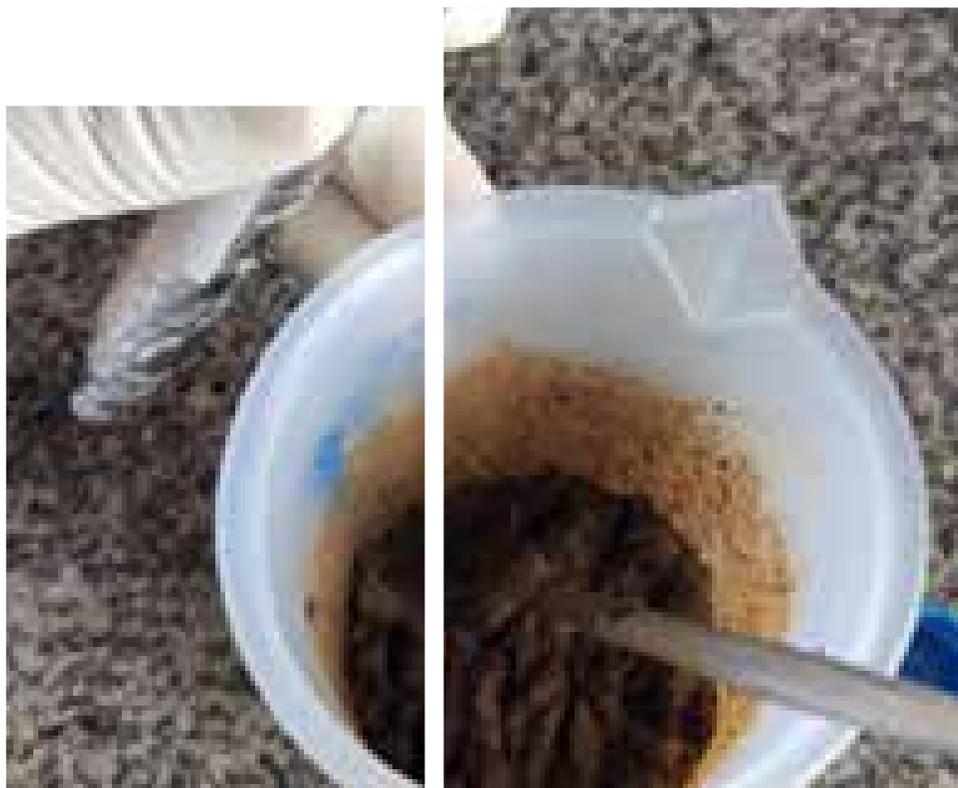


Metodologia para extração e detecção de dsRNA em solo



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
141**

**Metodologia para extração e
detecção de dsRNA em solo**

*Jonatha dos Santos Silva
Márcio Leandro da Silveira Fonseca
Eduardo Chumbinho de Andrade*

**Embrapa Mandioca e Fruticultura
Cruz das Almas, BA
2022**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Mandioca e Fruticultura

Rua Embrapa, s/nº, Caixa Postal 07
44380-000, Cruz das Almas, Bahia
Fone: 75 3312-8048
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Mandioca e Fruticultura

Presidente
Eduardo Chumbinho de Andrade

Secretária-executiva
Maria da Conceição Pereira da Silva

Membros
*Ana Lúcia Borges, Áurea Apolinário de
Albuquerque Gerum, Cinara Fernanda Garcia
Morales, Harllen Sandro Alves Silva, Herminio
Souza Rocha, Jailson Lopes Cruz, José
Eduardo Borges de Carvalho, Paulo Ernesto
Meissner Filho, Tatiana Goes Junghans*

Supervisão editorial
Eduardo Chumbinho de Andrade

Revisão de texto
Alessandra Angelo

Normalização bibliográfica
Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
*Anapaula Rosário Lopes
Andreza dos Santos Lima*

Foto da capa
Jonatha dos Santos Silva

1ª edição
Publicação digital (2022): PDF

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Mandioca e Fruticultura

Silva, Jonatha dos Santos

Metodologia para extração e detecção de dsRNA em solo / Jonatha dos
Santos Silva, Márcio Leandro da Silveira Fonseca, Eduardo Chumbinho de
Andrade – Cruz das Almas, BA : Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2022.

18 p. il. 22 cm. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/ Embrapa
Mandioca e Fruticultura, ISSN 1809-5003 ; 141).

