/2011. Concessão: 16/01/2014.

SANAN-MISHRA, N. et al. Secondary siRNAs in Plants: Biosynthesis, Various Functions, and Applications in Virology. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. March, p. 1–32, 2021.

SCHUTTER, K. DE et al. RNAi-Based Biocontrol Products : Market Status , Regulatory Aspects , and Risk Assessment. **Frontiers in Insect Science**, v. 1, p. 1–9, 2022.

SCHWARTZ, S. H. et al. Carbon Dots for Efficient Small Interfering RNA Delivery and Gene Silencing in Plants. **Plant Physiology**, v. 184, n. October, p. 647–657, 2020.

SINGH, S. Guttation : path , principles and functions. **Australian Journal of Botany**, v. 61, p. 497–515, 2013.

TAI, W.; GAO, X. Functional peptides for siRNA delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 110–111, p. 157–168, 2017.

TAKANO, H. K. et al. Spread of glyphosate-resistant sourgrass (*Digitaria insularis*): Independent selections or merely propagule dissemination? **Weed Biology and Management**, v. 18, n. 1, p. 50–59, 2018.

TANING, C. N. T. et al. RNA-based biocontrol compounds: current status and perspectives to reach the market. **Pest Management Science**, v. 76, n. 3, p. 841–845, 2020.

TENLLADO, F. et al. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. **BMC Biotechnology**, v. 11, p. 1–11, 2003.

THANKI, K. et al. Formulation of RNA interference-based drugs for pulmonary delivery: Challenges and opportunities. **Therapeutic Delivery**, v. 9, n. 10, p. 731–749, 2018.

USLU, V. . et al. High-pressure sprayed siRNAs influence the efficiency but not the profile of transitive silencing. **Plant J .**, p. 1–26, 2021.

USLU, V. V. et al. High-Pressure-Sprayed Double Stranded RNA Does Not Induce RNA Interference of a Reporter Gene. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. December, p. 1–9, 2020.

VOLOUDAKIS, A. E. et al. Efficient double-stranded rna production methods for utilization in plant virus control. **Methods in Molecular Biology**, v. 1236, p. 255–274, 2015.

WANG, C. J.; LIU, Z. Q. Foliar uptake of pesticides-Present status and future challenge. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 87, n. 1, p. 1–8, 2007.

WANG, Z. et al. Rigid nanoparticle-based delivery of anti-cancer siRNA : Challenges and opportunities. **Biotechnology Advances**, 2013.

WESTWOOD, J. H. et al. Weed Management in 2050: Perspectives on the Future of Weed Science. **Weed Science**, v. 66, n. 3, p. 275–285, 2018.

WU, H. et al. Plant 22-nt siRNAs mediate translational repression and stress adaptation. **Nature**, v. 581, n. 7806, p. 89–93, 2020.

YAN, S.; REN, B. Y.; SHEN, J. Nanoparticle-mediated double-stranded RNA delivery system: A promising approach for sustainable pest management. **Insect Science**, v. 28, n. 1, p. 21–34, 2021.

YANG, Z.; LI, Y. Dissection of RNAi-based antiviral immunity in plants. **Current Opinion in Virology**, v. 32, n. Figure 1, p. 88–99, 2018.

ZHANG, H. et al. DNA nanostructures coordinate gene silencing in mature plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 15, p. 7543–7548, 2019.

ZOTTI, M. et al. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. **Pest Management Science**, v. 74, n. 6, p. 1239–1250, 2018.

4. PRODUÇÃO DE dsRNA EM BACTÉRIA *E. coli* HT115 (DE3)

Resumo: RNA interferente (RNAi) é um mecanismo de defesa contra ataques virais presente em eucariotos. Desencadeado por fitas duplas de RNA (dsRNA), que mediam o mecanismo, pode ser utilizado para o controle de patógenos, pragas ou plantas daninhas. O objetivo desse trabalho foi otimizar condições para produção de dsRNAs de boa qualidade e pureza. Foram testados dois vetores: L4440 e New-vector. O vetor New-vector foi eficiente na produção de dsRNAs. Por apresentar dois terminadores T7 não houve a formação de bandas acima do tamanho esperado. Já o vetor L4440, onde a T7 polimerase segue a transcrição na região à jusante da formação do dsRNA alvo, ocorre a formação de diversas bandas não específicas. O rendimento de dsRNAs foi maior utilizando Trizol na extração (3,9 µg/mL). Contudo, na extração etanólica apesar do menor rendimento (2,5 µg/mL), os dsRNAs extraídos apresentaram melhor qualidade. O indutor alternativo aliado ao sistema HT115/L4440 produziu 5,6µg/mL, 42% a mais do que com a indução por IPTG (3,9 µg/mL). Apesar disso, a quantificação dos dsRNAs pode estar superestimada devido ao método de quantificação, espectrofotometria, que faz a leitura de outras moléculas além do dsRNA de tamanho esperado. Desse modo, considerando a qualidade dos dsRNAs gerados as condições mais adequadas são o sistema HT115/New-vector sob indução do indutor alternativo, seguido da primeira extração por etanol. As otimizações realizadas nesse trabalho contribuirão para a produção de dsRNAs de boa qualidade, contudo outras estratégias na extração dos dsRNAs podem aumentar o rendimento.

Palavras-chave: RNA interferente; fita dupla de RNA; IPTG; extração de dsRNA

4.1. INTRODUÇÃO

RNAi é um sistema de defesa presente em células eucariontes descoberto por Fire e colaboradores (1998). Esse mecanismo é desencadeado pela entrada de moléculas de 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 (BAULCOMBE, 2004; DALAKOURAS et al., 2019).

Na agricultura, o uso de dsRNAs pode ser empregado no controle de insetos, nematoides, vírus e plantas daninhas. Contudo, um dos gargalos no desenvolvimento de pesticidas baseados em RNAi é a produção com qualidade dessas moléculas. A produção da molécula do dsRNA pode ser realizada utilizando transcrição *in vitro* por meio de kits comerciais ou *in vivo* utilizando bactérias ou leveduras em fermentações líquidas (DAS; SHERIF, 2020; VOLOUDAKIS et al., 2015). A produção de dsRNA utilizando kits comerciais tem custo elevado e baixo rendimento enquanto que a produção *in vivo* permite uma produção em larga escala e de baixo custo.

Diversos sistemas podem ser utilizados para a produção *in vivo* de dsRNAs como *Saccharomyces cerevisiae*, *Corynebacterium glutamicum*, *E. coli* entre outros (AHN et al., 2019; GUAN et al., 2021; HASHIRO et al., 2021). A cepa de *E. coli* HT115 (DE3) possui uma ribonuclease III suprimida, permitindo que haja o acúmulo de moléculas de dsRNA no citoplasma da célula (LISA TIMMONS; ANDREW FIRE, 1998). Já o plasmídeo de expressão L4440, primeiramente utilizado para experimentos com *Caenorhabditis elegans*, aliado à HT115 se tornou um dos sistemas de expressão mais utilizados para a produção de dsRNAs em laboratório (HASHIRO; YASUEDA, 2022; TIMMONS; COURT; FIRE, 2001).

No processo de produção de dsRNA a indução da expressão pela adição de indutor é fundamental para a produção das moléculas de dsRNA. A cepa de *E. coli* HT115 (DE3) possui o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor lacUV5 induzível (VOLOUDAKIS et al., 2015). A transcrição do promotor lac é regulado pelo repressor lac (DONOVAN; ROBINSON; GLICK, 1996). Na ausência de indutor, IPTG por exemplo, o repressor permanece ligado à região operadora e inibe a ligação da RNA polimerase à região do promotor lacUV5, de modo que a transcrição da T7 RNA polimerase não ocorre. Contudo, quando o indutor entra na célula este se liga à proteína repressora, que sofre uma mudança conformacional e têm sua afinidade pelo operador reduzida, desse modo a expressão da T7 RNA polimerase é induzida. A T7 RNA polimerase então se liga ao promotor T7, presente no vetor de expressão, e passa a transcrever as sequências à jusante, em RNA. O resultado são duas fitas de RNA complementares sintetizadas, que por sua vez formam o dsRNA alvo (GUAN et al., 2021; VOLOUDAKIS et al., 2015).

Uma das grandes vantagens de utilizar o IPTG na indução de promotores Lac é devido a este não ser metabolizado pela célula, além disso se difundir pela membrana plasmática independentemente de permeases. Isso garante que o nível de indução seja constante após a adição de IPTG ao meio de crescimento (DONOVAN; ROBINSON; GLICK, 1996).

Contudo, a presença de IPTG no meio pode levar a um estresse metabólico, além de ser um reagente tóxico e caro, e outros indutores que sejam também eficientes, de menor custo e atóxicos são necessários para melhorar o processo (DELGADO-MARTÍN; VELASCO, 2021).

No processo de produção de dsRNA em bactérias o dsRNA produzido é mantido dentro da célula bacteriana, assim são necessários processos de extração para obter essas moléculas puras. Os processos de extração de dsRNAs envolvem diversas etapas, a primeira delas é a lise, para liberação do conteúdo citoplasmático. A lise das células pode ser realizada por ultra-som, enzimas, alta temperatura, além de detergentes, tais abordagens podem ser utilizadas sozinhas ou em conjunto para aumentar a lise bacteriana (AHN et al., 2019; ONGVARRASOPONE; ROSHORM; PANYIM, 2007; POSIRI; ONGVARRASOPONE; PANYIM, 2013). Após a lise, os ácidos nucleicos presentes no citosol são liberados, gerando um extrato cru. Então, podem ser utilizados métodos apropriados para a extração de RNAs, como Trizol (ONGVARRASOPONE; ROSHORM; PANYIM, 2007), Fenol:Clorofórmio:Isoamílico (25:24:1) (AHN et al., 2019) ou etanólica (GARCÍA et al., 2015; POSIRI; ONGVARRASOPONE; PANYIM, 2013), podem ser utilizados a fim de obter dsRNAs com alto grau de pureza.

Pureza, qualidade e quantidade de dsRNA são fatores que podem impactar futuramente no desenvolvimento de produtos baseados em RNAi, por esse motivo, nesse trabalho o objetivo principal foi avaliar protocolos de extração que garantam pureza e qualidade, além de testar um novo indutor de baixo custo responsável pelo aumento da produtividade.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Clonagem das Sequências *PDS*

Os testes de produção de dsRNA foram realizados utilizando dois vetores: L4440 e New-Vector. O vetor de expressão L4440 (plasmídeo #1654, Addgene, Watertown, MA, USA) contém dois promotores T7 em orientações invertidas flanqueando uma região de Múltiplos Sítios de Clonagem (MSC) (LISA TIMMONS; ANDREW FIRE, 1998). Além dele, um novo vetor, denominado New-vector, onde foi inserido dois promotores T7

flanqueando a região MSC e ainda acrescentado dois terminadores T7 após cada um dos promotores T7, a síntese foi realizada pela empresa Epoch Life Science.

Um fragmento específico de dsRNA de 309 pb do gene *PDS* de capim-amargoso foi escolhido para ser clonado nos vetores (ver item 5.2.3). Para realizar as ligações nos vetores foram desenhados primers (Tabela 1). Aos *primers* destinados à amplificação das sequências PDS e clonagem no vetor L4440 foram adicionadas as sequências de reconhecimento pelas enzimas *Bgl II* e *XhoI*, e para o vetor New-vector as sequências para reconhecimento pelas enzimas *Age I* e *Sal I*. Foi realizada a amplificação por PCR em volume final de 50µl, contendo 1,5 mM de MgSO₄, 400 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada *primer*, e 1,5U de Taq RNA polimerase em tampão 60 mM Tris-SO₄ (pH 8,9) e 180 mM (NH₄)₂SO₄, como *template* foi utilizado cDNA de capim-amargoso. A reação ocorreu com a seguinte ciclagem: 5 min a 95 °C seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 58 °C, 30 s a 68 °C, finalizando com um ciclo de 7 min a 68 °C. Aliquotas de 5uL dos produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%.

Tabela 1: *Primers* utilizados nas clonagens da sequência de PDS nos vetores L4440 e New Vector

Vetor		Sequência 5'-3'	TA (°C)	Amplicon (pb)
New_vector	F	<u>ACCGGT</u> GTTC AATGTTGGAGTTGGTC	58	309pb
	R	CAGCTGGCTTCCCAGATAA TACTGCA	58	
L4440	F	<u>CTCGAGG</u> TTCAATGTTGGAGTTGGTC	58	309pb
	R	TCTAGAGCTTCCCAGATAA TACTGCA	58	

TA: temperatura de anelamento; Sublinhado: sítio das enzimas de restrição.

Após a verificação de amplificação de banda única no gel de agarose os produtos de amplificação foram purificados utilizando o kit Wizzard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), segundo as instruções do fabricante. Para a clonagem os produtos de PCR e os vetores foram digeridos com as enzimas *Bgl II* e *XhoI* para ligação em L4440 e as enzimas *AgeI* e *Sal I* para ligação no New-Vector.

