



# Simpósio de Integração Acadêmica

## “Ciências Básicas para o Desenvolvimento Sustentável”

SIA UFV 2023



### RNA de interferência: uma nova perspectiva para silenciamento de genes em *Hemileia vastatrix*

SILVA, B.P.<sup>1</sup>, MENDES, T.A.O.<sup>1</sup>, CASTRO, I.S.L.<sup>1</sup>, CAIXETA, E.T.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Biology, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil; <sup>2</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA Café, Distrito Federal, Brasília, Brasil.

**Palavras-chave:** RNAi, silenciamento gênico, HT115.

**Área Temática:** Ciências Agrárias; **Grande Área:** Bioquímica; **Modalidade:** Pesquisa.

#### Introdução

A ferrugem do café, principal doença que afeta os cafeeiros, é causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* e é responsável por causar grandes prejuízos às plantações e perdas econômicas. Além do uso de fungicidas para o controle da doença, o uso de cultivares resistentes é uma opção, mas cultivares com resistência duradoura têm sido um desafio para os produtores. Nesse contexto, as abordagens baseadas em RNA de interferência ganharam destaque como uma opção para o controle de *H. vastatrix*.

#### Objetivos

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de protocolos de extração de dsRNA e a produção de formulação à base de dsRNA encapsulado para *Hemileia vastatrix*.

#### Material e Método

Um gene essencial de *H. vastatrix* foi selecionado por meio de genômica comparativa e primers específicos foram desenhados e usados em reações em cadeia da polimerase (PCR) para testar sua especificidade. A sequência alvo foi ligada ao vetor de clonagem de plasmídeo pGEM®-T Easy e o vetor foi transformado por choque térmico em DH5α e, posteriormente, em *E. coli* HT115 (Figura 1). A extração de DNA de plasmidial das bactérias transformadas foi realizada pelo método de lise alcalina e esses plasmídeos foram sequenciados para confirmar que a transformação fosse confirmada. A produção de dsRNA heterólogo foi realizada em meio LB contendo antibióticos seletivos e IPTG. A síntese de cDNA para uso em PCR foi realizada para confirmar a expressão do gene alvo. Por fim, foi produzida uma formulação contendo o dsRNA para aplicação em folhas do cafeeiro.

#### Apoio financeiro e Agradecimentos



#### Resultados e Discussão

O alvo selecionado foi uma polimerase que provou ser específica para *H. vastatrix*. A bactéria HT115, deficiente em genes de RNase III e responsável pela degradação de dsRNA, foi eficientemente transformada com o gene alvo, resultando em um rendimento considerável de produção de dsRNA. O sequenciamento dos plasmídeos confirmou a transformação e a síntese de cDNA seguida de PCR validou a expressão dessas moléculas (Figura 2). Com o dsRNA produzido e devidamente confirmado, foi possível produzir a formulação com o encapsulamento foi validada em casa de vegetação e em campo.