1. Praga de planta. 2. Solo. 3. Controle biológico. I. Título. II. Série.

CDD 629.97

Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro (CRB5 – 11/61)

© Embrapa, 2022

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução.....	8
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	13
Conclusões.....	16
Referências	17

Metodologia para extração e detecção de dsRNA em solo

Jonatha dos Santos Silva¹

Márcio Leandro da Silveira Fonseca²

Eduardo Chumbinho de Andrade³

Resumo – A tecnologia do RNA interferente (RNAi) tem sido uma das abordagens mais promissoras para a proteção de plantas contra pragas. O mecanismo é ativado por moléculas de RNA fita dupla (dsRNA). A aplicação de produtos formulados com dsRNA para o controle de pragas poderá ser realizado tanto via pulverização foliar ou diretamente no solo e ser absorvido pelas raízes. Estas duas formas de aplicação resultarão em potencial acúmulo de dsRNA no solo, o que levanta questionamentos quanto a possíveis efeitos adversos em organismos residentes no solo. Apesar de evidências sugerirem que o dsRNA aplicado ao solo é rapidamente degradado, é necessário que metodologias de extração e detecção de dsRNA no solo estejam disponíveis para que estudos de segurança ambiental possam ser conduzidos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um método para extração e detecção de dsRNA no solo. Para isso, foram coletadas amostra de solo em duas profundidades (0-10 cm e 10-20 cm) e, após serem homogeneizadas, foi aplicada uma solução contendo 7,5 µg de dsRNA em uma amostra de 50 gramas de solo de cada profundidade. Cada uma destas amostras de solo foi dividida em subamostras de 1 grama, que foram mantidas no escuro a temperatura ambiente por diferentes períodos de incubação. Para extração do dsRNA, cada subamostra de solo foi ressuspensa em 10 mL de tampão PBS-T e o sobrenadante foi coletado e filtrado. Cerca de 100 µL do filtrado foi utilizado para extração de RNA total. A detecção do dsRNA foi realizada tanto pela técnica de transcrição reversa seguida pela Reação em cadeia da Polimerase (RT-PCR) quanto pela PCR em tempo real (RT-qPCR). Empregando a metodologia desenvolvida, foi possível extrair e detectar as

¹ Biólogo, mestre em Ciências Agrárias.

² Graduando no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

³ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA

moléculas de dsRNA até 136 horas após aplicação no solo, indicando que a metodologia foi eficiente na extração e detecção do dsRNA no solo. Além disso, a molécula pode se manter detectável no solo por períodos mais longos que os avaliados neste trabalho.

Palavras-chave: RNA interferente, silenciamento gênico, controle de pragas.

Method for extraction and detection of dsRNA in soil

Abstract – RNA interference (RNAi) technology has been one of the most promising approaches for plant protection against pests. The mechanism is activated by double-stranded RNA (dsRNA) molecules. The application of products formulated with dsRNA for pest control can be carried out either via spraying or directly into the soil and be absorbed by the roots. These two forms of application will result in potential accumulation of dsRNA in the soil, which raises questions about possible adverse effects on soil-resident organisms. Although evidence suggests that dsRNA applied to soil is rapidly degraded, it is necessary that methodologies for extraction and detection of dsRNA in soil are available so that environmental safety studies can be conducted. Thus, the present work aimed to establish a method for extraction and detection of dsRNA in soil and to evaluate the residence time of these molecules in the soil. For this study, soil samples were collected at two depths (0-10 cm and 10-20 cm), and after being homogenized, a solution containing 7.5 µg of dsRNA was applied to a sample of 50 grams of soil at each depth. Each of these soil samples was subdivided into 1 gram subsamples, which were kept in the dark at room temperature for different incubation periods. For dsRNA extraction, the soil subsample was resuspended in 10 mL PBS-T buffer and the supernatant was collected and filtered. About 100 µL of the filtrate was used for total RNA extraction. The detection of dsRNA was performed either by reverse transcription followed by Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) or real-time PCR (RT-qPCR). Using the developed methodology, it was possible to extract and detect the dsRNA molecules up to 136 hours after application in the soil, indicating that the methodology was efficient in the extraction and detection of dsRNA in the soil. In addition, the molecule can remain detectable in the soil for periods longer than those evaluated in this work.

Keywords: RNA interference, gene silencing, pest control.