Após a digestão alvos e vetores foram ligados a partir de uma reação contendo 1:5 (vetor:inserto) utilizando a enzima T4 DNA ligase. A ligação foi realizada segundo as recomendações do fabricante e mantida a 4°C por 16 horas. Em seguida, todo o volume da reação de ligação foi utilizado para a transformação de células de *E. coli* DH5α, via choque térmico. Após transformadas as células bacterianas foram inoculadas em placas com meio LB

sólido contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37 °C por 16 h. Colônias recombinantes foram identificadas através de reação de PCR com os *primers* específicos supra citados. Posteriormente, as colônias selecionadas foram inoculadas em meio de cultura LB líquido contendo ampicilina (100 µg/mL), incubado a 37°C sob agitação de 180 rpm por 16 h, em seguida foi realizado miniprep para obtenção do DNA plasmidial utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep (Quiagen) seguindo as recomendações do fabricante. O DNA plasmidial obtido foi sequenciado para confirmação da inserção da sequência do gene *PDS* e posteriormente utilizado na clonagem em *E. coli* HT115 (DE3) para produção do dsRNA. As colônias recombinantes foram armazenadas a -80 °C em meio LB com ampicilina (100 µg/mL) e 25% de glicerol.

4.2.2 Transformação em Bactérias *E. coli* HT115 (DE3) via Choque Térmico

A cepa de *E. coli* HT115 (DE3) foi utilizada para a produção de dsRNA, uma vez que, sua atividade de RNase III está suprimida, desse modo permitindo o acúmulo de dsRNA dentro da célula sem que ocorra degradação. A bactéria *E. coli* HT115 também possui o gene que codifica a enzima T7 RNA polimerase que está sob o controle de um promotor induzível por IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida).

Células termocompetentes de *E. coli* HT115 (DE3) foram preparadas de acordo com o protocolo descrito por Green e Sambrook, 2018. Para cada vetor de produção de dsRNA (L4440 e New-Vector) foi preparado uma mistura contendo 100 uL de suspensão de células competentes de *E. coli* HT115 e 3µl de DNA plasmidial que foram incubados no gelo por 30 min. Em seguida, os tubos foram transferidos para banho-maria a 42 °C e incubados por 1min e 30s. Passado esse tempo, os tubos, foram rapidamente colocados em banho de gelo por 2 min e então adicionado 800 µl de meio LB. Os tubos foram então incubados por 1h30min a 37 °C sob agitação de 180 rpm. A suspensão foi plaqueada em meio LB sólido contendo os antibióticos tetraciclina (12,5 µg/mL) e ampicilina (100 µg/mL). As colônias recombinantes foram confirmadas por PCR com primers específico para o gene *PDS* nas mesmas condições descritas no item 4.2.1.

4.2.3 Produção de dsRNA

A partir de colônias isoladas da bactéria *E. coli* HT115 transformada com os vetores estudados (L4440 e New-Vector), 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.

Diferentes ensaios foram conduzidos para avaliação da produção de dsRNA, todos em meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina incubados a 37 °C com agitação de 180 rpm. Foram inoculados 4 mL de cada pré-inóculo em 200 mL de meio LB para os ensaios de métodos de extração de dsRNA, e 1mL em 80 mL de meio LB para os ensaios de indutores de expressão. Ao atingir a OD_{600 nm} de 0,4 iniciou-se a indução da expressão por adição dos indutores: IPTG 0,4 mM (padrão) ou indutor alternativo 14mM. Após o início da indução os frascos foram 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 – 20° C até o momento da extração.

4.2.4 Extração de dsRNA

O protocolo de extração de dsRNA é composto por 3 etapas: i) Primeira extração; ii) Tratamento com DNase e RNaseA e iii) Purificação (ou segunda extração). Para os ensaios com indutor alternativo e IPTG o protocolo adotado foi: Primeira extração com Trizol, Tratamento com turbo DNase e RNase e Purificação com fenol:clorofórmio:isoamílico.

4.2.4.1 Protocolo de Extração de dsRNA por Trizol

Os *pellet* de bactérias foram dissolvidos em 800 µl de SDS 0,1% em tampão PBS 1X e os tubos transferidos para banho maria a 100 °C por 2 min. Em seguida, foram adicionados 800 µl de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), e incubados à temperatura ambiente por 5 min. Em seguida foi adicionado 200 µL de clorofórmio e incubado novamente à temperatura ambiente por 2 min, seguido de centrifugação a 12.000 xg por 10 min. O sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo e adicionado 0,7 volume de isopropanol, incubado à temperatura ambiente por 10 min e centrifugado novamente a 12.000 xg por 10 min. Após

esses procedimentos seguiram-se duas lavagens com etanol 75%, e o *pellet* foi então seco completamente e ressuspenso em 180 µL água livre de nucleases.

4.2.4.2 Protocolo de Extração Alcoólica de dsRNA

O outro protocolo utilizado para primeira extração consiste na extração alcoólica descrito por Porisi e colaboradores (2013) com adaptações da autora. O *pellet* de bactérias foi ressuspenso em solução de etanol 70% com PBS 1X e incubado a 4 °C por 5 min, e então centrifugado a 10.000 xg por 10 min a 4 °C. O novo *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de NaCl 150 mM e incubado a 4 °C por 1h e então repetida a centrifugação. O sobrenadante foi recolhido e adicionado 1 volume de isopropanol e incubado a temperatura ambiente por 10 min, após foi centrifugado a 12.000 xg por 10 min. Então, o *pellet* contendo os ácidos nucleicos foi lavado em etanol 70%, seco e ressuspenso 180 µL de água livre de nucleases.

4.2.5 Tratamento com DNase e RNase

Após extração dos dsRNAs, as amostras foram submetidas ao tratamento com TURBO™ DNase (Ambion) e RNase A (Invitrogen) para remoção de DNA e RNA de fita simples, como descrito por Ahn et al., (2019). Os dsRNAs oriundos das extrações com os métodos Trizol ou Etanol foram diluídos em 180 µL de água e tratadas com 2 µL de turbo DNase e 20 µL de RNase A e incubadas por 1 h a 37 °C. Após o tratamento foi realizada a etapa de purificação.

4.2.6 Purificação de dsRNA ou Segunda Extração

Após o tratamento com DNase e RNase seguiu-se a purificação das amostras segundo protocolo de Ahn et al., (2019). Em cada uma das amostras foi adicionado 200 µL de fenol:clorofórmio:isoamílico (25:24:1), e após agitação vigorosa seguiu-se a centrifugação a 12.000 xg por 15 min. A fase superior foi transferida para outro tubo e então adicionado 100 µL de NH₄OAc (7,5M) e 100 µL de isopropanol, seguido por nova centrifugação a 12.000 xg por 45 min a 4°C. Após seguiu-se duas lavagens com etanol 70% e centrifugação a 12.000 xg por 10 min. O *pellet* foi seco e ressuspenso em água livre de nucleases.

As amostras foram quantificadas em Nanodrop e sua qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.2.7 Análise Estatística

Os dados obtidos da comparação entre protocolos de extração foram analisados pelo Teste T de Student com $\alpha < 0.05$, utilizando o software Microsoft Excel. Os dados dos experimentos de indutor e vetor foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA), seguida do Teste de Tukey com $\alpha < 0.05$, além disso a interação entre vetor e indutor foi testada. Os gráficos foram plotados utilizando Microsoft Excel.

4.3 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 pesticidas (AHN et al., 2019). No caso de fermentação líquida o vetor de expressão, a extração e purificação e também o indutor de expressão, se otimizados para maior eficiência e qualidade podem tornar mais acessível a técnica para utilização na agricultura.

Os vetores utilizados nesse trabalho, L4440 e New-Vector, podem ser utilizados para a produção de sequências dsRNA em *E. coli HT115*. Os dois vetores foram construídos com sucesso, e nesse trabalho ambos, receberam a inserção da sequência de 309 pb do gene *Phytoene desaturase (PDS)* de capim-amargoso. O produto da restrição do vetor L4440 com as endonucleases *Bgl II* e *XhoI*, e do vetor New-Vector com as endonucleases *AgeI* e *Sal I*, resultaram na adição de 32 e 116 pb à sequência de dsRNA gerada. Essa geração de moléculas de dsRNAs com tamanho superior ao alvo é esperada devido à região de Sítio de Múltiplas Clonagens (195 pb em L4440 e 197 pb em New-Vector), a adição de bases à sequência de dsRNA pode representar um risco à formação de efeitos fora do alvo, por isso, é recomendado que as enzimas escolhidas para clonagem no vetor sejam próximas ao promotor T7.

A cepa *E. coli HT115* transformada com ambos vetores, obteve um crescimento satisfatório, e respondeu com boa produção de moléculas de dsRNA após a indução de IPTG a 0,4 mM e do indutor alternativo a 14mM. Esse resultado indica que o vetor New-Vector, foi eficientemente ativado e proporcionou a produção de moléculas de dsRNA, demonstrando

que o desenho foi satisfatório para a produção de dsRNAs. O vetor New-Vector foi desenhado com a adição de dois terminadores após o promotor T7 para induzir a parada da transcrição pela T7 polimerase. O mesmo não ocorre no vetor L4440, que não possui terminadores após o promotor, como demonstrado na figura 1. É necessário salientar ainda que devido à ausência do terminador, o vetor L4440, produz tamanhos de dsRNAs maiores que o tamanho de fragmento esperado de 341 pb (Figura 2a). Embora o vetor New-Vector tenha sido desenhado com dois terminadores seu desempenho não foi superior, quantitativamente, comparado ao L4440 (Figura 4a).

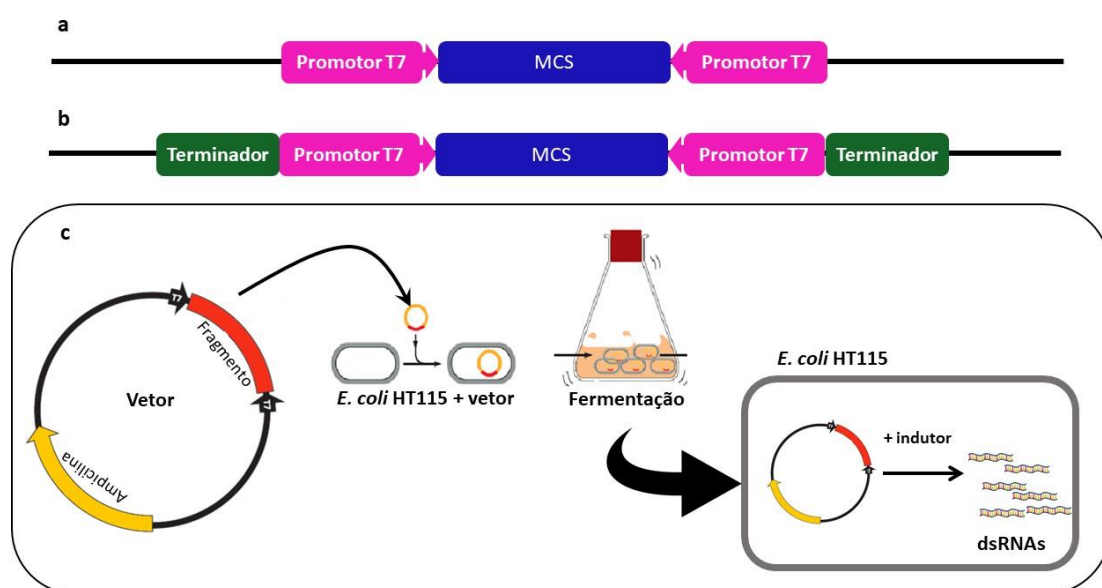


Figura 1. Vetores de expressão e produção de dsRNA em *E. coli* HT115. a) Esquema do vetor L4440 apresentando a região de múltiplas clonagens e promotores T7 bidirecionais. b) Esquema do vetor New-Vector que apresenta, além da região de múltiplas clonagens e promotores T7, terminadores em duas direções. c) Produção de dsRNA em células de *E. coli* HT115. *MCS= *Multiple Cloning Site* (Sítio de Múltiplas Clonagens).

Outro ponto que ainda necessita ser elucidado é a formação de bandas de tamanho abaixo do esperado. Fato esse que poderia estar relacionado a uma parada precoce na transcrição. A interrupção precoce da transcrição tanto pode ser justificada pela presença de fatores que induzem a interrupção precoce da transcrição, em procariontes os fatores Rho (HENKIN, 1996). Os fatores Rho reconhecem regiões específicas na fita que está sendo transcrita e paralisam a transcrição. Outra forma que pode estar atrelada a parada precoce da transcrição pela formação de *hairpins* em regiões ricas em G-C, que são reconhecidos pela T7 polimerase, interrompendo precocemente a transcrição e em ambos os casos gerando moléculas de dsRNA menores do que do tamanho esperado (HENKIN, 1996). A transcrição

incompleta ou interrompida também foi relatada por DELGADO-MARTÍN e VELASCO (2021) utilizando tanto vetores tanto com o promotor T7 quando um promotor constitutivo proD, em *E. coli* HT115. Desse modo, ainda são necessárias algumas otimizações no sistema HT115-vetor e na análise das sequências alvo, para alcançar alta produtividade e bandas únicas de dsRNA.

A extração e purificação de dsRNAs são cruciais para a aplicação da técnica de RNAi nos organismos alvo. Embora extratos gerados após fermentação líquida de bactérias produtoras de dsRNA seja utilizado e tenha eficácia no silenciamento gênico via RNAi contra vírus e também em plantas (LAU et al., 2015; TENLLADO et al., 2003), dsRNAs puros são mais indicados nas formulações de produtos comerciais.