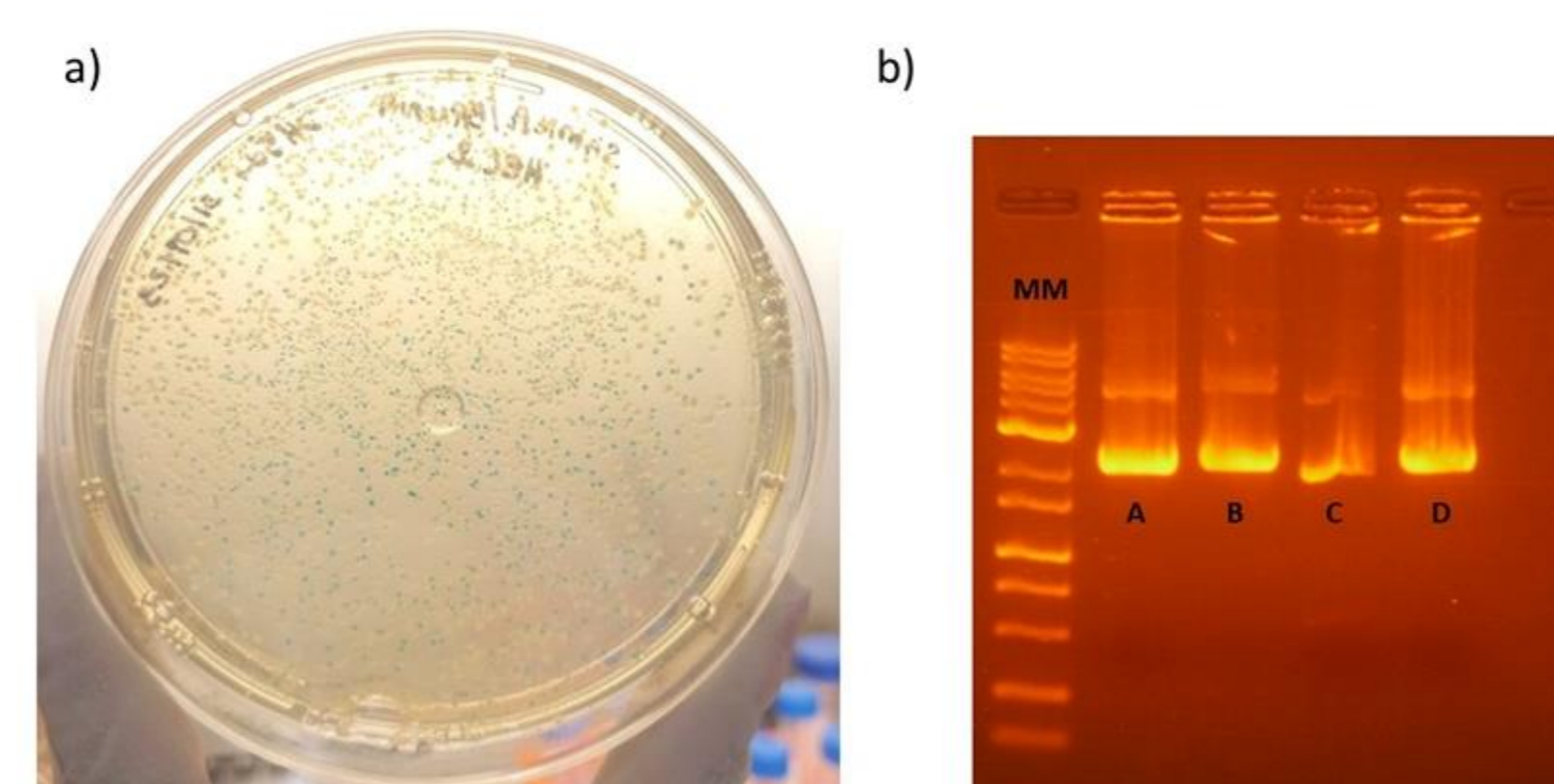


Figura 1: a) Placa da bactéria DH5α após a transformação. As colônias brancas são as transformadas e as azuis são as não transformadas. b) Gel de agarose de 1% da miniprep após a multiplicação das colônias de bactérias transformadas (A, B, C e D).

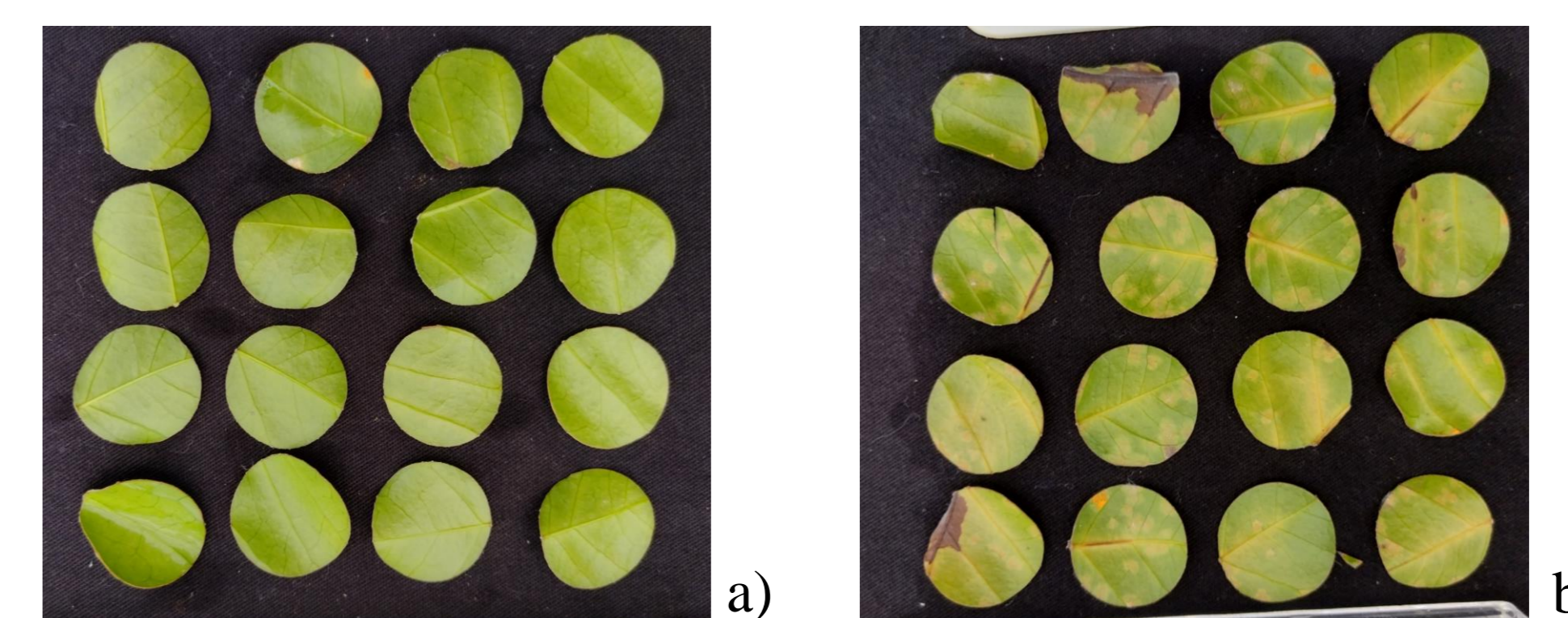


Figura 2: a) Gerbox com os discos das folhas que foram aplicadas a formulação contendo dsRNA para *Hemileia vastatrix*. b) Gerbox com o controle negativo, sem a presença de formulação.

#### Conclusões

Portanto, pode-se concluir que nesse trabalho foram desenvolvidos protocolos eficientes de extração e purificação do dsRNA em bactérias *E. coli*. e, com isso, essa metodologia poderá ser usada para silenciamento gênico por meio do mecanismo de RNAi e visando apenas a inativação do patógeno.

#### Bibliografia

Ferrugem-do-cafeeiro e os impactos nas lavouras de café . Disponível em: <<https://portal.syngenta.com.br/noticias/ferrugem-do-cafeeiro-e-os-impactos-para-as-lavouras-do-cafe/>>. Acesso em: 24 conjuntos. 2023.

Cultivares de café resistentes à ferrugem: alternativa viável para a cafeicultura das Matas de Minas . Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1138046/1/Embrapa-Cafe-Docmentos-15.pdf>>. Acesso em: 24 conjuntos. 2023.