Introdução

RNA interferente (RNAi) é um mecanismo natural que ocorre em células eucarióticas e está envolvido na regulação gênica e defesa antiviral. O mecanismo é ativado por moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA) e resulta na degradação de RNAs mensageiros (mRNAs) homólogos ao dsRNA (Fire et al., 1998). A especificidade do mecanismo permite o silenciamento de genes essenciais a um único organismo-alvo, reduzindo possíveis efeitos adversos sobre organismos não alvo, o que torna a tecnologia, conceitualmente, o defensivo “ideal” no controle de pragas (Andrade; Hunter, 2016).

O RNAi apresenta uma ampla adaptabilidade de uso e pode ser empregado no controle de pragas tanto utilizando estratégias transformativas, via desenvolvimento de plantas transgênicas expressando dsRNA, como não transformativa, via formulação de produtos à base de dsRNA, estratégia que tem se tornado o principal foco da pesquisa para fins comerciais, visto que possibilita o uso da tecnologia para o controle de diferentes pragas em qualquer cultura, principalmente aquelas em que não há interesse comercial ou que possa haver resistência do consumidor em adquirir produtos transgênicos (Cagliari et al., 2019).

O desenvolvimento de produtos formulados com dsRNA para o controle de determinados grupos de insetos se mostra mais desafiador que para outros (Bolognesi et al., 2012; Katoch; Thakur, 2012; Bachman et al., 2013; Shukla et al., 2016). Para hemípteras como *Diaphorina citri*, vetor da bactéria causadora do Huanglongbing (HLB) dos citros, que são insetos sugadores, é necessário que as moléculas de dsRNA estejam presentes no sistema vascular das plantas. Neste sentido, o método de disponibilização do dsRNA é um dos principais desafios para o controle desses organismos (Christiaens; Smagghe, 2014). Nestes casos, a aplicação do dsRNA diretamente ao solo pode ser uma alternativa possível de ser incorporada às culturas irrigadas, uma vez que o dsRNA pode ser absorvido pelas raízes, ou o desenvolvimento de formulações que favoreçam a absorção foliar do dsRNA após pulverização (Hunter et al., 2012; Li et al., 2015). Entretanto, qualquer que seja a alternativa de aplicação, há questionamentos quanto a possíveis interações das moléculas de dsRNA com o meio ambiente após sua aplicação, demandando a avaliação de possíveis riscos ambientais relacionados ao uso de produtos baseados no RNAi. Estes questionamentos estão associados a potenciais efeitos ao ecossistema ou ameaças a espécies não alvo por meio de interações entre

as moléculas de dsRNAs e organismos nativos (Auer; Frederick, 2009). Há uma atenção especial para o possível acúmulo de moléculas de dsRNA em solos cultivados, visto que este é o principal receptor de produtos agrícolas aplicados nas plantas (Pietramellara et al., 2009; Fischer et al., 2016).

Neste sentido, é necessário o desenvolvimento de pesquisas que visem determinar o destino, possíveis rotas e duração de exposição de um defensivo à base de dsRNA ao ser liberado no ambiente (Fischer et al., 2016; Parker; Sander, 2017; Zhang et al., 2020). Não obstante, pesquisas apontam para uma alta suscetibilidade das moléculas de dsRNA, assim como outros ácidos nucleicos (DNA e RNA fita simples) às condições adversas do meio ambiente, como radiação ultravioleta do sol, degradação microbiana, ação de nucleases, entre outros fatores (Pietramellara et al., 2009; Fischer et al., 2016). Especificamente no caso de dsRNA, os dados disponíveis até o momento demonstram que não é possível detectar o dsRNA em período superior a 72 horas após sua aplicação em solo (Zhang et al., 2020). Além disso, sua concentração cai drasticamente dentro das primeiras 16 horas, mesmo em solos com baixa atividade microbiana (Dubelman et al., 2014; Parker et al., 2019; Zhang et al., 2020). Entretanto, os dados gerados nestes trabalhos foram obtidos manuseando solos de regiões temperadas, que geralmente apresentam pH mais elevado e alta concentração de nutrientes na solução do solo e, ainda, abordagens experimentais que não replicaram condições próximas às encontradas naturalmente, como, por exemplo, a secagem e moagem do solo antes da aplicação do dsRNA.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um método para extração e detecção de dsRNA em solos tropicais, que, geralmente, apresentam pH ácido e baixa concentração de nutrientes na solução do solo, visando possibilitar estudos futuros quanto à dinâmica de degradação de dsRNA em solos agrícolas nas diferentes regiões brasileiras.