Nesse trabalho, a extração de dsRNAs puros foi dividida em três etapas: 1) Primeira Extração; 2) Tratamento com DNase e RNase; 3) Purificação ou Segunda Extração. Na Primeira Extração foram testados dois protocolos de extração descritos na literatura: Extração com Trizol (ONGVARRASOPONE; ROSHORM; PANYIM, 2007) e Extração etanólica (GARCÍA et al., 2015; POSIRI; ONGVARRASOPONE; PANYIM, 2013) com adaptações da autora. Após as diferentes extrações o protocolo foi seguido de Tratamento com DNase e RNase e Purificação com Fenol:Clorofômio:Isoamílico (25:24:1). Na figura 2, pode-se observar o padrão de bandas formadas nos dois métodos de extração avaliados (Trizol e Etanol), onde RNAs fita simples ou mesmo DNA diferentes do dsRNA de interesse (340 pb) apresentaram bandas com brilho menos intenso, ou seja, com menos ácidos nucleicos na extração com Etanol.

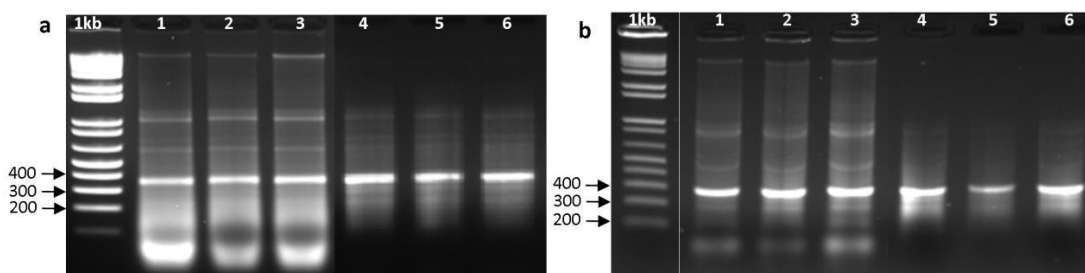


Figura 2. Gel de agarose após extração de dsRNA a partir da fermentação líquida em sistema HT115-L4440 a) Extração de dsRNA com o reagente Trizol. b) Extração de dsRNA com Etanol. a,b) Os poços 1-3 são amostras após a primeira extração. Os poços de 4-6 são de amostras após o tratamento com DNase e RNase e Purificação ou Segunda Extração.

A Primeira Extração Etanólica, seguida de tratamento com DNase e RNase e purificação, através do gel de agarose revelou que menos dsRNAs de tamanhos diferentes ao dsRNA alvo (341 pb) são extraídos comparado à extração por Trizol. Embora, após a

quantificação os valores encontrados foram superiores com a Primeira Extração por Trizol, como demonstrado na figura 3, o método empregado para quantificação foi a espectrofotometria, que possui a característica de quantificar todas as moléculas presentes no comprimento de onda selecionado (260 nm). Assim, considerando que no método de extração por Trizol é possível observar a presença de mais bandas além do dsRNA alvo de 341 pb, esse valor absoluto pode não corresponder a quantificação absoluta do dsRNA alvo. Nesse caso, a extração com Trizol está extraíndo ácidos nucleicos além dos dsRNAs de tamanho esperado, o que prejudica a qualidade do dsRNA extraído e purificado.

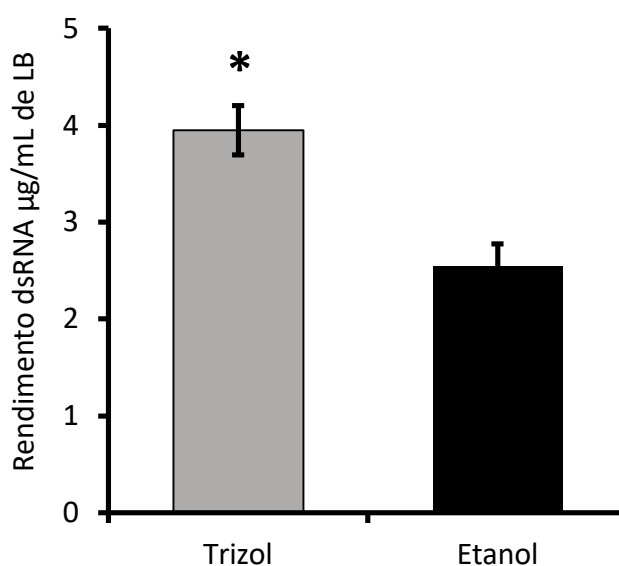


Figura 3. Rendimento de dsRNA após extração com os métodos de extração utilizando Trizol e Etanol. * indica diferença significativa pelo Teste T de Student, $\alpha < 0.05$

A primeira extração com Etanol, a partir da análise do gel de agarose, possibilitou a extração de dsRNAs de melhor qualidade e especificidade. Nessa extração o primeiro passo é a desestabilização da membrana e parede celular. O etanol é uma molécula anfipática capaz de interagir com a bicamada lipídica das membranas celulares, nessa interação ocorre a interrupção das interações hidrofóbicas entre as proteínas presentes na membrana e além da interligação do peptidoglicano, essas alterações levam a um aumento da fluidez da membrana (POSIRI; ONGVARRASOPONE; PANYIM, 2013). Desse modo, o dsRNA presente no citoplasma da célula deve migrar para fora das células bacterianas pelos poros gerados a partir do contato com etanol, e com auxílio do tampão e NaCl ocorre a solubilização das moléculas de dsRNA.

AHN et al., (2019) obteve uma produção de 19,5 µg/mL utilizando extração com Fenol e lise das células com ultrassom. Outros sistemas incrementaram a produção de dsRNA, como o pET28-BL21 (DE3) RNase III (4,23 µg/mL), que produziu três vezes mais que usando L4440-HT115 (DE3) (1,30 µg/mL), utilizando extração com Etanol (POSIRI; ONGVARRASOPONE; PANYIM, 2013), tratamento com DNase e RNase, e uma purificação com MEGAclean™ Kit (Thermo Fisher Scientific), apesar disso, esse valor é próximo aos encontrados nesse trabalho, para extração com Fenol (MA et al., 2020). Desse modo, a Primeira Extração utilizando Etanol pode diminuir os custos de produção de dsRNA. No processo ainda podem ser otimizadas as etapas de Tratamento com DNase e RNase e Purificação do dsRNA que pode levar a um decréscimo de custos na produção de dsRNA em laboratório

Outro fator importante na otimização da produção de dsRNAs é a escolha do indutor de expressão. A escolha do indutor mais adequado para o sistema de expressão deve levar em consideração alguns fatores, como, aptidão para a indução, toxicidade, custo do indutor, entre outros (LOPES et al., 2019). Deve ser ainda levado em consideração a quantidade de indutor a ser utilizada, já que IPTG, pode ser utilizado em baixas concentrações, e outros indutores biodegradáveis devem ser utilizados em altas concentrações, nesse caso deve-se avaliar a relação de custo-benefício. Nesse estudo foi utilizado um indutor de baixo custo, atóxico e biodegradável que têm potencial para substituir o uso de IPTG em um processo industrial de produção de dsRNA.

O rendimento de dsRNA utilizando o indutor alternativo aumentou em 42% a produção de dsRNA comparado ao IPTG, utilizando o vetor L4440. O vetor L4440 produziu em média 5,6µg/mL de dsRNA sob indução do indutor alternativo (I.A.), já com a indução por IPTG a produção de dsRNA foi em média 3,8 µg/mL de dsRNA (Figura 4). A produção de dsRNA foi menor utilizando o vetor New-vector, com o indutor alternativo, a produção de dsRNA foi em torno de 3,5 µg/mL, enquanto que sob a indução de IPTG, o rendimento foi de 3,3 µg/mL (Figura 4). A análise de interação revelou que existe uma interação positiva entre o vetor L4440 e o indutor alternativo, influenciando na produção elevada de dsRNAs. Com a indução por IPTG não houve diferença entre os vetores L4440 e New-vector, deixando claro que o uso do vetor L4440 aliado ao indutor alternativo gera um incremento significativo na produtividade de dsRNAs em *E. coli* HT115. Contudo, os mecanismos envolvidos nesse incremento no rendimento ainda não foram elucidados, possivelmente a quantificação de

bandas inespecíficas como apresentado na Figura 4b pode estar superestimando a quantificação dos dsRNAs extraídos do tratamento HT115-L4440 mais indutor alternativo.

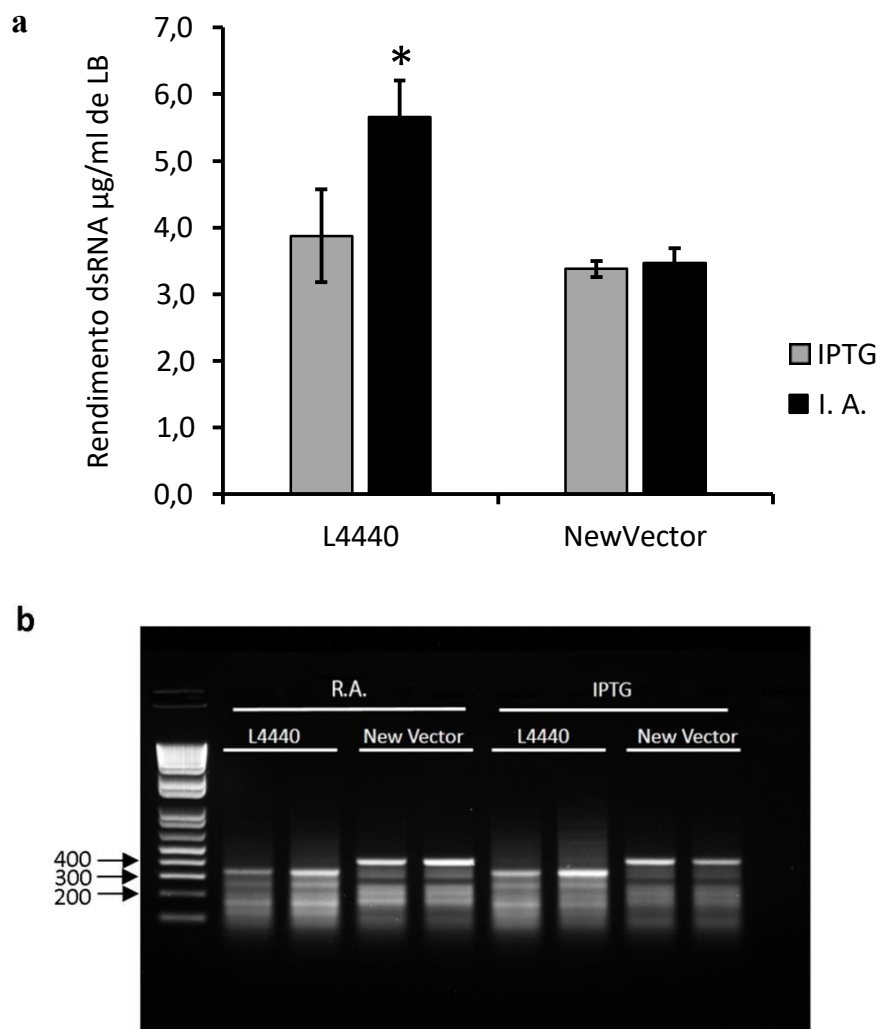


Figura 4. Indutores de expressão para produção de dsRNA em *E. coli* HT115 (DE3). a) Rendimento da produção de dsRNA utilizando IPTG e um indutor alternativo. b) Gel de agarose mostrando o padrão de bandas após a purificação dos dsRNAs. * indica diferença significativa pelo Teste Tukey, $\alpha < 0.05$

Vários tipos de indutores podem substituir o uso de IPTG na indústria e garantir uma produção eficiente de moléculas recombinantes. Em substituição ao uso de IPTG na produção heteróloga de proteínas o uso de leite desnatado e soro de queijo são uma alternativa de baixo custo, sem toxicidade e eficiente na indução de promotores Lac indutíveis (HERRMANN et al., 2020; KHANI; BAGHERI, 2020). Leite e seus derivados possuem alto teor de lactose e responsável pela indução da expressão heteróloga de proteínas, além de auxiliar no crescimento bacteriano como fonte de carbono (KHANI; BAGHERI, 2020). A galactose

também levou a um incremento em 0,5g/L na produção de proteínas recombinantes sob o controle de um tipo selvagem de promotor Lac (DE LEÓN et al., 2003). O indutor arabinose, também se mostrou eficiente na indução da expressão do promotor T7 na produção de proteínas recombinantes em *E. coli* (XU et al., 2006). É necessário salientar que o indutor alternativo apresentado nesse estudo têm potencial de substituir a utilização de IPTG para a produção de dsRNAs.

Otimizações na produção, como a utilização de fermentadores de bancada, que possibilitam o controle de aeração, temperatura e pH de modo mais rigoroso do que na produção em erlenmeyer, leva a um aumento significativo na produção de dsRNA. A produção de dsRNA usando batelada e batelada-alimentada foi comparada usando fermentador de 10 L, e meio LB, o rendimento em batelada-alimentada foi em média 95.0 µg/ml, enquanto que a na batelada em torno de 3,4 µg/ml (THAMMASORN et al., 2015). Após otimizações com o meio de cultivo Terrific broth (TB), a batelada alimentada levou a um incremento na produtividade de dsRNA, chegando a 182 µg/ml (PAPIĆ et al., 2018). Além do mais, PAPIĆ et al., (2018) analisou a cinética de produção de dsRNA com o crescimento bacteriano, justificando uma maior produção ao fornecer nutrientes ao longo do processo de fermentação.