Material e métodos

Seleção do dsRNA e do local para coleta do solo

O dsRNA utilizado para execução deste experimento é homólogo ao gene da proteína fluorescente verde (Green fluorescent protein, GFP – dsRNA-GFP) (Acesso n° AJ306911.1 do Genbank), que é colocado como um gene referência ou controle.

A amostra de solo foi coletada na área onde está estabelecido o Banco Ativo de Germoplasma de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF) em Cruz das Almas, BA, 12°40'39" Sul, 39°06'23" Oeste de Greenwich. A amostra de solo foi coletada na região abaixo da copa da planta de citros, a aproximadamente 1,5 m de distância do tronco. O solo é um Latossolo Amarelo Distrocoeso de textura franco-arenosa, apresentando os atributos químicos e físicos descritos na Tabela 1 (Souza; Souza, 2001).

Tabela 1. Atributos físicos e químicos do solo utilizado no estudo. Cruz das Almas, BA.

Profundidade (cm)	Atributos físicos			Atributos químicos		
	Areia (%)	Silte (%)	Argila (%)	pH (H ₂ O)	CTC	M.O
0-20	g kg ⁻¹				cmol _c dm ⁻³	g kg ⁻¹
	715	103	182	7,0	6,10	30,0

Coleta de solo e aplicação do dsRNA

A amostra de solo foi coletada com o auxílio de tubo galvanizado de 5/8" que foi inserido no solo até a profundidade de 20 cm (Figura 1A e 1B). Após coleta, a amostra foi separada em duas profundidades, de 0-10 cm e 10-20 cm. Cada uma das amostras obtidas foi homogeneizada sem passar por peneiramento ou secagem prévia, obtendo-se uma amostra de 50 g de solo que foi empregada para a montagem do experimento. Em cada uma das amostras foram adicionados 3 mL de solução aquosa contendo um total de 7,5 µg de dsRNA-GFP. Após adição, cada uma das amostras foi homogeneizada e dividida em subamostras com cerca de 1 g de solo com dsRNA que foram transferidas individualmente para tubos de 15 mL (Figura 1 C). Todos os tubos foram vedados com papel alumínio, com a finalidade de simular a baixa luminosidade da rizosfera, e mantidos no laboratório à temperatura ambiente por períodos de incubação preestabelecidos (1, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120 e 136 horas). Cada um dos períodos de incubação teve duas repetições para cada uma das profundidades avaliadas. Como controle negativo foram coletadas subamostras de solo de ambas profundidades antes da adição da solução de dsRNA-GFP. Estas subamostras sem adição também foram submetidas à extração de RNA.

Extração de RNA total das amostras de solo

Para a extração do dsRNA, foram adicionados 10 mL de tampão PBS-T (1 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,001% Tween 20, pH 7,0) em cada tubo contendo o solo. Após suspensão e homogeneização do solo em um agitador tipo vortex, 1,5 mL do sobrenadante foi coletado com o auxílio de uma seringa (5 mL) e submetido à filtração utilizando o filtro Chromafil® Xtra PET 25 mm 0,45 μm (Macherey-Nagel) (Figura 1 D). Em seguida, 100 μL do filtrado foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e o RNA total foi extraído aplicando o reagente TRIzol® (ThermoFisher), seguindo protocolo do fabricante. O RNA total extraído foi ressuspendido em 30 μL de água livre de nucleases.



Fotos: Jonatha dos Santos Silva

Figura 1. Montagem do experimento para extração de dsRNA em solo. Coleta da amostra de solo em área de plantação de citros (A e B). Transferência da amostra de solo para tubos de 15 mL após adição do dsRNA-GFP (C). Filtração da amostra após suspensão em tampão PBS-T (D).

Reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)

O RNA total foi submetido à síntese do cDNA operando o kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription” (ThermoFisher). Para reação, em um microtubo de 200 µL, foram adicionados 10 µL do RNA total, o microtubo foi incubado a 70 °C por 2 min e em seguida transferido para um recipiente com gelo. Ao RNA total foram adicionados 2,0 µL do tampão 10 x RT, 0,8 µL dNTP (100 mM), 2,0 µL de iniciadores randômicos, 1,0 µL da enzima Transcriptase Reversa MultiScribe™ (50 U/µL) e 4,2 µL de água livre de nucleases. Após homogeneização, as amostras foram incubadas a 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min, 85 °C por 5 min, e as reações mantidas em 4 °C até retirada do aparelho. O controle positivo foi obtido a partir da reação de transcrição reversa manejando 1,0 µL da solução de dsRNA-GFP (5 ng/µL) usada no tratamento das amostras de solo.

Para reação de PCR convencional, empregou-se o kit comercial GoTaq® MDx DNA Polymerase (Promega) e iniciadores (primers) específicos para o dsRNA-GFP (Tabela 2). Para a reação foram aplicados 2 µL do cDNA, 10 mM de cada primer (GFP R3/GFP F3; Tabela 2), 4 µL de tampão 5X Green GoTaq®, 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de dNTPs a 10 mM, 0,3 µL de GoTaq® MDx DNA Polymerase (5 U/ µL) e 5,7 µL de água livre de nucleases, totalizando 20 µL. A reação de amplificação foi realizada com as seguintes condições de amplificação: 94 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 50 segundos, uma etapa a 72 °C por 5 min, e mantidas em 4 °C até a retirada do aparelho. Ao final da reação foram adicionados 4 µL de GelRed® (10x) e as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Tabela 2. Iniciadores usados para detecção do dsRNA-GFP por RT-PCR e qPCR.

Iniciadores	Sequência (5' para 3')	Fragmento amplificado (pares de base)
GFP R3	TAC AAG ACA CGT GCT GAG GT	383
GFP F3	TGG TAA AAG GAC AGG GCC AT	
GFP R4	GTG CAG GAG AGG ACC ATC TT	134
GFP F4	CTT GTG GCC GAG GAT GTT TC	

Para reação de PCR em tempo real (qPCR), foi operado o kit SYBR™ Select Master Mix (ThermoFisher). Em cada reação foram adicionados 1 µL de cDNA, 10 mM de cada primer (GFP R4/F4; Tabela 2), 7,5 µL 2 x master Mix e 4,5 µL de água livre de nucleases, totalizando 15 µL. As amostras foram incubadas no termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System, e submetidas a 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 min e finalizadas pela análise da curva de dissociação entre 72 °C e 95 °C.

Resultados e discussão

O avanço em direção à geração e disponibilização de produtos à base de dsRNA para uso agrícola levanta questões sobre o acúmulo destas moléculas no ambiente e o seu potencial dano ambiental. Os solos são os principais acumuladores de produtos aplicados em ambientes agrícolas seja pela lavagem dos produtos aplicados na parte aérea das plantas ou adicionados diretamente no solo. Neste sentido, o estabelecimento de uma metodologia para detecção e monitoramento do processo de acúmulo e da dinâmica de degradação de dsRNA no solo se torna uma importante ferramenta para estudos de avaliação de risco e impacto ambiental destes produtos.

Utilizando o protocolo de extração descrito neste trabalho, foi possível extrair o RNA total das amostras de solo mantidas à temperatura ambiente em todos os intervalos avaliados (1 a 136 horas). O RNA total obtido foi submetido ao teste de RT-PCR para a detecção da presença do dsRNA-GFP. O resultado do teste mostrou amplificação de bandas com o tamanho esperado (~383 pb), comprovando que o dsRNA estava presente em todas as amostras de solo avaliadas (Figura 2).

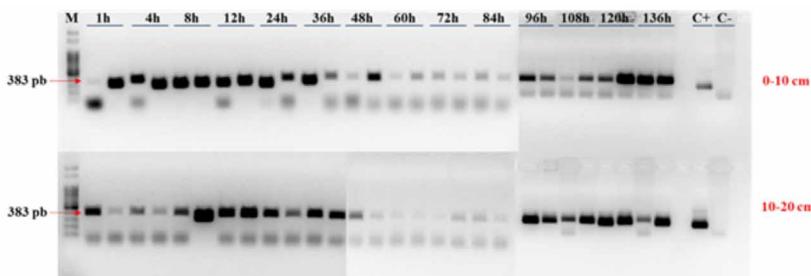


Figura 2. Eletroforese dos produtos da reação de RT-PCR para detecção do dsRNA-GFP no solo após diferentes períodos de incubação. Seta vermelha indica o fragmento amplificado. C+ = controle positivo. C- = Controle negativo. M: marcador molecular 100 pb (ThermoFisher).

O RNA total extraído das amostras de ambas as profundidades também foi submetido ao teste qPCR que, por ser uma técnica bem mais sensível que a RT-PCR convencional, é uma ferramenta necessária para se detectar quantidades reduzidas de dsRNA que estejam abaixo do limite de detecção da RT-PCR. Como esperado, o teste de qPCR detectou a presença do dsRNA em todas as amostras e em todos os períodos de incubação para ambas as profundidades (Figura 3), confirmando o resultado da RT-PCR. A especificidade da amplificação pode ser confirmada ao observar a uniformidade da curva de dissociação realizada após a reação da qPCR (Figura 3, canto inferior). A curva de dissociação é gerada pelo equipamento (termociclador) ao submeter o fragmento amplificado gerado durante reação de qPCR a um aumento gradativo de temperatura, que resulta na diminuição da fluorescência das amostras em virtude da dissociação da fita dupla do DNA e consequente liberação do corante SyberGreen.

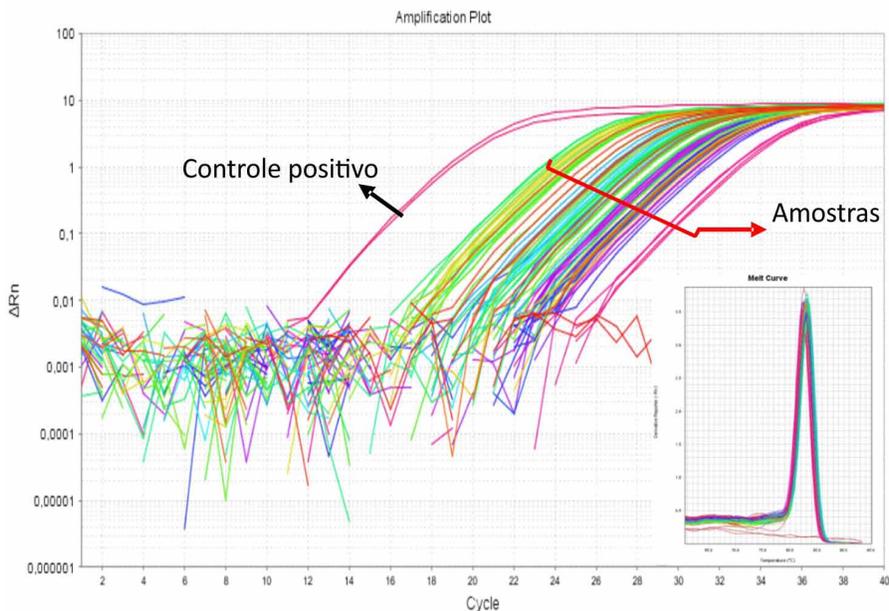


Figura 3. Curva de amplificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para as amostras de 1 a 136 horas para as profundidades de 0-10 e de 10-20 cm. Todas as amostras testaram positivas para a presença do dsRNA-GFP. A especificidade da amplificação pode ser observada pelo pico único e uniforme na curva de dissociação (canto inferior direito da imagem).

Estes resultados demonstraram que a metodologia de extração foi capaz de obter um RNA total de qualidade, permitindo a detecção do dsRNA-GFP, tanto por RT-PCR quanto por qPCR, em todas as amostras analisadas. Além disso, os resultados evidenciaram que o dsRNA-GFP permaneceu estável no solo coletado até 20 cm de profundidade e nas condições experimentais utilizadas por pelo menos 136 horas após sua aplicação. Importante ressaltar que a variação nas intensidades das bandas amplificadas por RT-PCR observadas nos diferentes períodos de incubação não reflete a quantidade de dsRNA presente nas amostras de solo no momento da extração, isto porque para a reação de síntese do cDNA optou-se em adicionar o volume máximo possível de RNA na reação (10 μL) em vez de se empregar uma quantidade padronizada de RNA para todas as amostras. Assim, amostras que ao final do processo de extração tinham maior concentração de RNA total, consequentemente mais dsRNA, resultaram na amplificação de bandas de maior intensidade. O mesmo raciocínio deve ser aplicado ao resultado da qPCR, em que não há como comparar os valores de "Ct" obtidos por cada amostra e associar à maior quantidade de dsRNA na amostra de solo. A ausência de padronização da concentração de RNA total entre as amostras impede que se faça uma avaliação da dinâmica de degradação do dsRNA-GFP ao longo do tempo.