Além do sistema HT115-L4440 outros sistemas são altamente eficientes na produção de dsRNAs pela via fermentativa. Destaca-se, nesse sentido, o sistema *Corynebacterium glutamicum* e vetor pPK4H1, com dois promotores e terminadores T7 convergentes, obteve o rendimento de 1g/L (HASHIRO et al., 2021). Novos sistemas de expressão podem aumentar a produtividade de dsRNAs. Microorganismos com maior capacidade de dar suporte à produção de moléculas de dsRNA, aliado à vetores de expressão elevado número de cópias, aliado à métodos eficientes de extração e purificação desses ácidos nucleico podem auxiliar na produção em escala industrial.

A literatura aponta para diversos fatores que podem atuar no rendimento de dsRNA/mL de meio: 1) O sistema de expressão Microorganismo-vetor; 2) O método de produção e suas otimizações como o indutor; 3) O método de extração e purificação. Nesse trabalho considerando a qualidade dos dsRNAs produzidos o melhor sistema de expressão foi o HT115/New-vector, devido a produção de um menor número de bandas inespecíficas. O indutor alternativo se mostrou tão eficiente quanto IPTG, por isso, pode substituí-lo na produção de dsRNAs. Finalmente o método que garante bom rendimento e qualidade de dsRNAs, destaca-se a primeira extração com Etanol. Nesse trabalho essas são as condições

mais favoráveis para a produção de dsRNAs de boa qualidade para estudos de silenciamento gênico via RNAi.

4.4 CONCLUSÕES

O vetor New-Vector desenvolvido nesse trabalho obteve sucesso através da adição de dois terminadores T7 para que não houvesse a formação de bandas de dsRNA acima do tamanho e esperado. Além disso, a produção de bandas menores do que o esperado, devido à terminação precoce da transcrição, ainda necessita de soluções para a produção de dsRNA com tamanho único de banda.

A primeira extração com etanol foi eficiente, apesar de apresentar menor rendimento (2,5 µg/mL), é uma alternativa de baixo custo que pode vir a ser utilizada em processos de extração de dsRNA de boa qualidade e pureza. Além disso, o indutor alternativo, atóxico e biodegradável pode ser utilizado em substituição ao IPTG, com rendimento de 3,5 µg/mL de dsRNAs com o vetor New-vector. Outros parâmetros podem ser otimizados ainda para aumentar o rendimento da produção de dsRNAs como sistemas de microorganismos e vetores, outros métodos de extração e condições de cultivo, visando a aplicação dessas moléculas na agricultura.

REFERÊNCIAS

- AALTO, A. P. et al. Large-scale production of dsRNA and siRNA pools for RNA interference utilizing bacteriophage ϕ 6 RNA-dependent RNA polymerase. **Rna**, v. 13, n. 3, p. 422–429, 2007.
- AHN, S.-J. et al. 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.
- BAULCOMBE, DA. RNA silencing in plants. **Nature**, v. 431, p. 356–363, 2004.
- DALAKOURAS, A. et al. Genetically Modified Organism-Free RNA Interference: Exogenous Application of RNA Molecules in Plants1. **Plant Physiology**, v. 182, p. 38–50, 2019.
- DAS, P. R.; SHERIF, S. M. Application of Exogenous dsRNAs-induced RNAi in Agriculture: Challenges and Triumphs. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. June, 2020.
- DE LEÓN, A. et al. Galactose induces the expression of penicillin acylase under control of the lac promoter in recombinant Escherichia coli. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 17, p. 1397–1402, 2003.
- DELGADO-MARTÍN, J.; VELASCO, L. An efficient dsRNA constitutive expression system in Escherichia coli. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 16–17, p. 6381–6393, 2021.
- DONOVAN, R. S.; ROBINSON, C. W.; GLICK, B. R. Review : Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 16, p. 145–154, 1996.
- FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. February, p. 806–811, 1998.
- GARCÍA, K. et al. Inactivated *E. coli* transformed with plasmids that produce dsRNA against infectious salmon anemia virus hemagglutinin show antiviral activity when added to infected ASK cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, p. 1–11, 2015.
- GUAN, R. et al. Advances in the Development of Microbial Double-Stranded RNA Production Systems for Application of RNA Interference in Agricultural Pest Control. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, n. September, p. 1–7, 2021.
- HASHIRO, S. et al. Efficient production of long double-stranded RNAs applicable to agricultural pest control by *Corynebacterium glutamicum* equipped with coliphage T7-expression system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 4987–5000, 2021.
- HASHIRO, S.; YASUEDA, H. RNA Interference - Based Pesticides and Antiviral Agents : Microbial Overproduction Systems for Double - Stranded RNA for Applications in Agriculture and Aquaculture. **Applied Sciences**, v. 12, n. 2954, 2022.

HENKIN, T. M. CONTROL OF TRANSCRIPTION. n. 57, p. 35–57, 1996.

HERRMANN, F. et al. Effect of by-products from the dairy industry as alternative inducers of recombinant β -galactosidase expression. **Biotechnology Letters**, v. 3, 2020.

KHANI, M.; BAGHERI, M. Protein Expression and Purification Skimmed milk as an alternative for IPTG in induction of recombinant protein expression. **Protein Expression and Purification**, v. 170, n. February, p. 105593, 2020.

LAU, S. E. et al. dsRNA silencing of an R2R3-MYB transcription factor affects flower cell shape in a *Dendrobium* hybrid. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2015.

LISA TIMMONS; ANDREW FIRE. Specific interference by ingested dsRNA. **Nature**, v. 395, n. October, p. 854, 1998.

LOPES, C. et al. Improving the cost-effectiveness of Enhanced Green Fluorescent Protein production using recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3): decreasing the expression inducer concentration. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 66, p. 527–536, 2019.

MA, Z. Z. et al. A novel plasmid–*Escherichia coli* system produces large batch dsRNAs for insect gene silencing. **Pest Management Science**, v. 76, n. 7, p. 2505–2512, 2020.

ONGVARRASOPONE, C.; ROSHORM, Y.; PANYIM, S. A Simple and Cost Effective Method to Generate dsRNA for RNAi Studies in Invertebrates. v. 33, p. 35–39, 2007.

PAPIĆ, L. et al. Double-stranded RNA production and the kinetics of recombinant *Escherichia coli* HT115 in fed-batch culture. **Biotechnology Reports**, v. 20, p. 10–13, 2018.

POSIRI, P.; ONGVARRASOPONE, C.; PANYIM, S. A simple one-step method for producing dsRNA from *E. coli* to inhibit shrimp virus replication. **Journal of Virological Methods**, v. 188, n. 1–2, p. 64–69, 2013.

TENLLADO, F. et al. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. **BMC Biotechnology**, v. 11, p. 1–11, 2003.

THAMMASORN, T. et al. Large-scale production and antiviral efficacy of multi-target double-stranded RNA for the prevention of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. **BMC Biotechnology**, p. 5–8, 2015.

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.

VOLOUDAKIS, A. E. et al. Efficient double-stranded rna production methods for utilization in plant virus control. **Methods in Molecular Biology**, v. 1236, p. 255–274, 2015.

XU, Y. et al. Characterization of the T7 promoter system for expressing penicillin acylase in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 3, p. 529–536, 2006.

5. SILENCIAMENTO GÊNICO POR APLICAÇÃO TÓPICA DE dsRNA EM CAPIM-AMARGOSO

Resumo: Capim-amargoso é uma planta daninha de regiões tropicais e subtropicais de grande relevância no Brasil. O surgimento de biótipos resistentes é um grande desafio para a produção de alimentos devido às perdas em produtividade e aumento dos custos. Novas tecnologias como as baseadas em RNAi podem, no futuro, compor o portfólio de soluções para controle de plantas daninhas. Nesse sentido, foram testado métodos de entrega de dsRNAs para o silenciamento do gene *PDS* via RNAi em capim-amargoso. A fim de estabelecer uma metodologia eficiente de entrega, foram avaliadas a aplicação de dsRNA do gene *PDS* em folhas, raízes e pré-emergência. Em folhas o silenciamento do gene *PDS* foi detectado em 3, 5 e 10 dias após o silenciamento, com uma redução do número de transcritos em torno de 35%. Em pré-emergência houve redução no número de transcritos do gene *PDS* em 5 e 10 dias após a aplicação de dsPDS, 37% e apenas 11% respectivamente. Já na aplicação via raízes houve uma redução em 20% do número de transcritos após 10 dias da aplicação. A massa seca também apresentou redução em 24% no grupo tratado com dsPDS, após a aplicação em pré-emergência. Apesar do silenciamento gênico detectado, não foi possível a visualização dos sintomas característicos de branqueamento. O silenciamento do gene *PDS* nesse estudo abre novas perspectivas para o uso de RNAi para desenvolvimento de novos produtos para controle de plantas daninhas.

Palavras-chave: *Digitaria insularis*; *phytoene desaturase*; RNA de interferência; entrega de dsRNA.

5.1 INTRODUÇÃO

No Brasil o capim-amargoso (*Digitaria insularis*) é uma das plantas daninhas mais importantes nos cultivos de soja, milho e algodão. É altamente adaptável, competindo por recursos como água, luz e nutrientes, o que pode levar à redução de produtividade (GAZOLA et al., 2016). De difícil controle após a formação dos rizomas, o principal herbicida aplicado é o glifosato (GAZZIERO et al., 2019). Entretanto, o aparecimento de populações resistentes tem levado ao aumento do custo de produção, devido à necessidade de aplicação de outros herbicidas ou mesmo de capina manual. Dessa forma, novas abordagens baseadas em

biotecnologia, como o RNAi, estão na fronteira do desenvolvimento de novos produtos para o controle de plantas daninhas.

O RNAi é um mecanismo de defesa contra vírus e retrotransposons de organismos eucariotos que promove o silenciamento gênico pós-transcricional (CHRISTIE; CROFT; CARROLL, 2011; FLETCHER et al., 2020). Este processo de silenciamento gênico também pode ser desencadeado por uma molécula exógena de RNA dupla fita (dsRNA) que, uma vez dentro da célula é reconhecida e clivada pela enzima DICER em pequenos RNAs de interferência (siRNAs) de 21 a 24 pb. Os siRNAs são então incorporados ao complexo enzimático RISC (do inglês RNA-induced silencing complex), cujo principal componente é uma proteína argonauta (AGO) que utiliza a fita guia de siRNA para encontrar e clivar a molécula de RNA mensageiro (mRNA) complementar à sequência da fita guia, uma vez clivado, o mRNA alvo é então degradado pela ação das exorribonucleases que degradam o mRNA no sentido 5' – 3' e/ou da ação dos exossomos que degradam o mRNA no sentido 3' - 5' (ZHANG; GUO, 2017), levando assim a uma redução no número de moléculas do mRNA alvo (BAULCOMBE, 2004; BERNSTEIN et al., 2001).

O gene *Phytoene desaturase (PDS)* catalisa a conversão de fitoeno em zeta caroteno, um ponto chave na via biossintética dos carotenóides (QIN et al., 2007). Os carotenoides desempenham diversas funções importantes em diversos processos fisiológicos em plantas como, agentes de fotoproteção da clorofila, síntese de vitamina A e ácido abscísico (ABA) (QIN et al., 2007). O gene *PDS* quando silenciado gera o branqueamento das folhas, ou *bleaching* em folhas e frutos (BANAKAR et al., 2020; LEE; HAMMOND-KOSACK; KANYUKA, 2012; LIU et al., 2016; MAHER et al., 2020).

Poucos são os relatos na literatura de aplicação de dsRNAs em folhas, a maioria deles apresentam siRNAs de 21 e 22pb como mais eficientes para o silenciamento gênico via RNAi. Outros trabalhos utilizam técnicas como abrasão, alta pressão, ou mesmo nanopartículas para realizar a entrega de tais moléculas (DALAKOURAS et al., 2016; HENDRIX et al., 2021a; NUMATA et al., 2014). Contudo, há uma lacuna na literatura quanto à utilização de moléculas de dsRNA para silenciamento de genes endógenos em plantas (USLU et al., 2020). Por isso, o emprego do gene *PDS* de capim-amargoso, que quando silenciado, apresenta um fenótipo facilmente observável é estratégico para elucidar questões relacionadas com o mecanismo e a entrega do sistema de silenciamento gênico baseado em RNAi.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material Biológico

As plantas de capim-amargoso foram cultivadas em casa de vegetação em vasos de 300 mL e/ou 1L de capacidade, contendo solo:substrato na proporção 3:1, com irrigação por aspersão duas vezes ao dia por 15 minutos e temperatura de $30\text{ °C} \pm 10\text{ °C}$.

5.2.2 Extração de RNA e Síntese de cDNA

A extração de RNA foi realizada segundo o protocolo de Oliveira et al., (2015). As folhas foram coletadas e imediatamente imersas em nitrogênio líquido e mantidos em freezer -80 °C para a preservação do RNA até o momento da extração. A concentração e a pureza do RNA foi avaliada em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific), e sua integridade em gel de agarose 1%.

O DNA genômico foi removido das amostras por meio do tratamento com DNase I Amplification Grade (Invitrogen, Thermo Scientific) segundo as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de mRNA (RNA mensageiro), as amostras foram tratadas para a retirada de DNA genômico utilizando o kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) segundo as instruções do fabricante.

5.2.3 Sequenciamento do Gene *PDS* de Capim-amargoso

Devido à ausência de dados genômicos de capim-amargoso na literatura e em bancos de dados, foram desenhados *primers* para realizar o sequenciamento do gene PDS de capim-amargoso. Para tanto, foram resgatadas as sequências conservadas do gene *PDS* das espécies *Panicum halli* v2.0, *Panicum virgatum* v1.1, *Setaria itálica* v2.2, *Setaria viridis* v1.1 e *Sorghum bicolor* v3.1.1, membros da família Poaceae, que estão disponíveis no banco de dados Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). As sequências CDS foram alinhadas utilizando o software online MUSCLE (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/). Após o alinhamento foi gerada uma sequência consenso utilizando o software online GENEFISHER 2 (bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/genefisher2). A sequência consenso foi então utilizada

para o desenho dos *primers* com o software PRIMER3PLUS (www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi), tabela 1.

Os *primers* foram utilizados para obtenção de *amplicons* utilizando cDNA de capim-amargoso como *template*, extraído como descrito no item 5.2.2. A amplificação foi realizada por PCR em volume final de 50µl, contendo 1,5 mM de MgCl₂, 400 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada *primer*, e 1,5U de Taq RNA polimerase em tampão (NH₄)₂SO₄. A reação ocorreu com a seguinte ciclagem: 5 min a 95 °C seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s de acordo com a temperatura de anelamento de cada *primer* descrito na Tabela 1, 40 s a 72 °C, finalizando com um ciclo de 7 min a 72 °C. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados com o kit Wizard SV Gel and PCR CleanUP (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. Após esses procedimentos, os produtos purificados da reação de PCR foram sequenciados utilizando o kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) conforme as especificações do fabricante, utilizando o equipamento ABI3500 (Applied Biosystems).

Tabela 1. *Primers* para sequenciamento do gene PDS de capim-amargoso e RT-qPCR.

Função	Gene	Sequência 5'-3'	TA (°C)	Amplicon (pb)
Sequenciamento	<i>Phytoene desaturase (PDS)</i>	F GGATTTTCCAAGACCTCC	52.0	445
		R CTGGGAAATCAAACCGG	52.0	
		F CCTGATGAGCTATCCATG	52.0	419
		R CTGCTGAAAAGAAGGTGG	52.0	
		F GGAAGGATGAAGATGGAG	55.0	438
		R GCATGGATAGCTCATCAG	55.0	
		F CCTTCTTTTCAGCAGGAG	57.0	
		R TCCTGCACTATAGACTGG	57.0	
RT-qPCR	<i>Phytoene desaturase (PDS)</i>	F TGGCGAGCTTGGTATTGAGG	60.0	90
		R AACCGGCTGAATTCTCCTGG	60.0	
	<i>β-Tubulin</i>	F ACTGGGCCAAGGGACACTA	60.0	93
		R TGGAGGCAGTCGCAGTTCT	62.0	

F- Foward; R- Reverse; TA – Temperatura de Anelamento

5.2.4 Obtenção das Moléculas de dsRNA dos Genes *PDS* e *GFP*

Os fragmentos gerados pelo sequenciamento do gene *PDS* foram analisados por meio do software siRNA Wizard Software (<https://www.invivogen.com/sirnazizard/design.php>) que identifica quais as regiões com maior probabilidade de gerar pequenos RNAs

interferentes (siRNAs) pelo corte da enzima DICER e definida a melhor região para obtenção do dsRNA.

Os dsRNAs dos genes *PDS* e *GFP* (Tabela 2) foram sintetizados pela empresa RNA Greentech.

Tabela 2. Sequências de dsRNA utilizadas nos experimentos de aplicação em raiz, folhas e pré-emergência.

Identificação	Sequência	Tamanho (pb)
dsPDS	GTTCAATGTTGGAGTTGGTCTTTGCTCCTGCAGAGG AATGGATTGGACGAAGTGAAACTGAAATCATTGAT GCAACTATGGAAGAGCTAGCCAAGTTATTTCTGAT GAAATTGCTGCCGATCAGAGTAAAGCAAAGATCCTT AAGTATCATGTTGTCAAGACACCGAGATCGGTTTAC AAAAGTGTCCAAACTGTGAACCTTGCCGCCCTCTC CAAAGGTCACCGATCGAAGGGTTCTATTTGGCTGGC GATTACACAAAGCAGAAATACTTGGCTTCCATGGAA GGTGCAGTATTATCTGGGAAGC	309
dsGFP	GTACCCAGATCACATGAAGCAGCATGACTTCTTCAA GAGCGCCATGCCCGAAGGCTACGTGCAAGAAAGGA CTATCTTCTTCAAGGATGACGGGAACTACAAGACAC GTGCCGAAGTCAAGTTCGAAGGTGATACCCTGTGAA CCGCATCGAGCTGAAAGGTATCGATTTCAAGGAAG ATGGAAACATCCTCGGACACAAGCTGGAGTACAAC TACAACTCCCACAACGTATACATCATGGCCGACAAG CAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCAG GCACAACATCGAAGA	300

5.2.5 Bioensaios de Entrega de dsRNAs em Capim-Amargoso

Visando identificar a melhor forma de absorção do dsRNA, foram avaliados a aplicação de dsRNA em raízes, folhas e pré-emergência.

5.2.5.1 Bioensaio de Aplicação em Raízes

O experimento para silenciamento do gene *PDS* em capim-amargoso com aplicação em raízes foi realizado em plantas 10 dias após a germinação. As plântulas foram gentilmente retiradas do solo e suas raízes foram lavadas, e as plantas mantidas em água até o momento da realização do experimento. Como veículo de entrega foi utilizado tampão fosfato 10 mM pH 6,8, descrito por Sammons et al., 2014. Moléculas de ds*GFP* foram utilizadas como controle.

As plantas foram transferidas para microplacas de fundo chato contendo 1mL de solução fosfato com os dsRNAs dos genes *PDS* (100 ng/μl), *GFP* (100 ng/μl) e somente o tampão fosfato. As raízes das plantas de capim-amargoso foram mantidas imersas por 24h nas

soluções, em seguida as plantas foram transferidas para vasos e levadas para casa de vegetação. Foram realizadas coletas nos tempos de 1, 2, 3, 5 e 10 dias após a aplicação. As amostras foram coletadas e imediatamente imersas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80°C para a preservação do RNA até o momento da extração de RNA.

O delineamento experimental adotado foi o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com três repetições por tratamento sendo cada repetição composta por 3 plantas.

5.2.5.2 *Bioensaio de Aplicação em Folhas*

O experimento para silenciamento do gene *PDS* em capim-amargoso com aplicação em folhas foi realizado em plantas 15 dias após a germinação. O veículo de aplicação foi composto de tampão fosfato 10mM pH 6,8, descrito por Sammons, 2014 e 0,3% de óleo mineral.

A aplicação foi realizada no período da manhã (8h30min-9h30min) utilizando aerógrafo com pressão de 15 PSI ou 1 bar. Foram aplicadas aproximadamente 500 µL de solução contendo os dsRNAs dos genes *PDS* (100 ng/µl), *GFP* (100 ng/µl) e somente o veículo de tampão fosfato e óleo mineral. Após a aplicação as plantas foram mantidas sem irrigação por 24h. Foram coletadas amostras nos tempos de 1, 2, 3, 5 e 10 dias após a aplicação.

O delineamento experimental adotado foi o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com três repetições por tratamento sendo cada repetição composta por 3 plantas.

5.2.5.3 *Bioensaio de Aplicação Pré-emergente*

Para avaliação do efeito da aplicação de dsRNA em pré-emergência, 20 sementes de capim-amargoso foram semeadas em vasos de 1L com de solo:substrato 3:1. O veículo de aplicação foi composto de tampão fosfato 10mM pH6,8, descrito por Sammons, 2014. Após 48h de semeadura, foram borrifados 3 mL de solução contendo os genes *PDS* (100 ng/µl), *GFP* (100 ng/µl) e somente o tampão fosfato 10 mM pH 6,8. Após a aplicação os vasos foram irrigados por capilaridade, adicionando água ao prato, evitando assim a lixiviação do produto.

Foram feitas avaliações de geminação 1, 2, 3, 5 e 10 dias após a aplicação. Amostras foram coletadas para a avaliação de expressão gênica 3, 5 e 10 dias após a aplicação. O delineamento experimental adotado foi o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com

13 vasos, com 20 sementes por vaso. Para as avaliações de expressão gênica foram coletadas amostras em triplicada composta por uma planta de cada vaso.

Para a determinação de massa seca após 15 dias da aplicação foram coletadas todas as plantas restantes em cada vaso e secas em estufa com circulação de ar a 60 °C por 48h. Após as amostras foram pesadas, em balança analítica.

5.2.6 Análise Da Expressão Gênica por RT-qPCR

As reações foram conduzidas em equipamento 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando o kit Platinum[®] SYBR Green[®] qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen) conforme as instruções do fabricante. A condição de amplificação foi composta por um ciclo inicial de desnaturação de 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15s e anelamento e extensão a 60°C por 1 min. Ao final foi obtida a curva de dissociação pela subida gradual da temperatura até 95 °C por 15 min, seguido de 60°C por 1 min.

A eficiência da reação de amplificação para o gene *PDS* foi determinada por meio de diluições seriadas de cDNAs (1:5, 1:25, 1:125, 1:625, 1:1250), e o índice de inclinação da reta foi calculado aplicando a fórmula: $E = [10^{-1/\text{slope}}] - 1$. A especificidade dos produtos amplificados foi avaliada pela análise das curvas de dissociação.

A expressão relativa do gene *PDS* foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). O gene de referência utilizado para normalização foi β -tubulina obido a partir da sequência de *Digitaria exilis*, e considerado como calibrador das amostras o controle somente com o veículo de aplicação.

5.2.7 Análises estatísticas

Os dados coletados nos experimentos foram submetidos à análise de variâncias (ANOVA), e quando significativa, os dados foram submetidos à análise das médias pelo teste de Tukey, com $\alpha < 0.05$. A análise dos resíduos dos dados de aplicação em raízes não obedeceram aos pressupostos do modelo da análise de variância, por isso foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskall-Wallis, seguido do teste de Dunn.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O controle de plantas daninhas por herbicidas enfrenta problemas com o desenvolvimento de biótipos resistentes. Entre os métodos disruptivos e promissores que podem contribuir para o atual portfólio de herbicidas encontra-se o de RNA interferente (RNAi). Essa técnica biotecnológica ainda apresenta diversos gargalos, mas figura como uma das estratégias mais promissoras para o controle de plantas daninhas para os próximos 50 anos (WESTWOOD et al., 2018).

Apesar da grande relevância do capim-amargoso (*Digitaria insularis*) para os cultivos de soja e milho no Brasil (GAZZIERO et al., 2019), não existem dados de transcriptoma ou de genoma disponíveis em plataformas de dados, por essa razão foi necessário realizar o sequenciamento parcial do gene *PDS* de capim-amargoso (Anexo 1). O sequenciamento revelou um perfil de alta conservação com as espécies *Panicum halli*, *Setaria viridis*, *Zea Mays*, *Sorghum bicolor*, que são espécies próximas filogeneticamente de *Digitaria insularis*. Apesar do alto nível de conservação das sequências, o sequenciamento parcial do gene *PDS* foi satisfatório para o desenho do dsPDS utilizado nos experimentos de aplicação em capim-amargoso.

Além da seleção adequada da sequência para promover o silenciamento do gene alvo, outro ponto relevante para a tecnologia de RNAi é a forma de entrega do dsRNA de maneira a garantir a eficácia e adequação econômica para uso rotineiro em sistemas de cultivo. Apesar da aplicação do dsRNA utilizando métodos como abrasão com sílica e alta pressão (5-6 bar) serem apontados como eficientes na entrega de siRNAs (DALAKOURAS et al., 2016; HENDRIX et al., 2021a), esses procedimentos inviabilizam a aplicação em campo. Com o objetivo de estabelecer uma metodologia eficiente de entrega, sem utilização de ferimentos, abrasão ou mesmo alta pressão, foram testadas três formas de aplicação: 1) folhas; 2) raízes; 3) pré-emergência.

A aplicação em folhas apresenta diversos desafios, embora a literatura indique que apenas moléculas de siRNAs (21 e 22pb) encapsuladas com nanopartículas teriam a capacidade de causar silenciamento gênico via RNAi por aplicação em folhas (HENDRIX et al., 2021a; USLU et al., 2020), nossos resultados apontam o contrário. A aplicação de dsRNA longo usando baixa pressão (15 PSI) e óleo mineral como adjuvante levou ao silenciamento do gene *phytoene desaturase (PDS)* em capim-amargoso. Os dados de expressão gênica (Figura 1) mostram que houve silenciamento do gene *PDS* em 3, 5 e 10 dias, com uma

redução no número de transcritos em 35% quando aplicado via folhas. Contudo, fenotipicamente, as plantas não apresentaram os sintomas de branqueamento das folhas até o 10º dia avaliado (Figura 2).

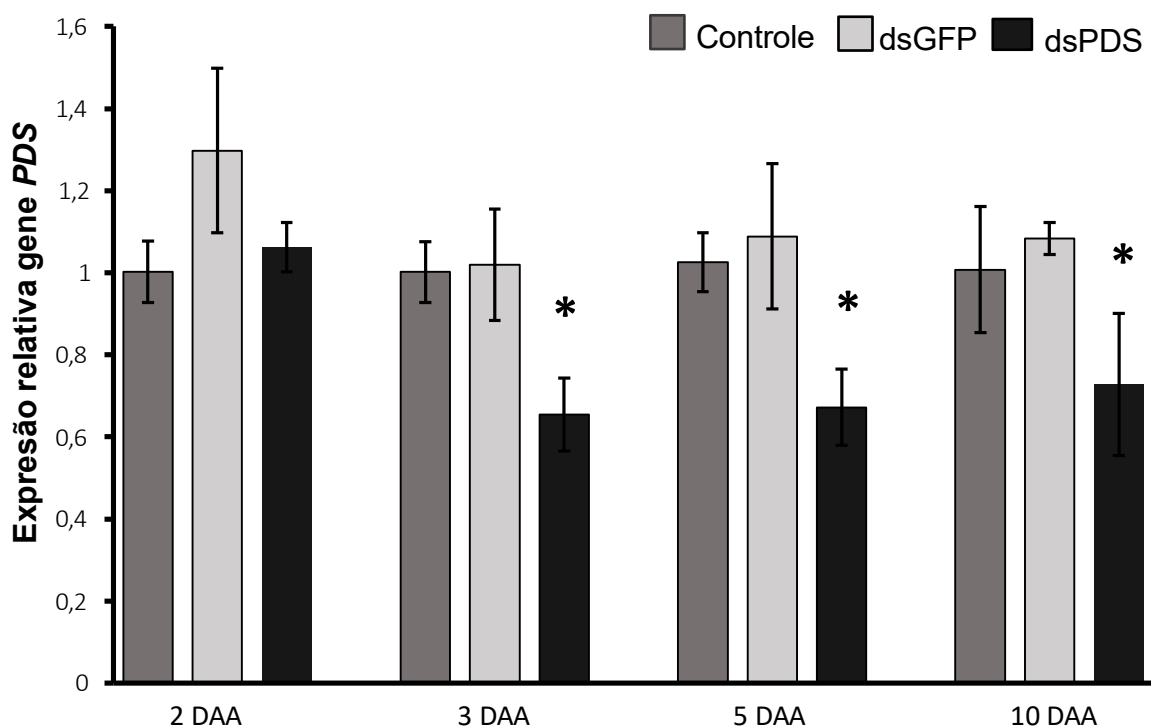


Figura 1. Expressão relativa do gene PDS após aplicação foliar de dsRNA em capim-amargoso. Todos os dados são médias \pm desvio padrão. * indica diferença significativa pelo Teste de Tukey, $\alpha < 0.05$. DAA: Dias após a aplicação

As folhas são a principal porta de entrada para moléculas de herbicidas químicos (FERNÁNDEZ et al., 2017), o desenvolvimento de novos herbicidas, baseados em RNAi, para alcançar sucesso também devem ser absorvidos por essa via. Entretanto, são poucos os relatos de silenciamento de genes endógenos em plantas na literatura. O primeiro relato de silenciamento gênico desencadeado por RNAi foi divulgado por SAMMONS et al., (2014). Sammons et al. (2014) descreve o silenciamento do gene *PDS* e *EPSPS* utilizando dsRNAs, siRNAs, ssRNAs e ssDNA, por aplicação tópica. Contudo, DALAKOURAS et al., (2016) não conseguiu reproduzir os resultados gerados por Sammons et al., (2014), mas obteve silenciamento do gene *GFP* utilizando alta pressão e biobalística com aplicação de siRNAs de 21 e 22 pb. Ainda de acordo com LAU et al., (2015) a inoculação mecânica de extrato bacteriano contendo dsRNAs do gene R2R3-MYB foi eficiente para alcançar o silenciamento do gene. Além desses resultados que alcançaram o silenciamento de genes endógenos, outros trabalhos também relataram o silenciamento dos transgenes *GFP* e *NPTII* (DUBROVINA et

al., 2019; KISELEV et al., 2021). Ao contrário desses trabalhos USLU et al.,(2020) não obteve o silenciamento do gene *GFP* após aplicação de dsRNA utilizando alta pressão. As lacunas observadas entre os trabalhos são provalmente explicáveis pelos métodos empregados pelos autores USLU et al.,(2020) e DALAKOURAS et al., (2016) que não citam em seus trabalhos a utilização de adjuvantes, como por SAMMONS et al., (2014) que utiliza o surfactante Silwett-L77 e este trabalho que utiliza óleo mineral.

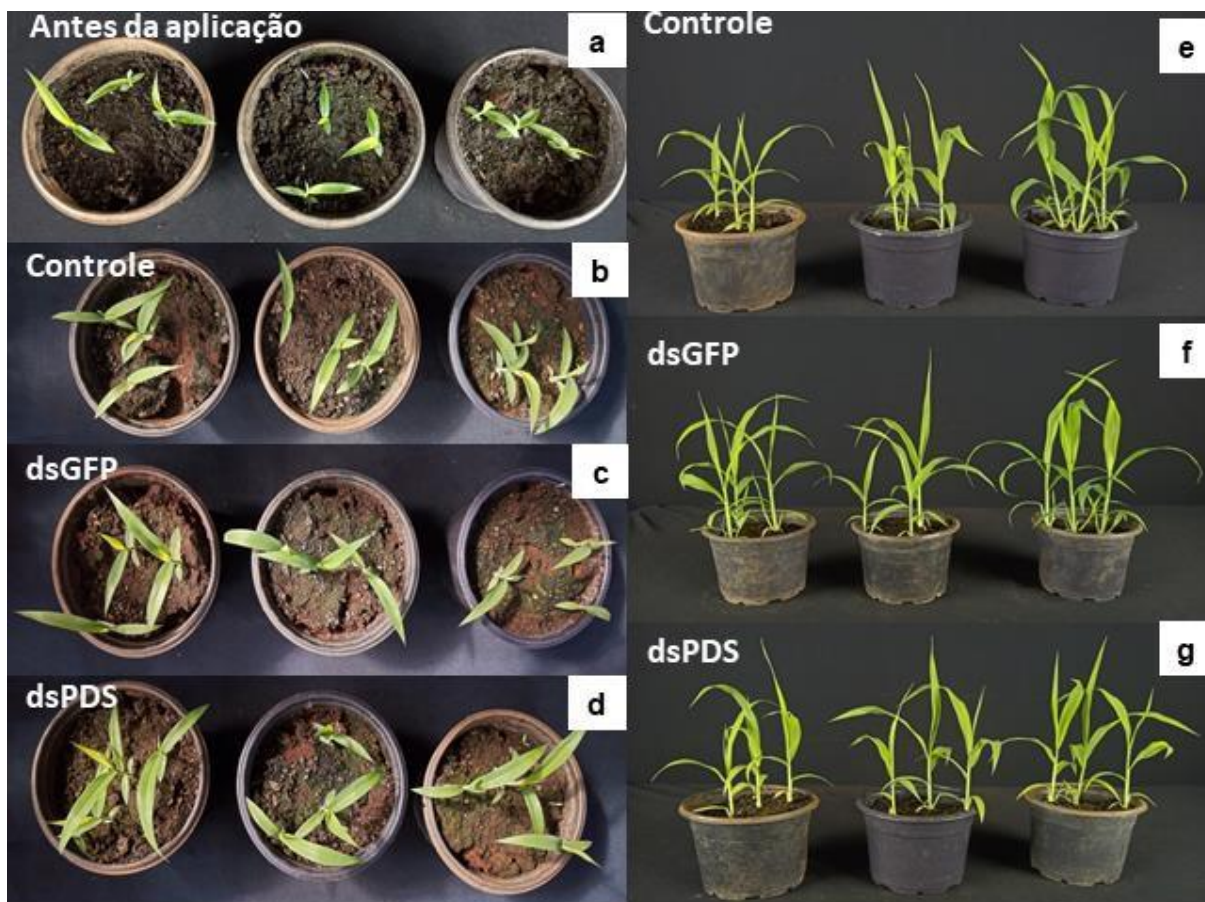


Figura 2. Fenótipo aos 5 e 10 dias após a aplicação de dsRNA em folhas de capim-amargoso. a) Plantas antes da aplicação. b,c,d) Plantas 5 dias após a aplicação. d, e, f) Plantas 10 dias após a aplicação.

Os adjuvantes podem atuar nas barreiras como cutícula e parede celular, quebrando-as, aumentar a espalhabilidade e molhabilidade, e desse modo melhorar a absorção de produtos (BENNETT et al., 2020; FERNANDEZ; EICHERT, 2009). O óleo mineral, utilizado na aplicação em folhas, têm como função dissolver os lipídeos que compõem a cutícula, causando rachaduras que auxiliam na absorção dos produtos e pode ter influenciado positivamente na entrada dos dsRNAs nesse trabalho (VARGAS; ROMAN, 2006).

A análise de expressão do gene *PDS* nas plantas que passaram pelo tratamento de imersão das raízes na solução de dsRNAs, apresentou redução do número de transcritos após 10 dias do tratamento com dsPDS (Figura 3). Contudo, o fenótipo esperado após o silenciamento do gene *PDS*, branqueamento, não foi observado até o 10º dia. Em experimentos anteriores (dados não mostrados) o branqueamento das folhas surgiu entre 15 e 20 dias após a imersão de raízes em dsPDS.

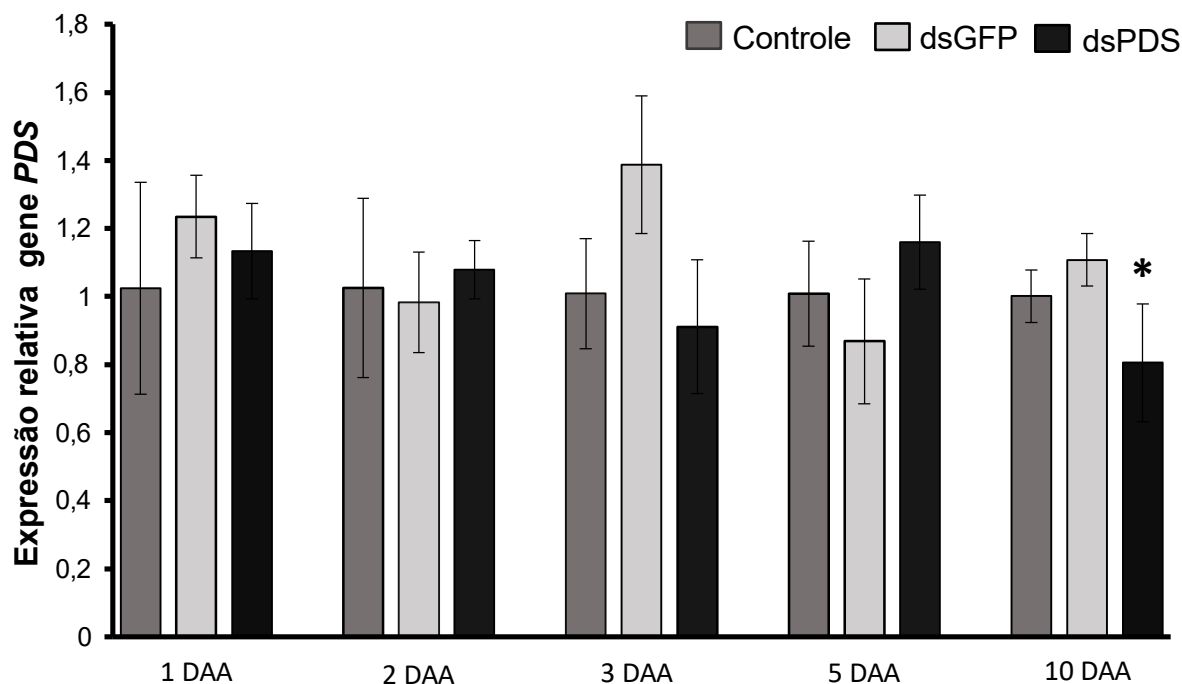


Figura 3. Expressão relativa do gene *PDS* após aplicação de dsRNA via imersão de raízes de capim-amargoso. Todos os dados são médias \pm desvio padrão. * indica diferença significativa pelo Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn, $\alpha < 0.05$. DAA: Dias após a aplicação

Nesse trabalho, o silenciamento via RNAi pode ter sido desencadeado nas células das raízes e o tempo avaliado não foi adequado para a detecção de sintomas, já que os dados apontam o início do silenciamento 10 dias após a aplicação. Para que o silenciamento ocorra nas folhas, onde o gene *PDS* é altamente expresso, é necessário que seja desencadeado o silenciamento transitivo ou sistêmico em paralelo com a translocação de siRNAs para a parte aérea. No silenciamento sistêmico, siRNAs de 22pb desencadeiam o mecanismo de amplificação do sinal, e são gerados siRNAs de 21 ou 22pb pela ação das RdRPs (SANAN-MISHRA et al., 2021). Quando é sistêmico o silenciamento permanece por muito tempo, mesmo após a eliminação da fonte original de silenciamento (SANAN-MISHRA et al., 2021).

E nesse caso siRNAs de 21 e 22 pb migram célula-a-célula ou via floema para todo o organismo (CHEN et al., 2010).

Em outros trabalhos como em LI et al., (2015) a imersão de raízes em solução contendo dsRNA foi eficiente para silenciar os genes *Mob1A*, *WRKY23* e *Actina*, que levou a uma alta redução dos transcritos de mRNA dos alvos. Entretanto, deve-se considerar que no trabalho de Li et al., (2015) os genes são altamente expressos em raízes. Em outro estudo envolvendo aplicação de dsRNA em raízes, Jiang et al., (2014) também obteve silenciamento de um dos genes relacionados ao crescimento radicular *werewolf (WER)*, além do gene *shoot meristemless (STM)* envolvido na formação de regiões meristemáticas. Contudo, nesse estudo foram utilizadas nanopartículas, dendrímeros, para encapsular os dsRNAs.

Outro ponto importante é a translocação de dsRNAs via raiz. Em soja (YAN et al., 2020) a infiltração de dsRNA, para controle de pulgões, por aplicação em raízes foi limitada, sem a utilização de carreadores. No estudo em questão não houve controle do inseto estudado. DALAKOURAS et al., (2018) utilizando microscopia confocal revelou que moléculas de dsRNA captadas por injeção no tronco e pecíolo ficaram restritas ao xilema e apoplasto, além de não terem sido processadas por endonucleases *DICER-Like*. Esses trabalhos evidenciam o papel crucial da formulação com nanopartículas para a entrega eficiente de dsRNA através das raízes.

A dose do dsRNA é um fator a ser considerado por afetar o silenciamento gênico via RNAi. MITTER et al., (2017) obteve o silenciamento do gene GUS utilizando a concentração de 100ng/ul e a dose de 100ug por placa com cinco plantas. Contudo, o silenciamento dos genes endógenos de *Arabidopsis WRKY23 e Actina e Mob1A* de arroz, foi utilizado 1 mg/mL o que corresponde a uma concentração de 10x maior do que a utilizada nesse trabalho e também por MITTER et al., (2017). Os dados gerados nesse trabalho apontam para a necessidade de outros estudos a fim de esclarecer o papel da absorção de dsRNA pela raiz no silenciamento do gene *PDS* em capim-amargoso.

Na aplicação de dsRNAs em pré-emergência foi analisada a germinação de capim-amargoso ao longo dos dias após a aplicação. Não houveram diferenças na germinação entre os tratamentos ao longo dos dias após a aplicação de dsRNA (Tabela 3).

Tabela 3. Germinação e massa seca de capim-amargoso após aplicação de dsRNA em pré-emergência

	Germinação (%)					
	1DAA	2DAA	3DAA	5DAA	10DAA	15DAA
Controle	77,7 ± 11,5	80,4 ± 10,9	83,8 ± 8,7	84,2 ± 9,0	85,8 ± 10,0	73,3 ± 10,3
GFP	72,3 ± 8,8	75,4 ± 8,28	81,0 ± 6,0	80,4 ± 7,8	85,0 ± 7,0	69,5 ± 6,8
PDS	74,6 ± 9,2	76,5 ± 10,5	83,5 ± 9,2	84,2 ± 10,2	82,0 ± 9,19	68,0 ± 7,9

Todos os dados são médias ± desvio padrão. Não houve diferença significativa, $\alpha < 0.05$. DAA: Dias após a aplicação

Apesar de não ter sido observado efeito sobre a germinação, os dados de expressão gênica relativa mostram uma redução de 37% da expressão do gene *PDS* em plantas tratadas com dsPDS, três dias após a aplicação (Figura 4). Após 10 dias da aplicação das moléculas no solo, ainda foi possível detectar diferença na expressão do gene *PDS*, mas com uma redução muito baixa no número de transcritos (11%), possivelmente pelo mecanismo não ter atingido o nível sistêmico.

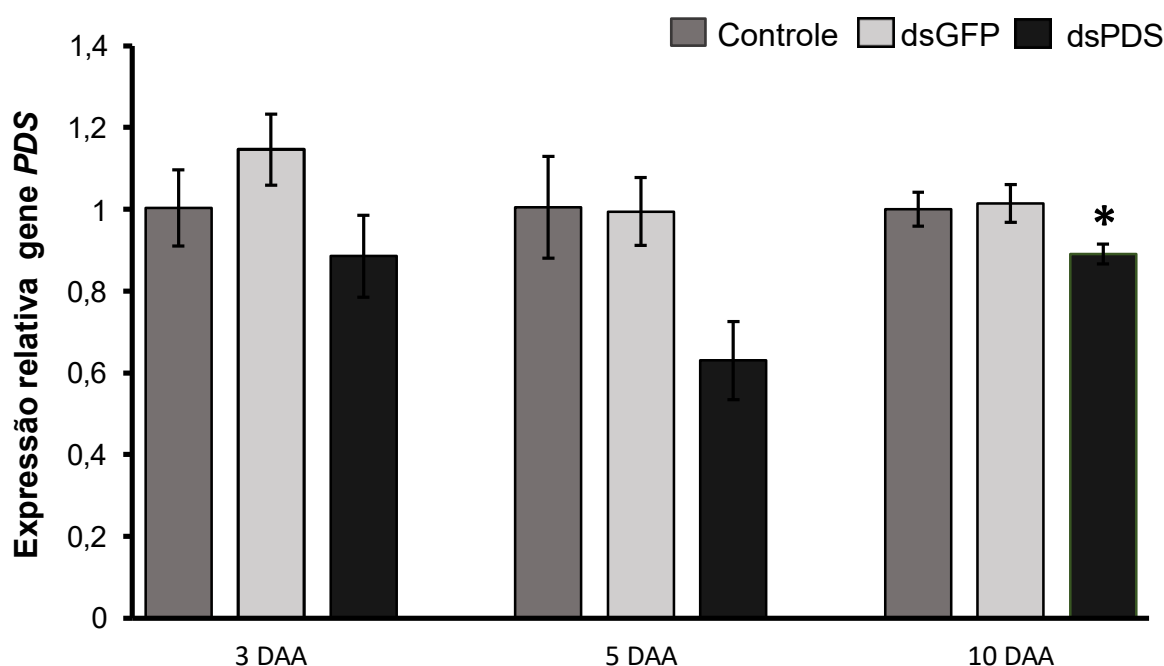


Figura 4. Expressão relativa do gene *PDS* após aplicação pré-emergente de dsRNA em capim-amargoso. Todos os dados são médias ± desvio padrão. * indicam diferença significativa pelo Teste Tukey, $\alpha < 0.05$. DAA: Dias após a aplicação

A redução em cerca de 37% na expressão do gene *PDS* já foi suficiente para desencadear processos nocivos ao desenvolvimento das plantas de capim-amargoso. A massa seca do grupo tratado com dsPDS reduziu em 24%, comparado ao grupo controle não aplicado (Figura 5).

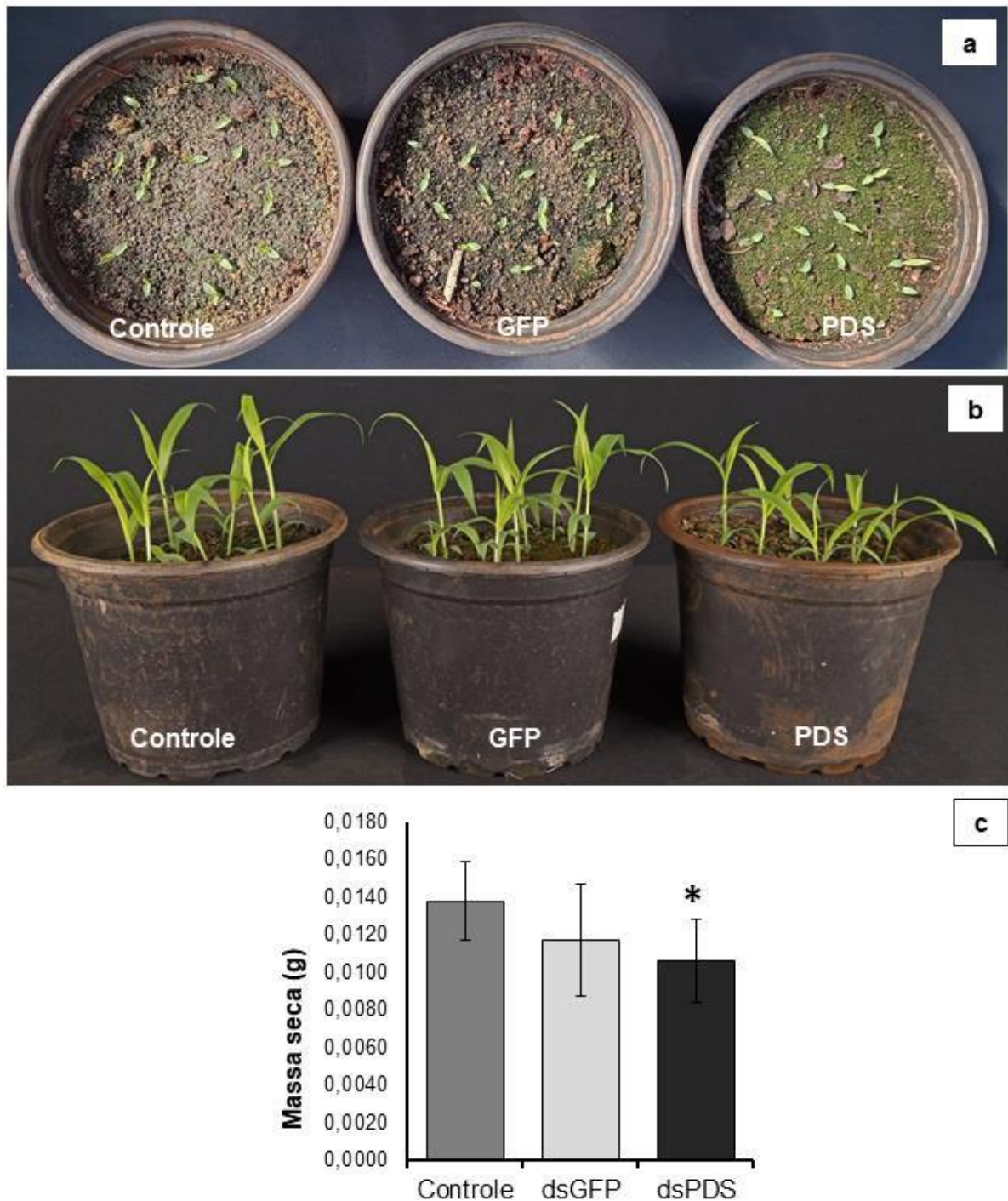


Figura 5. Aplicação de dsRNA em pré-emergência e massa seca de capim-amargoso. a) Vasos após 3 dias de aplicação. b) Vasos após 15 dias de aplicação. c) Massa seca após 15 dias da aplicação. * indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey, $\alpha < 0.05$.

A aplicação de dsRNA em pré-emergência a absorção das moléculas pode se dar por raízes ou folhas que entrem em contato com as moléculas de dsRNA presentes no solo, embora a presença de dsRNAs sem proteção em solo se mantenha um tempo curto devido à instabilidade da molécula. Fatores ambientais como radiação UV, temperatura, ação de enzimas microbianas, entre outros, influenciam na integridade do dsRNA aplicado

(DUBROVINA; KISELEV, 2019). As moléculas de dsRNA aplicadas em diversos tipos de solo não foram detectadas 48h após a aplicação (DUBELMAN et al., 2014). Em outro estudo ainda, as moléculas de dsRNA ficaram estáveis até 15 dias com baixa taxa de degradação quando expostas a luz solar (LI et al., 2015).

Embora os dados mostram silenciamento gênico, após a aplicação em folhas e pré-emergência, nas observações não foi detectado visualmente sintomas de silenciamento do gene *PDS*, o característico branqueamento. Os sintomas de branqueamento podem não ter sido perceptíveis devido a baixa redução dos transcritos de *PDS*, sendo necessária uma redução mais significativa para visualização do fenótipo visualmente. SCHWARTZ et al., (2020) obteve fenótipo com a redução de 80% dos transcritos, após aplicação de siRNAs de 22 pb encapsulados com a nanopartículas Carbon dots. Outro ponto a ser considerado é o rápido “turnover” das proteínas envolvidas nos processos dependentes de caroteno, como a proteína D1 do fotossistema II (DEPKA; JAHNS; Y, 1998). Na presença do inibidor de *PDS*, Norflurazon, não ocorre o “turnover” da proteína D1 devido à extinção total dos carotenoides, já no caso da redução de apenas 35% no número de mRNAs pode não ter sido suficiente para impedir a rápida reconstituição dessas proteínas. Esses dados corroboram com os dados de PEPPER et al., (2017) que aplicou siRNAs de 21 pb encapsulados com o peptídeo de penetração Tat2, mesmo após 20 dias após a aplicação não detectou branqueamento das folhas em Triticale, embora o silenciamento tenha sido de aproximadamente 80% dos transcritos de *PDS*. Apesar disso, os dados apresentados apontam que houve silenciamento de *PDS* após aplicação de dsRNA, pelos dados de expressão gênica, desse modo outros experimentos com mais de uma aplicação e/ou uso de nanopartículas, além de análises mais sensíveis para detecção do fenótipo devem ser realizados.

A redução da massa seca não é apresentada na literatura como um sintoma característico do silenciamento do gene *PDS*, mas no contexto de estudos disruptivos, como este com capim-amargoso, essa é uma alternativa à clássica detecção de branqueamento ou variegação das folhas. A redução da massa seca após o silenciamento do gene *PDS* pode estar ligada à deficiência energética. Já que o gene *PDS* quando silenciado causa deficiência energética no organismo devido à redução do nível de fotossíntese (QIN et al., 2007). Outra hipótese é que o silenciamento de *PDS* pode reduzir a biossíntese de giberelinas (GA). A expressão do gene *copalyl diphosphate synthase (CPS)*, que codifica a primeira enzima da via da biossíntese de GA, é regulada negativamente em mutantes de *PDS3* (QIN et al., 2007).

Os resultados de silenciamento gênico via RNAi em capim-amargoso são promissores para o desenvolvimento da técnica como um potencial novo mecanismo de ação de herbicidas. Assim, outros estudos a partir desses resultados podem ser realizados, como a utilização de nanopartículas para proteção e translocação das moléculas de dsRNA, o desenvolvimento de tecnologia de aplicação com surfactantes e adjuvantes, e ainda a escolhas de genes alvo que levem a danos irreversíveis e deletérios ao capim-amargoso.

5.4 CONCLUSÕES

Nesse trabalho a aplicação de dsRNAs em folhas resultou na à redução da expressão do gene *PDS* em 3, 5 e 10 dias após a aplicação, em 35% . A aplicação em solo de dsRNAs também levou a redução da expressão do gene *PDS* em 5 dias após a aplicação (37%), e 10 dias (11%) resultado que corrobora com a redução da massa seca em 24% no grupo tratado com dsRNA do gene *PDS*. Já a absorção pelas raízes houve redução da expressão relativa do gene *PDS* em 10 dias após a aplicação. Outros experimentos devem ser realizados como a aplicação de nanopartículas e outros polímeros que ofereçam proteção à molécula de dsRNA e ainda possam auxiliar na penetração em células vegetais.

REFERÊNCIAS

- BANAKAR, R. et al. Comparison of CRISPR-Cas9/Cas12a Ribonucleoprotein Complexes for Genome Editing Efficiency in the Rice Phytoene Desaturase (OsPDS) Gene. **Rice**, v. 13, n. 1, 2020.
- BENNETT, M. et al. Barriers to Efficient Foliar Uptake of dsRNA and Molecular Barriers to dsRNA Activity in Plant Cells. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. June, p. 1–7, 2020.
- CHEN, H. M. et al. 22-Nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 34, p. 15269–15274, 2010.
- DALAKOURAS, A. et al. Induction of silencing in plants by high-pressure spraying of In vitro-synthesized small RNAs. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1–5, 2016.
- DALAKOURAS, A. et al. Delivery of hairpin rnas and small rnas into woody and herbaceous plants by trunk injection and petiole absorption. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. August, p. 1–11, 2018.
- DEPKA, B.; JAHNS, P.; Y, A. T. B-Carotene to zeaxanthin conversion in the rapid turnover of the D1 protein of photosystem II. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 424, p. 267–270, 1998.
- DUBELMAN, S. et al. Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–7, 2014.
- DUBROVINA, A. S. et al. Induction of transgene suppression in plants via external application of synthetic dsRNA. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, 2019.
- DUBROVINA, A. S.; KISELEV, K. V. Exogenous RNAs for gene regulation and plant resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 2019.
- FERNÁNDEZ, V. et al. Physico-chemical properties of plant cuticles and their functional and ecological significance. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 19, p. 5293–5306, 2017.
- FERNANDEZ, V.; EICHERT, T. Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: Current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 28, n. 1–2, p. 36–68, 2009.
- GAZZIERO, D. L. P. et al. Estimating Yield Losses in Soybean Due to Sourgrass Interference. **Planta Daninha**, v. 37, n. 0, p. 1–10, 2019.
- HENDRIX, B. et al. Topically delivered 22 nt siRNAs enhance RNAi silencing of endogenous genes in two species. **Planta**, v. 254, n. 3, p. 1–16, 2021.
- KISELEV, K. V. et al. Physiological conditions and dsRNA application approaches for exogenously induced RNA interference in *Arabidopsis thaliana*. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 1–13, 2021.

- LAU, S. E. et al. dsRNA silencing of an R2R3-MYB transcription factor affects flower cell shape in a *Dendrobium* hybrid. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2015.
- LEE, W. S.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; KANYUKA, K. Barley stripe mosaic virus-mediated tools for investigating gene function in cereal plants and their pathogens: Virus-induced gene silencing, host-mediated gene silencing, and virus-mediated overexpression of heterologous protein. **Plant Physiology**, v. 160, n. 2, p. 582–590, 2012.
- LI, H. et al. New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. **Plant Cell and Environment**, v. 38, n. 11, p. 2277–2285, 2015.
- LIU, N. et al. Foxtail mosaic virus-induced gene silencing in monocot plants. **Plant Physiology**, v. 171, n. 3, p. 1801–1807, 2016.
- MAHER, M. F. et al. Plant gene editing through de novo induction of meristems. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 84–89, 2020.
- MITTER, N. et al. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. **Nature Plants**, v. 3, n. January, 2017.
- NUMATA, K. et al. Local gene silencing in plants via synthetic dsRNA and carrier peptide. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 8, p. 1027–1034, 2014.
- OLIVEIRA, R. R. et al. An efficient method for simultaneous extraction of high-quality RNA and DNA from various plant tissues. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 18828–18838, 2015.
- QIN, G. et al. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. **Cell Research**, v. 17, n. 5, p. 471–482, 2007.
- SAMMONS, R. D. et al. **polynucleotide molecules for gene regulation in plants** *Nature Protocols* St. Louis, MO (US), 2014.
- SANAN-MISHRA, N. et al. Secondary siRNAs in Plants: Biosynthesis, Various Functions, and Applications in Virology. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. March, p. 1–32, 2021.
- SCHWARTZ, S. H. et al. Carbon Dots for Efficient Small Interfering RNA Delivery and Gene Silencing in Plants. **Plant Physiology**, v. 184, n. October, p. 647–657, 2020.
- USLU, V. V. et al. High-Pressure-Sprayed Double Stranded RNA Does Not Induce RNA Interference of a Reporter Gene. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. December, p. 1–9, 2020.
- VARGAS, L.; ROMAN, E. S. **Conceitos e aplicações dos adjuvantes**. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do56.htm>. Acesso em: 3 mar. 2022.
- WANG, C. J.; LIU, Z. Q. Foliar uptake of pesticides-Present status and future challenge. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 87, n. 1, p. 1–8, 2007.
- WESTWOOD, J. H. et al. Weed Management in 2050: Perspectives on the Future of Weed Science. **Weed Science**, v. 66, n. 3, p. 275–285, 2018.

YAN, S. et al. Spray method application of transdermal dsRNA delivery system for efficient gene silencing and pest control on soybean aphid *Aphis glycines*. **Journal of Pest Science**, v. 93, n. 1, p. 449–459, 2020.

ZHANG, X.; GUO, H. mRNA decay in plants: both quantity and quality matter. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 35, p. 138–144, 2017.

ANEXO 1. Alinhamento das sequências do gene *PDS*

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

```

Sobic.006G232600.1      TTAAGTGTCTATGCAGACATGTCAGTAACCTGCAAGGAATACTATGATCCAAACCGTTCA
Diginsu.dsPDS          -----GTTC
Seita.9G515900.1      TTAAGTGTCTATGCAGACATGTCAGTAACCTGCAAGGAATACTATGATCCAAACCGTTCA
Sevir.9G520400.1      TTAAGTGTCTATGCAGACATGTCAGTAACCTGCAAGGAATACTATGATCCAAACCGTTCA
Pahal.I00717.1        TTAAGTGTCTATGCAGACATGTCAGTAACCTGCAAGGAATACTATGATCCAAACCGTTCA
Pavir.Ib00534.1      TTAAGTGTCTATGCAGACATGTCAGTAACCTGCAAGGAATACTATGATCCAAACCGTTCA
                        *****

Sobic.006G232600.1      ATGCTGGAGTTGGTCTTTGCTCCTGCAGATGAATGGATTGGTTCGAAGTGACACTGAAATC
Diginsu.dsPDS          ATGTTGGAGTTGGTCTTTGCTCCTGCAGAGGAATGGATTGGACGAAGTGAAACTGAAATC
Seita.9G515900.1      ATGCTGGAGTTGGTCTTTGCTCCTGCAGAGGAGTGGGTTGGTTCGAAGTGACACTGAAATC
Sevir.9G520400.1      ATGCTGGAGTTGGTCTTTGCTCCTGCAGAGGAGTGGGTTGGTTCGAAGTGACACTGAAATC
Pahal.I00717.1        ATGCTGGAGTTGGTCTTTGCTCCTGCAGAGGAGTGGGTTGGTTCGAAGTGACACTGAAATC
Pavir.Ib00534.1      ATGCTGGAGTTGGTCTTTGCTCCTGCAGAGGAGTGGGTTGGTTCGAAGTGACACTGAAATC
                        *** * ** * ***** ** * ** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

Sobic.006G232600.1      ATTGATGCAACTATGGAAGAGCTAGCCAAGTTATTTCCCTGATGAAATTGCTGCCGACCAG
Diginsu.dsPDS          ATTGATGCAACTATGGAAGAGCTAGCCAAGTTATTTCCCTGATGAAATTGCTGCCGATCAG
Seita.9G515900.1      ATCGATGCGACTATGGAAGAGCTAGCCAAGTTGTTTCCCTGATGAAATCGCTGCCGATCAG
Sevir.9G520400.1      ATCGATGCGACTATGGAAGAGCTAGCCAAGTTGTTTCCCTGATGAAATCGCTGCCGATCAG
Pahal.I00717.1        ATTGATGCAACTATGGAAGAGCTAGCCAAGTTATTTCCCTGATGAAATTGCTGCCGATCAG
Pavir.Ib00534.1      ATTGATGCAACTATGGAAGAGCTAGCCAAGTTATTTCCCTGATGAAATTGCTGCCGATCAG
                        ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

Sobic.006G232600.1      AGTAAAGCAAAGATTCTTAAGTATCATATTGTGAAGACACCGAGATCGGTTTACAAAAC
Diginsu.dsPDS          AGTAAAGCAAAGATCCTTAAGTATCATATTGTGAAGACACCGAGATCGGTTTACAAAAC
Seita.9G515900.1      AGTAAAGCAAAGATTCTTAAGTATCATATTGTGAAGACACCGAGATCGGTTTACAAAAC
Sevir.9G520400.1      AGTAAAGCAAAGATTCTTAAGTATCATATTGTGAAGACACCGAGATCGGTTTACAAAAC
Pahal.I00717.1        AGTAAAGCAAAGATTCTTAAGTATCATATTGTGAAGACACCGAGATCGGTTTACAAAACA
Pavir.Ib00534.1      AGTAAAGCAAAGATTCTTAAGTATCATATTGTGAAGACACCGAGATCGGTTTACAAAAC
                        ***** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

Sobic.006G232600.1      GTTCCAAACTGTGAACCTTGCCGACCTCTCCAAAGGTCACCGATTGAGGGTTTCTATCTG
Diginsu.dsPDS          GTTCCAAACTGTGAACCTTGCCGACCTCTCCAAAGGTCACCGATTGAGGGTTTCTATTTG
Seita.9G515900.1      GTTCCAAACTGTGAACCTTGCCGACCTCTCCAAAGGTCACCGATTGAGGGTTTCTATCTG
Sevir.9G520400.1      GTTCCAAACTGTGAACCTTGCCGACCTCTCCAAAGGTCACCGATTGAGGGTTTCTATCTG
Pahal.I00717.1        GTTCCAAACTGTGAACCTTGCCGACCTCTCCAAAGGTCACCGATTGAGGGTTTCTATCTG
Pavir.Ib00534.1      GTTCCAAACTGTGAACCTTGCCGACCTCTCCAAAGGTCACCGATTGAGGGTTTCTATCTG
                        ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

Sobic.006G232600.1      GCTGGTGATTACACAAAGCAGAAATACTTGGCTTCCATGGAAGGTGCAGTTTTATCCGGG
Diginsu.dsPDS          GCTGGCGATTACACAAAGCAGAAATACTTGGCTTCCATGGAAGGTGCAGTATTATCTGGG
Seita.9G515900.1      GCTGGCGATTACACAAAGCAGAAATACTTGGCTTCCATGGAAGGTGCAGTATTATCTGGG
Sevir.9G520400.1      GCTGGCGATTACACAAAGCAGAAATACTTGGCTTCCATGGAAGGTGCAGTATTATCTGGG
Pahal.I00717.1        GCTGGCGATTACACAAAGCAGAAATACTTGGCTTCCATGGAAGGTGCAGTTTTATCTGGG
Pavir.Ib00534.1      GCTGGCGATTACACAAAGCAGAAATACTTGGCTTCCATGGAAGGTGCAGTTTTATCCGGG
                        ***** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

Sobic.006G232600.1      AAGCTTTGCGCCAGTCTATAGTGCAGGATTATAGCAGGCTTCTCCCTCAGGAGCCAGAAA
Diginsu.dsPDS          AAGC-----
Seita.9G515900.1      AAGCTTTGCGCCAGTCTATAGTGCAGGATTATAGCAGGCTTCTCCCTCAGGAGTCAGAAA
Sevir.9G520400.1      AAGCTTTGCGCCAGTCTATAGTGCAGGATTATAGCAGGCTTCTCCCTCAGGAGTCAGAAA
Pahal.I00717.1        AAGCTTTGCGCCAGTCTATAGTGCAGGATTATAGCAGGCTTCTCCCTCAGGAGCCAGAAA
Pavir.Ib00534.1      AAGCTTTGCGCCAGTCTATAGTGCAGGATTATAGCAGGCTTCTCCCTCAGGACTCAGAAA
                        ****

```