Trabalhos anteriores apontaram para uma permanência menor do dsRNA no solo, entre 48 horas e 72 h após aplicação no solo ((Dubelman et al., 2014; Zhang et al., 2020). A diferença no tempo de permanência observada neste trabalho e outros já realizados pode ser devido a características dos solos utilizados nos diferentes experimentos, ou ainda, pelo método experimental adotado em cada um dos trabalhos. Dubelman et al. (2014) avaliaram a degradação de dsRNA em solos com texturas franco-arenosa, franco-siltosa e franco argilosa, com teores de matéria orgânica (MO) entre 17-51 g kg^{-1} e pH variando entre 5,5 e 7,1, e determinaram que o tempo de permanência do dsRNA foi de 48 h, independentemente do tipo de solo. Similarmente, Zhang et al. (2020) estudaram a degradação de dsRNA em solos de textura argilo-siltoso (51 g kg^{-1} de MO, pH 6,95) e franco-arenoso (28 g kg^{-1} de MO, pH 7,31), e detectaram o dsRNA nos dois tipos de solo até 72 h. Relativo ao método experimental, em ambos os trabalhos o solo usado nos experimentos foi coletado, seco em estufa e moído, para então ser adicionada a solução com dsRNA, procedimento diferente do realizado neste trabalho, no qual o

solo de cada profundidade foi coletado, homogeneizado e misturado à solução de dsRNA. Quanto aos métodos de detecção do dsRNA operados no solo, Dubleman et al. (2014) empregaram o QuantiGene (Thermo-Fischer), enquanto que Zhang et al. (2020) aplicaram o RT-qPCR, mesmo usado neste trabalho, sendo que ambos os métodos apresentam elevada sensibilidade. Desta forma, é possível que o processamento do solo antes da montagem do experimento possa ter alguma influência no tempo de degradação do dsRNA no solo. Contudo, para confirmar esta hipótese será necessário realizar estudos da dinâmica de degradação de dsRNA no solo submetido a estas duas formas de preparo, o que não é objetivo deste trabalho.

Apesar de o solo variar em relação ao tamanho, forma e natureza das suas partículas em função da profundidade, em geral a MO se concentra nas camadas mais superficiais do solo (até 30 cm), talvez, por isso, não foram observadas diferenças para a detecção do dsRNA nas duas profundidades avaliadas, de 0-10 e de 10-20 cm (Bernoux et al., 2002). Porém, a maior presença de impurezas oriundas da matéria orgânica (ácidos orgânicos, nucleases e outras moléculas com potencial inibidor da RNA e DNA polimerases) podem afetar a reação RT-PCR e qPCR. Por esta razão, a etapa de filtragem do sobrenadante obtido após suspensão do solo em tampão PBS-T em microfiltro de 0,45 µm foi uma etapa essencial para o processo de extração e detecção do dsRNA, uma vez que atua de forma direta na retenção destas impurezas, influenciando diretamente na qualidade do RNA total extraído e, conseqüentemente, no resultado das reações de RT-PCR e qPCR. Testes para detecção do dsRNA-GFP que utilizaram o RNA total extraído diretamente do sobrenadante não filtrado não resultaram na amplificação do fragmento do dsRNA-GFP por RT-PCR, possivelmente devido à presença de contaminantes que inibiram a reação.

Conclusões

O método de extração de dsRNA do solo se mostrou eficiente, resultando em um RNA total de qualidade que pode ser empregado na detecção de dsRNA tanto por RT-PCR quanto por métodos mais sensíveis como o de RT-qPCR.

Ficou constatado que os solos coletados nas profundidades 0-10 e de 10-20 cm não apresentaram diferenças no processo de degradação da molécula de dsRNA.

A detecção da presença do dsRNA-GFP 136 h após aplicação em solo foi superior aos valores relatados na literatura científica, o que requer estudos com períodos de observação mais prolongados para se determinar com maior precisão o tempo estimado para a degradação do dsRNA no solo.

Referências

ANDRADE, E. C., HUNTER, W. B. RNA Interference – natural gene-based technology for highly specific pest control (HiSPeC). **InTech**. v.1, p.391-409, 2016.

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

BACHMAN, P. M., R. BOLOGNESI, W. J. MOAR, G. M. MUELLER, M. S. PARADISE, P. RAMASESHADRI, J. TAN, J.P. UFFMAN, J. WARREN, B. E. WIGGINS, AND S. L. LEVINE. Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity Against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera* LeConte). **Transgenic Research**, v.22, p.1207-1222, 2013.

BERNOUX, M., CARVALHO, M. C. S, VOLKOFF, B., CERRI, C. C. Brazil's Soil Carbon Stocks. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.66, p.888-896, 2002.

BOLOGNESI, R., RAMASESHADRI, P., ANDERSON, J., BACHMAN, P. M., CLINTON, W., FLANNAGAN, R., ILAGAN, O., LAWRENCE, C., LEVINE, S. MOAR, W., MUELLER, G., TAN, J., UFFMAN, J., WIGGINS, E., HECK, G. AND SEGERS, G. Characterizing the mechanism of action of Double-Stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera* LeConte). **PLoS One**, v.7, e47534, 2012.

CAGLIARI, D., DIAS, N. P., GALDEANO, D. M., DOS SANTOS, E. Á., SMAGGHE, G., ZOTTI, M. J. Management of pest insects and plant diseases by non-transformative RNAi. **Frontiers in Plant Science**, v.10, p.1-18, 2019.

CHRISTIAENS, O., SMAGGHE, G. The challenge of RNAi-mediated control of hemipterans. **Current Opinion Insect Science**, v. 6, p.15-21, 2014.

DUBELMAN, S., FISCHER, J., ZAPATA, F., HUIZINGA, K., JIANG, C., UFFMAN, J., LEVINE, S., CARSON, D. Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. **PLoS One**, v. 9, e93155, 2014.

FIRE, A. Z., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, A. S., DRIVER, S. E., MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.

FISCHER, J. R., ZAPATA, F., DUBELMAN, S., MUELLER, G. M., JENSEN, P. D., LEVINE, S. L. Characterizing a novel and sensitive method to measure dsRNA in soil. **Chemosphere**, v. p.161, 319-324, 2016.

HUNTER, W. B., GLICK, E., PALDI, N., BEXTINE, B. R. Advances in RNA interference: dsRNA treatment in trees and grapevines for insect pest suppression. **Southwest. Entomology**, v. 37, p.85–87, 2012.

KATOCH, R., THAKUR, N. Insect gut nucleases: a challenge for RNA interference mediated insect control strategies. **Int. J. Biochem. Biotechnol.**, v. 1, p.198-203, 2012.

LI, H., GUAN, R., GUO, H., MIAO, X. New insights into an RNAi approach for plant defense against piercing-sucking and stem-borer insect pests. **Plant Cell Environment**, v.38, 2277–2285, 2015.

PARKER, K. M., SANDER, M. Environmental fate of insecticidal plant-incorporated protectants from genetically modified crops: knowledge gaps and research opportunities **Environmental Science and Technology**, v. 51, p.12049-12057, 2017.

PARKER, K. M., BORRERO, V. B., VAN LEEUWEN, D. M., LEVER, M. A., MATEESCU, B., SANDER, M. Environmental fate of RNA interference pesticides: Adsorption and degradation of double-stranded RNA molecules in agricultural soils. **Environmental Science and Technology**, 53, 3027–3036, 2019.

PIETRAMELLARA, G., ASCHER, J., BORGOGNI, F., CECCHERINI, M. T., GUERRI, G., NANNIPIERI, P. Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. **Biology and Fertility of Soils**, v.45, p.219–235, 2009.

SHUKLA, J. N., KALSI, M., SETHI, A., NARVA, K. E., FISHILEVICH, E., SINGH, S., MOGILICHERLA, K., PALLI, S. R. Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. **RNA Biology**, v. 13, p. 656-669, 2016.

SOUZA, L. da S.; SOUZA, L. D. **Caracterização físico-hídrica de solos da área do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2001. 56 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 20).

ZHANG, K., WEI, J., HUFF HARTZ, K. E., LYDY, M. J., MOON, T.S., SANDER, M., PARKER, K. M. Analysis of RNA interference (RNAi) biopesticides: Double-stranded RNA (dsRNA) extraction from agricultural soils and quantification by RT-qPCR. **Environmental Science and Technology**, v. 54, 4893-4902, 2020.



Mandioca e Fruticultura



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL