

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE dsRNA EM *Escherichia coli*
HT115 PARA USO NA AGRICULTURA, COM FOCO NO
CONTROLE DO PSILÍDEO *Diaphorina citri***

LAYANNA REBOUÇAS DE SANTANA CERQUEIRA

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
MARÇO - 2020**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE dsRNA EM *Escherichia coli*
HT115 PARA USO NA AGRICULTURA, COM FOCO NO
CONTROLE DO PSILÍDEO *Diaphorina citri***

LAYANNA REBOUÇAS DE SANTANA CERQUEIRA

Bióloga

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2017

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca Fruticultura, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Eduardo Chumbinho de Andrade

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

MARÇO - 2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LAYANNA
REBOUÇAS DE SANTANA CERQUEIRA**

Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Orientador

Dra. Aline Simões da Rocha Bispo
UFRB

Dra. Talita Lopes Honorato
UFRB

“Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola em _____ conferindo o grau de Mestre em Microbiologia Agrícola em _____.”

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente na minha vida.

À minha família, principalmente ao meu filho Vinícius, pelo apoio, carinho e pela paciência e compreensão nos momentos de ausência.

Às minhas Irmãs de faculdade e de vida, Lívia, Letícia, Maiara, Samara e Thais por todo companheirismo e amizade, e por nunca soltarem a mão de ninguém.

Ao meu amigo Ninho pelo companheirismo, pela amizade e por dividir comigo todas as dores e alegrias da vida.

À turma 2018.1 do mestrado, Cleilton, Cristiane, Fernando, Mileide e principalmente Marília, pela amizade e por contribuir por uma jornada mais leve e divertida.

À Eduardo Chumbinho de Andrade pela orientação, suporte, paciência e confiança.

À equipe do Laboratório de Virologia, da Embrapa, Cícera, Jonatha, Danilo, Alírio e Márcio pelo apoio durante o trabalho e pela amizade.

À Aline Simões por compartilhar seus conhecimentos colaborando para análises do trabalho.

À Capes, pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola (PPGMA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) e à Embrapa Mandioca e Fruticultura.

A todas as pessoas mesmo que não citadas, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 1 - Composição dos meios de cultivo	42
Tabela 2 - Valores codificados e reais utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 para análise de produção de dsRNA em diferentes concentrações de IPTG e temperatura....	42
Tabela 3 - Matriz do delineamento fatorial com as diferentes concentrações de IPTG e temperatura para determinação do rendimento (ng/mL) de dsRNA à densidade óptica 0,7.....	45
Tabela 4 - Matriz do delineamento fatorial com as diferentes concentrações de IPTG e temperatura para determinação do rendimento (ng/mL) de dsRNA à densidade óptica 0,4.....	46

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1** - Rotas de estratégia de entrega de dsRNA para indução de silenciamento de genes por RNAi: spray foliar, injeção de tronco, irrigação, irrigação por gotejamento, revestimento de sementes, iscas e pó ou grânulos para aplicações no solo..... 24

Capítulo II

- Figura 1** - Plasmídeo T7 express. (A) Cassete de expressão do dsRNA Met-1 de *Diaphorina citri*, contendo a sequência do gene MET-1, flanqueada pelas sequências terminadora e promotora da enzima T7 RNA polimerase. (B) Plasmídeo pUC57 que contém o cassete de expressão inserido no sítio múltiplo de clonagem (MCS, indicado pela seta) 40
- Figura 2** - Eletroforese em gel de agarose DNA Lambda (λ) diluído a 100 ng / μ L. 1 a 7: dsRNA purificado..... 44
- Figura 3** - Valores médios de rendimento de dsRNA produzidos em *E. coli*..... 44
- Figura 4** - Rendimento de dsRNA em diferentes combinações de concentração de IPTG e temperatura nos meios LB, 2YT e SOC à densidade óptica 0,4..... 47
- Figura 5** - Rendimento de dsRNA em diferentes combinações de concentração de IPTG e temperatura nos meios LB, 2YT e SOC à densidade óptica 0,7..... 47
- Figura 6** - Validação experimental para produção de dsRNA em meio LB e diferentes temperaturas..... 48
- Figura 7** - Rendimentos de dsRNA em produção utilizando 100 mL de meio de cultivo..... 48

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

μL – microlitro

μm – micrometro

2YT – Extrato de levedura triptona

ARCs - Apse RNA Containers

Ca. - *Candidatus*

D. citri – *Diaphorina citri*

DCCR – Delineamento composto central rotacional

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DO₆₀₀ – Densidade ótica

dsRNAs - RNA de fita dupla

g/L – Gramas por litro

HLB - Huanglongbing

IPTG – Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

LB – Luria Bertani

MCS - multiple cloning site, sítio múltiplo de clonagem

mm – milímetro

mM – milimolar

mRNA – RNA mensageiro

ng – nanograma

ng/ μL – nanograma por microlitro

ng/mL – nanograma por mililitro

nt – nucleotídeo

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RISC - RNA Induced Silencing Complex

RNA – Ácido Ribonucleico

RNAi - RNA de interferência

rpm – rotação por minuto

siRNA – small interfering RNA, pequenos RNAs interferentes

SOC – meio SOB - Super Optimal Broth, suplementado com 20 mM de glicose

μM – micromolar

λ – DNA lambda

ÍNDICE

RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO GERAL.....	12
CAPÍTULO I: Revisão de Literatura.....	14
1 HUANGLONGBING (HLB).....	15
2 SILENCIAMENTO GÊNICO.....	16
3 <i>Escherichia coli</i>.....	18
4 TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE.....	20
4.1 EXPRESSÃO GÊNICA EM BACTÉRIAS.....	21
5 SISTEMAS DE PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DO dsRNA	22
6 FATORES QUE AFETAM O CRESCIMENTO BACTERIANO E	
EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS HETERÓLOGAS.....	24
6.1 MEIO DE CULTIVO.....	24
6.2 TEMPERATURA.....	25
6.3 AGITAÇÃO.....	26
6.4 INDUÇÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	29
CAPÍTULO II: Otimização da produção de dsRNA em <i>Escherichia coli</i>	
HT115 visando o controle do psilídeo <i>Diaphorina Citri</i>	36
RESUMO.....	37
ABSTRACT.....	37
INTRODUÇÃO.....	38
MATERIAL E MÉTODOS.....	40
RESULTADOS.....	43
DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS	55

RESUMO

Cerqueira, L. R. S. Otimização da produção de dsRNA em *Escherichia coli* HT115 para uso na agricultura, com foco no controle do psílideo *Diaphorina citri*

A citricultura representa um importante segmento da agricultura do Brasil, que se consolidou como maior produtor e exportador mundial de laranja. O Huanglongbing (HLB) é a principal doença da citricultura brasileira e mundial. Essa doença tem ameaçado este setor do agronegócio devido aos danos que causa, à dificuldade de manejo, à sua rápida disseminação e por afetar praticamente todas as espécies e cultivares de citros. O HLB é causado por bactérias denominadas *Candidatus Liberibacter* e transmitida pelos psílideos *Diaphorina citri* e *Trioza erytreae*. As principais medidas de controle para o HLB são o controle do inseto vetor, eliminação de plantas sintomáticas e uso de mudas sadias. Uma nova ferramenta estudada para o manejo de pragas é o controle por RNA de interferência (RNAi). O RNAi compreende um mecanismo celular eucarioto envolvido na regulação gênica e defesa antiviral. Essa estratégia de controle baseia-se na introdução de moléculas de RNA de fita dupla (dsRNAs) em células alvo, o que leva a ativação do mecanismo de RNAi que acarreta a degradação do mRNA homólogo ao dsRNA, resultando em inibição ou redução da expressão do gene alvo. Nesse contexto, o dsRNA pode ser considerado como um ingrediente ativo de uma nova classe de biopesticida. A aplicabilidade do dsRNA depende do desenvolvimento de métodos econômicos para a produção em massa de dsRNA. Um método de produção que foi explorado é o uso de sistemas fermentativos usando cepas de *Escherichia coli* projetadas como HT115 (DE3). O objetivo deste trabalho foi determinar os melhores parâmetros para o crescimento de *E. coli* HT115 e produção de dsRNA. Os parâmetros avaliados individualmente foram meio de cultivo (LB, 2YT e SOC); tempo de indução (DO₆₀₀ 0,4 e 0,7); concentração de IPTG (0,6; 0,8; 1,0; 1,5 e 2,0 mM); temperatura de crescimento/indução (30 e 37 °C); agitação (180 e 250 rpm) e DO₆₀₀ de coleta. O meio LB promoveu uma maior produção de dsRNA quando induzido em DO₆₀₀ 0,4, em agitação 250 rpm e coletado na DO₆₀₀ 1,0. Entre as concentrações de IPTG avaliadas não houve diferença estatística entre as concentrações 0,6, 0,8 e 1,0 mM, enquanto que as concentrações de 1,5 e 2,0 mM

apresentaram menores rendimentos de dsRNA. Para avaliação fatorial foi utilizado o delineamento central rotacional no intuito de avaliar a interação de diferentes concentrações de IPTG com diferentes temperaturas. A análise DCCR permitiu a confirmação do meio LB e DO₆₀₀ de indução 0,4 como mais eficiente para produção de dsRNA. A otimização desses parâmetros permitiu um aumento significativo na produção de dsRNA de 700 ng/mL para 4851 ng/mL (693%).

Palavras-chave: Huanglongbing. Silenciamento gênico. RNA de interferência. Indução. Regulação gênica.

ABSTRACT

Cerqueira, L. R. S. Optimization of dsRNA production in *Escherichia coli* HT115 for use in agriculture, focusing on the control of the psyllid *Diaphorina citri*

Citriculture represents an important segment of Brazilian's agriculture, which is the world's largest orange producer and exporter. Huanglongbing (HLB) is the main citrus disease of Brazilian and worldwide. The disease has threatened this agribusiness due to the damage it causes, the difficulty of management, its rapid dissemination and because it affects practically all citrus species and cultivars. HLB is caused by bacteria called *Candidatus Liberibacter* and transmitted by the psyllids *Diaphorina citri* and *Trioza erytreae*. The main control measures for HLB are the control of the vector, elimination of symptomatic plants and planting of healthy seedlings. A new tool studied for pest management is RNA interference (RNAi). RNAi comprises a eukaryotic mechanism involved in gene regulation and antiviral defense. This control strategy is based on the introduction of double-stranded RNA molecules (dsRNAs) in target cells, which leads to the activation of the RNAi mechanism causing the degradation of the homologous mRNA, and resulting in inhibition or reduction of expression of the target gene. In this context, dsRNA can be considered as an active ingredient of a new class of biopesticide. The use of RNAi on pest control relies on the development of cost-effective methods for mass production of dsRNA. One method of production that has been explored is the use of fermentative systems using engineered *Escherichia coli* strains such as HT115 (DE3). The objective of this work was to determine the best parameters for growth of *E. coli* HT115 and production of dsRNA. The parameters evaluated individually were culture medium (LB, 2YT and SOC); optic density at induction time (DO₆₀₀ 0.4 and 0.7); concentration of IPTG (0.6; 0.8; 1.0; 1.5 and 2.0 mM); growth / induction temperature (30 and 37 °C); agitation (180 and 250 rpm) and DO₆₀₀ at collection point. The LB medium promoted a greater production of dsRNA when bacteria was induced at DO₆₀₀ 0.4, 180 rpm and collected in DO₆₀₀ 1.0. There was no statistical difference among IPTG concentrations of 0.6, 0.8 and 1.0 mM. The IPTG

concentrations of 1.5 and 2.0 mM showed lower yields of dsRNA. For factorial evaluation, the central rotational design was used in order to evaluate the interaction of different concentrations of IPTG and temperatures. The DCCR analysis allowed the confirmation of the LB medium and induction at DO₆₀₀ 0.4 as the most efficient for dsRNA production. The optimization of these parameters allowed a significant increase in the production of dsRNA from 700 ng / mL to 4851 ng / mL (693%).

Keywords: Huanglongbing. Gene silencing. Interference RNA. Induction. Genetic regulation.

INTRODUÇÃO GERAL

A citricultura representa um importante segmento da agricultura mundial, com produção de cerca de 137 milhões de toneladas de citros por ano, e tem a China, Brasil, Índia e os Estados Unidos como maiores produtores mundiais (FAO, 2017). A agroindústria cítrica brasileira responde por um faturamento anual da ordem de 1,5 bilhões de dólares, organizado em uma cadeia produtiva estruturada, formada por diferentes segmentos que vão desde o setor produtivo, como os produtores e viveiristas até as indústrias de processamento de suco concentrado e de comercialização da fruta fresca (CDA, 2019).

A citricultura requer alta produtividade e baixo custo para manter sua competitividade global, entretanto, a expansão de pragas e doenças reflete nos custos de produção. O cenário se agravou após a confirmação da presença da bactéria causadora do Huanglongbing (HLB) ou Greening do citros no Brasil em 2004, considerada a mais devastadora doença dos citros em todo o mundo, e que até então estava restrita a países da Ásia e da África (COLETTA FILHO et al., 2004). No Brasil, mais de 55 milhões de plantas cítricas foram erradicadas devido ao HLB desde 2004 (CDA, 2019).

O HLB é originário da China e está associado a três espécies de bactérias denominadas *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter americanus*, relatada no Brasil em 2005, ambas tendo como vetor o psílídeo *Diaphorina citri* Kuwayama, e *Candidatus Liberibacter africanus*, encontrada na África e transmitida pelo psílídeo *Trioza erytreae* Del Guercio (BOVÉ, 2006).

Diante das dificuldades encontradas no melhoramento convencional de citros para resistência ao HLB e da ausência de medidas curativas, as principais medidas de controle para o HLB são a eliminação de plantas sintomáticas, o uso de mudas sadias e o uso massivo de inseticidas para o controle do psílídeo vetor (BELASQUE JUNIOR et al., 2009). Entretanto, o uso excessivo de inseticidas tem levado ao surgimento de populações do inseto resistentes e um elevado impacto ambiental. Diante destas dificuldades, a utilização da tecnologia de RNA interferente (RNAi) apresenta-se como uma alternativa potencial para o manejo adequado do psílídeo transmissor desta doença. A aplicação do RNAi na agricultura irá estabelecer um novo patamar no controle de pragas, denominado: “Controle de

pragas altamente específico” (Highly Specific Pest Control, HiSPeC) (HUNTER et al. 2012), na qual será possível controlar uma espécie determinada sem afetar espécies não alvo.

O RNAi é um mecanismo natural de defesa anti-viral e regulação gênica pós-transcricional, altamente conservado em eucariotos, que controla a expressão do gene em nível de mRNA, sendo desencadeado por moléculas de fita dupla de RNA (dsRNA) (FIRE et al., 1998; CARTHEW; SONTHEIMER, 2009).

Nesse contexto o dsRNA apresenta-se como ingrediente ativo na produção de biopesticidas. Entretanto, para que produtos à base de dsRNA sejam realidade na agricultura um dos gargalos que precisam ser solucionados é a produção de dsRNA em larga escala e baixo custo. A produção de dsRNA usando kits comercialmente disponíveis, baseados no princípio da transcrição *in vitro* utilizando DNA linearizados (plasmídeos ou fragmentos de PCR), é amplamente utilizada em ensaios de laboratório, porém inviável para fins comerciais. A produção *in vivo* de dsRNA via processo fermentativo, utilizando cepas engenheiradas de *Escherichia coli* pode ser usada como uma alternativa para produzir grandes quantidades de dsRNA a baixo custo. A cepa de *E. coli* HT115 foi modificada para não possuir atividade de ribonuclease III (não degrada dsRNA), e expressar a RNA polimerase do fago T7 sob o controle de um promotor induzível por IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) (TIMMONS; COURT; FIRE, 2001).

Para se obter altas concentrações de um produto recombinante e também reduzir os custos de produção as variáveis que influenciam a expressão desses produtos, como meio de cultivo, temperatura, agitação e indutor, devem ser compreendidas e controladas (WOOD; PERETTI, 1991; NOOR et al., 2013; VAZ et al., 2014).

Não existe na literatura, até o momento, trabalhos que avaliem diferentes parâmetros para a produção de dsRNA. Desse modo, o presente trabalho tem como objetivo determinar os melhores parâmetros de crescimento e expressão de *Escherichia coli* HT115, a fim de otimizar o processo de produção de dsRNA.

O trabalho foi dividido em dois capítulos; no primeiro capítulo é apresentada a revisão de literatura que fundamenta teoricamente este trabalho; no segundo capítulo é abordado os testes de otimização da produção de dsRNA, via fermentação, utilizando *Escherichia coli* HT115.

CAPÍTULO I

Revisão de Literatura

1 HUANGLONGBING (HLB)

Huanglongbing (HLB), ou Greening, é a doença mais importante e destrutiva da citricultura mundial (BOVÉ, 2006; GOTTWALD et al., 2007).

O agente causal do HLB, *Candidatus Liberibacter* spp., são bactérias endocelulares, gram negativas, pertencentes à subdivisão α -Proteobacteria, não cultivável em meio de cultura (motivo pelo qual é referida pelo termo *Candidatus*), limitada ao floema da planta hospedeira e transmitida pelos psílídeos (*Diaphorina citri* e *Trioza erythrae*) (MACHADO et al., 2010).

A bactéria apresenta três espécies diferentes de 'Candidatus', com origem geográfica definida: *Candidatus* L. asiaticus, originária de países asiáticos, *Candidatus* L. americanus, relatada no Brasil em 2005, ambas tendo como vetor o psílídeo *Diaphorina citri* Kuwayama, e *Candidatus* L. africanus, encontrada na África e transmitida pelo psílídeo *Trioza erythrae* Del Guercio (JAGOUEIX et al., 1994; GARNIER et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2005). Entretanto, em locais como Ilhas Reunião e Maurício, as duas espécies ocorrem simultaneamente (GARNIER et al., 1996). No Brasil a espécie asiática predomina, mas os sintomas podem também ser causados por *Candidatus* L. americanus e um fitoplasma (TEIXEIRA et al., 2010).

Além da transmissão pelo inseto vetor, a doença pode ser transmitida por meio de enxertia com material contaminado e plantas parasitas do gênero *Cuscuta* (*Cuscuta campestris* Yuncker, 1932) (DA GRAÇA, 1991).

Os primeiros sintomas de HLB consistem em manchas amareladas assimétricas no limbo foliar contrastando com a cor verde normal das folhas, sintoma conhecido como mosqueado. Este sintoma pode evoluir para o amarelecimento completo da folha no decorrer do tempo. Com a evolução da doença ocorre acentuada desfolha dos ramos afetados, evoluindo para seca e morte generalizada dos ponteiros (BASSANEZI et al., 2010). Os frutos dos ramos afetados são menores com amadurecimento incompleto, desenvolvimento assimétrico em relação ao eixo central e sementes abortadas (BOVÉ; GARNIER, 2002; BOVE et al., 2006).

Plantas infectadas com HLB apresentam morte econômica, ou seja, incapacidade de produção econômica em curto espaço de tempo, e morte biológica com o ataque severo da bactéria (BOVÉ, 2006). Estima-se que apenas no Brasil

mais de 55 milhões de árvores foram erradicadas nos últimos quinze anos (CDA, 2019). Estudos econômicos realizados na Flórida indicam que o HLB causou, de 2005 até 2011, perdas acumuladas de US\$ 1,36 bilhões em receitas e 2.125 empregos permanentes foram perdidos (HODGES; SPREEN, 2012).

Não existe resistência genética identificada no gênero citros e as formas atuais de reduzir a disseminação da doença são a remoção de plantas doentes, o plantio de mudas sadias o controle do inseto vetor com uso massivo de inseticidas químicos.

Entretanto, este método traz diversas preocupações como o desenvolvimento de resistência à molécula do inseticida, (MARUTANI-HERT et al., 2009), implicações ambientais e econômicas devido ao uso indiscriminado de inseticidas nos pomares (STUCHI; GIRARDI, 2010).

2 MECANISMO DE RNA DE INTERFERÊNCIA

Uma nova alternativa para o manejo de pragas que tem sido estudada está baseada no mecanismo chamado RNA de interferência (RNA interference, RNAi), que é um mecanismo natural de regulação da expressão gênica e defesa antiviral das células eucarióticas. Ele engloba uma série de processos nucleares e citoplasmáticos que levam à regulação da expressão gênica a nível pós-transcricional, por meio da degradação sequência-específica de mRNAs alvos ou do bloqueio de sua tradução, resultando em uma redução ou eliminação total da expressão de um gene (FIRE et al., 1998).

O processo básico do RNAi pode ser dividido em três etapas principais (TOMARI; ZAMORE, 2005). Primeiro, o mecanismo é ativado pela presença de uma molécula de RNA fita dupla (dsRNA) (denominada de molécula gatilho), que pode ser expressa ou introduzida na célula. Este RNA é então cortado em pequenos RNAs de fita dupla (21-25 nt), chamados de pequenos RNAs interferentes (small interfering RNA, siRNA), por uma ribonuclease III, chamada Dicer. Na segunda etapa do mecanismo de RNAi, uma das fitas do siRNA é removida e a fita que permanece (chamada de fita guia) é incorporada a um complexo proteico conhecido como o complexo de silenciamento induzido por RNA (RNA Induced Silencing Complex, RISC). Na última etapa, o complexo RISC atua para identificar e degradar mRNAs que compartilhem homologia com o siRNA. Em

teoria, qualquer mRNA de uma célula pode ser degradado de forma específica via RNAi.

Uma vez que esta proporciona uma ação eficiente e gene-espécie específica, sua utilização no manejo de pragas tem se tornado uma grande promessa de controle com alta eficiência e com um impacto ambiental inferior às técnicas antecessoras (PRICE; GATEHOUSE, 2008).

As primeiras demonstrações da aplicabilidade do mecanismo RNAi para o controle de insetos praga ocorreram simultaneamente. Baum et al. (2007) usaram ensaios de alimentação artificial, em que as larvas de *Diabrotica virgifera* (Western corn rootworm, WCR) foram alimentadas com uma dieta artificial suplementada com dsRNA's específicos a um número de genes potencialmente essenciais ao inseto. Estes ensaios identificaram 14 genes cuja supressão da expressão via dsRNA acarretava a morte das larvas de WCR. Eles obtiveram plantas transgênicas de milho expressando dsRNA de um destes genes, uma ATPase Vacuolar (V-ATPase) expressa nas células do intestino. Esta linhagem de milho apresentou resistência à infestação por WCR equivalente ao oferecido por um transgene Bt (BAUM et al., 2007).

Trabalhos científicos publicados nos últimos anos tem demonstrado a viabilidade da aplicação de RNAi para controlar duas espécies de psílídeos (WURIYANGHAN et al., 2011; HUNTER et al., 2012; EL-SHESHENY et al., 2013; ANDRADE et al., 2013; ANDRADE; HUNTER, 2016). Utilizando os dados genômicos, Hunter et al. (2012) avaliaram os efeitos de diferentes dsRNAs na sobrevivência de *D. citri*, identificando genes altamente promissores para serem utilizados no controle do inseto via RNAi. El-Shesheny et al (2013) demonstraram que a supressão do gene *awd* (abnormal wing disc) em ninfas de *D. citri* resultou em significativa mortalidade das ninfas, além de má formação de asas em 40% dos insetos adultos emergidos. Andrade et al. (2013) avaliou o efeito da supressão de genes envolvidos em diferentes processos celulares (produção de energia, detoxificação, desenvolvimento) na sobrevivência de *D. citri*. O nível de mortalidade observada variou conforme o gene alvo, chegando a atingir mais de 80% após 10 dias de alimentação (ANDRADE et al., 2013).

O sucesso na utilização da tecnologia de RNAi em insetos está relacionado a um sistema adequado de fornecimento do dsRNA, pois, o processo de silenciamento gênico necessita da ação da molécula efetora dentro das células do

organismo alvo. Dessa forma, métodos como injeção, alimentação, absorção e plantas transgênicas expressando um hairpin de um fragmento do gene a ser silenciado têm sido avaliados no fornecimento de dsRNA para insetos (KATOCH et al., 2013).

Com esta perspectiva do uso agrícola do RNAi, houve investimentos em sistemas de produção de dsRNA em larga escala resultando na diminuição dos custos de produção. Por exemplo, o custo de produzir um grama de dsRNA usando síntese química diminuiu de US\$ 12.500 em 2008 para US\$ 600 atualmente (AgroRNA, 2019). Um outro método de síntese de dsRNA é via fermentação, utilizando estirpes de *Escherichia coli* apropriadas, como a HT115 (DE3). Este é considerado o método mais econômico para a produção de dsRNA (aproximadamente US\$ 4 por grama), uma vez que não depende de insumos caros, possibilitando que países com menos tecnologia possam produzir o dsRNA a um custo acessível (ANDRADE; HUNTER, 2016). Mais recentemente, uma companhia desenvolveu uma tecnologia denominada de “Apse RNA Containers” (ARCs) que permite a produção em larga escala de dsRNA encapsulados utilizando bactérias a um custo próximo de US\$ 2 por grama (APSE, 2017).

3 *Escherichia coli*

Escherichia coli é um microrganismo comumente encontrado no meio ambiente, solo, água e como parte da microbiota intestinal de mamífero, entretanto, cepas patogênicas da espécie podem causar uma série de doenças intestinais e extra intestinais em homens e animais (NATARRO; KAPER, 1998). São bastonetes Gram-negativos, capazes de crescer em ambas as condições, aeróbica e anaeróbica, em temperaturas de 18 a 44 °C, sendo 37 °C sua temperatura ótima de crescimento. São bactérias catalase-positivas e oxidase-negativas capazes também de reduzir nitrato (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997).

Embora exista uma gama de organismos que são utilizados como hospedeiros para produção de moléculas heterólogas, a *E. coli* é a mais utilizada, uma vez que essa bactéria é bem caracterizada em termos de genética molecular, fisiologia e sistemas de expressão (CUI et al., 2016; NOOR et al., 2013).

Entre as vantagens de se usar *E. coli* destacam-se a existência de métodos precisos e rápidos para modificação de seu genoma, seu rápido crescimento, a

sobrevivência em diferentes condições ambientais, dispensa o uso de um meio de cultura caro, alto rendimento em produto, além das facilidades de cultivo, de redução de protease, de crescer em altas densidades celulares, acumulação de proteína heteróloga acima de 50% de sua massa celular, entre outras (DEMAIN, 2001).

Entretanto, apesar do vasto conhecimento sobre *E. coli*, existem ainda algumas limitações no sistema de expressão da bactéria, como por exemplo: a inabilidade de efetivar modificações pós-traducionais, atividade comum em eucariotos; a inexistência de um sistema que possa secretar a proteína de interesse recombinante para o meio de cultura; e a limitada capacidade de produzir proteínas contendo múltiplas pontes dissulfeto (TOMAZETTO et al., 2007; SAHDEV et al., 2008).

Diversas estirpes de *E. coli* são modificadas geneticamente e amplamente utilizada em trabalhos com tecnologia do DNA recombinante. *E. coli* K-12 foi um dos primeiros organismos utilizado para o sequenciamento do genoma inteiro após ter sido isolado de um paciente com difteria, em 1922, e foram usadas por Lederberg e Tatum em seus primeiros estudos sobre recombinação genética em bactérias (LEDERBERG; TATUM, 1946; BACHMANN, 1972). Desde aquela época, muitas estirpes mutantes de K-12 foram produzidas, contribuindo para o desenvolvimento da biologia molecular, como exemplo, DH1, DH5, DH5 α , DH5 α fruR, DH10B, JM101 1pykF FpykA, JM108 (ANTON; RALEIGH, 2016).

As estirpes DH5 α de *E. coli* foram projetadas para maximizar a eficiência da transformação. Eles são definidos por três mutações recA1, endA1, que ajudam na inserção do plasmídeo, e lacZM15. As células são competentes e frequentemente utilizadas para transformação, visando a clonagem de fragmentos de interesse. Um estudo de quatro métodos de transformação e seis cepas de bactérias mostrou que o mais eficiente foi a cepa DH5 α (CHAN et al. 2013). Timmons et al. (2001) relata em seu estudo diversas cepas de *E. coli* utilizadas para produção de dsRNA, como por exemplo BL21; W3110; SDF204; HT115; HB101; TG1; SCS110; XL1-azul MRF0.

A cepa de *E. coli* HT115 abriga o pró-fago λ DE3 que codifica o gene da T7polimerase induzível por IPTG para transcrição de dsRNA. A mutagênese do transposon do gene rnc que codifica a enzima RNase III revoga a função rnc

definindo *E. coli* HT115 (DE3) como RNase III defeituoso e capaz de expressar constitutivamente o T7 DdRp quando induzido por IPTG (TAKIFF et al. 1989; TIMMONS et al. 2001).

A melhora no processo de expressão de produto recombinante pode facilitar o passo seguinte da purificação e conseqüentemente alcançar altos níveis de expressão, de modo a maximizar os ganhos e viabilidade econômica. A produção dos produtos heterólogos, e o nível de expressão dos genes vão depender de múltiplas variáveis, como o tipo e a concentração do indutor, o instante da indução, a composição do meio de cultivo e a temperatura (LARENTIS et al., 2011). O estudo dessas estratégias de produção são passos intrínsecos ao sucesso e viabilidade do bioprocesso (HORTSCH; WEUSTER-BOTZ, 2011).

4 TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

A Tecnologia do DNA recombinante são tecnologias desenvolvidas que permitem o isolamento e a inserção de genes nas células. A técnica central da metodologia do DNA recombinante é a clonagem molecular, a qual consiste no isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas (BAILEY; OLLIS, 1986).

A clonagem molecular compreende três etapas: isolamento e fragmentação do DNA de interesse, chamado de inserto; inserção desse fragmento em outra molécula de DNA chamada de vetor de clonagem para formar o que se chama de DNA recombinante; introdução do DNA clonado em uma célula hospedeira compatível, num processo chamado de transformação. Essa célula hospedeira é agora chamada de transformante ou célula transformada (BAILEY; OLLIS, 1986; LARSON et al., 2007).

Apenas células competentes podem ser transformadas, pois possuem alta capacidade de receber o DNA comparadas com as células não competentes. *E. coli* normalmente não são competentes, mas, devido sua importância para a genética microbiana, foi desenvolvido procedimentos capazes de torná-las competentes. Esses procedimentos consistem em tratar a bactéria com altas concentrações de íons cálcio com manipulação da temperatura, que alteram a permeabilidade da parede celular permitindo a entrada do DNA exógeno através da membrana celular (SHULER; KARGI, 1992).

Além disso, é necessário que haja um método de seleção já que nem todas as células irão adquirir o plasmídeo com o gene de interesse. Geralmente o plasmídeo contém um gene que confere resistência a antibióticos, que são acrescentados ao meio de cultura para selecionar somente as linhagens que portam os plasmídeos recombinantes (SHULER; KARGI, 1992).

4.1 EXPRESSÃO GÊNICA EM BACTÉRIAS

Muitos genes bacterianos com funções relacionadas estão agrupados sob o controle de um único promotor e geralmente são transcritos juntos em um único mRNA. Esse conjunto de genes é chamado de operon e regula a expressão dos genes estruturais ao controlar a transcrição, que nas bactérias é o nível mais importante da regulação gênica (PIERCE, 2016).

O modelo operon para o controle genético do metabolismo da lactose na *E. coli* (operon lac) foi descrito por François Jacob e Jacques Monod, em 1961, e colaboraram para o estabelecimento do operon como a unidade básica do controle de transcrição nas bactérias (NASCIMENTO et al., 2003).

O operon lac da *E. coli* controla a transcrição de três genes necessários no metabolismo da lactose: o gene lacZ, que codifica a β -galactosidase, responsável por quebrar a lactose em galactose, glicose e alolactose, um composto que participa da regulação do metabolismo desse açúcar; o gene lacY que codifica a permease, que transporta a lactose para dentro da célula; e o gene lacA, que codifica a tiogalactosídeo transacetilase, na qual sua possível função é a desintoxicação, evitando o acúmulo de tiogalactosídeos que são transportados na célula junto com a lactose pela lactose permease (MARBACH; BETTENBROCK, 2012; FAUST et al., 2015).

O operon lac é indutível negativo, ou seja, um gene regulador (lacI) sintetiza a proteína repressora LacI que reconhece e se liga com afinidade ao locus operador lac (lacO) na ausência de lactose. Essa ligação impede que a RNA polimerase reconheça e se associe ao promotor lac (lacP), inibindo a transcrição. Quando há lactose, essa é isomerizada no interior da célula e convertida em alolactose que se liga à proteína repressora LacI e altera sua conformação, fazendo com que essa perca a afinidade pelo operador lacO, liberando-o. A RNA polimerase reconhece o

promotor (lacP) iniciando a transcrição dos genes estruturais do operon lac (lacZ, lacY e lacA) (MARBACH; BETTENBROCK, 2012; FAUST et al., 2015).

A descoberta de promotores e repressores particulares do genoma da *E. coli*, permitiu o manuseio da expressão de proteínas e a clonagem do material genético sob controle de um promotor, a qual a expressão pode ser por meio de uma indução ou contínua (ETTINGER et al., 2009). O sistema de expressão de moléculas heterólogas mais utilizado em *E. coli* é baseado no operon lac (OVERTON, 2014). Neste sistema, o DNA de interesse depende da presença de um indutor, seja sintético ou não, pois o gene heterólogo é clonado em fago ou plasmídeo contendo o lacI, lacP, lacY e lacZ (SHOJAOSADATI et al., 2008; RAVISHANKAR et al. 2015). A indução da transcrição é obtida pela adição da lactose ou de IPTG (um análogo de lactose sintético e não degradável) o qual se liga ao produto gênico do lacI (repressor) inibindo-o, deixando assim o promotor livre permitindo que a RNA polimerase mova-se ao longo do DNA e RNA do produto de interesse possa ser transcrito (MARQUES 2012).

5 SISTEMAS DE PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DO dsRNA

A transcrição in vitro pode ser efetivamente empregada para sintetizar um RNA de fita simples. O gene de interesse pode ser clonado em um plasmídeo contendo os promotores da RNA polimerase T7, T3 ou Sp6. O molde de DNA plasmídico é linearizado e depois purificado em gel. O RNA de sentido único e antisense é sintetizado usando as RNA polimerases apropriadas e o DNA plasmidial é removido por tratamento com DNase I. Os RNAs de fita simples são isolados da contaminação de proteínas por extração com fenol/clorofórmio e precipitação com etanol. Então, os dois RNAs de fita simples podem ser anelados para produzir dsRNA. Em outra estratégia, modelos de DNA contendo sequências promotoras de T7 RNA polimerase em ambas as extremidades podem ser produzidos pela técnica de PCR usando iniciadores específicos para genes contendo sequências promotoras de T7 ligadas à extremidade 5'. Após a transcrição in vitro, o dsRNA é purificado usando adsorção em fase sólida para remover proteínas, nucleotídeos e oligonucleotídeos (ONGVARRASOPONE; ROSHORM; PANYIM, 2007).

Outra alternativa é a produção in vivo de dsRNA via processo fermentativo. A maioria dos estudos realizados utilizam a estirpe de *E. coli* HT115

(DE3) para produzirem grandes quantidades de dsRNA para estudos de silenciamento. Inicialmente usada para silenciar genes endógenos em *Caenorhabditis elegans* (TIMMONS et al. 2001), a cepa de *E. coli* HT115 abriga o pró-fago λ DE3 que codifica o gene da polimerase T7 induzível por isopropil β -D1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para transcrição de dsRNA. A mutagênese do transposon do gene *rnc*, que codifica a enzima RNase III, revoga a sua função definindo *E. coli* HT115 (DE3) como RNase III defeituoso e capaz de expressar a T7 DdRp quando induzida (TAKIFF et al. 1989; ROBINSON; WORRALL; MITTER, 2014).

O silenciamento de genes baseado em RNAi pode ser desencadeado no organismo alvo pelo fornecimento de RNAs de duas formas: a entrega de moléculas de dsRNA ou a entrega direta de pequenos RNAs (sRNAs). Atualmente, existem duas classes principais de sRNAs atuando na via RNAi: microRNAs (miRNAs) e pequenos RNAs interferentes (siRNAs). Os miRNAs são derivados endogenamente e envolvidos na regulação da expressão gênica, enquanto os siRNAs podem ser de origem exógena a partir de vírus ou suprimento artificial de dsRNA (PREALL; SONTHEIMER, 2005; MATRANGA; ZAMORE, 2007) ou de origem endógena a partir de transposons (LIPPMAN; MARTIENSSEN, 2004; GOLDEN et al., 2008).

Uma vez que as moléculas de RNA são entregues no campo (ou seja, via planta transgênica, spray foliar, irrigação ou injeção de tronco), elas precisam entrar na célula de um organismo alvo para desencadear o silenciamento de genes. Esse processo pode ocorrer através de captação direta ou indireta (Figura 1). A absorção direta ocorre quando as moléculas de RNA são absorvidas através do contato tópico ou alimentando-se de tecidos vegetais. Por outro lado, a captação indireta de moléculas de RNA envolve a primeira entrada no sistema vascular da planta e, em seguida, a captação pelo inseto / patógeno (CAGLIARI et al., 2018).

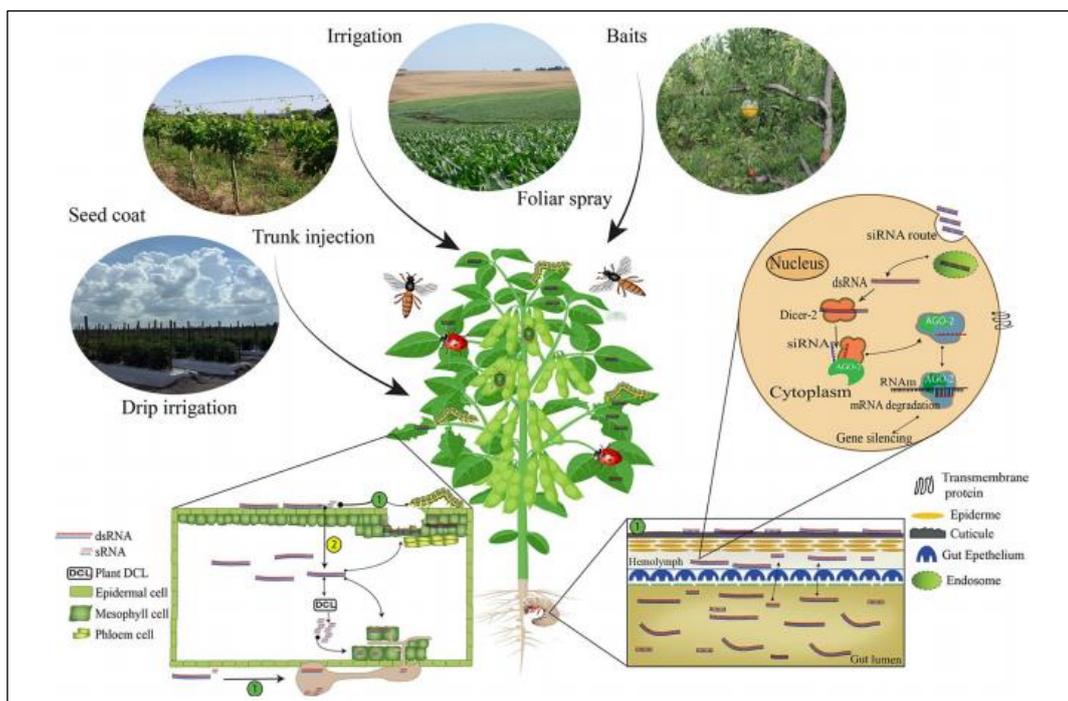


FIGURA 1. Rotas de estratégia de entrega de dsRNA para indução de silenciamento de genes por RNAi: spray foliar, injeção de tronco, irrigação, irrigação por gotejamento, revestimento de sementes, iscas e pó ou grânulos para aplicações no solo. Fonte: CAGLIARI et al., 2018.

6 FATORES QUE AFETAM O CRESCIMENTO BACTERIANO E EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS HETERÓLOGAS

Diversos parâmetros influenciam no rendimento final do produto recombinante, entre eles a composição do meio de cultivo, a temperatura e a agitação de cultivo, a concentração do agente indutor, o momento da indução da expressão e da coleta da cultura bacteriana (PILAREK et al., 2011).

6.1 MEIO DE CULTIVO

Meio de cultivo é qualquer preparação líquida ou sólida destinada especificamente para o crescimento, armazenamento ou transporte de micro-organismo ou outros tipos de células. Um bom meio deve oferecer os nutrientes adequados para o microrganismo específico, ter água suficiente e o pH apropriado além de estar estéril (ARAUJO, 2013).

Os nutrientes que compõem o meio e a escolha de variáveis de cultivo como, por exemplo, temperatura, pH entre outros parâmetros podem afetar os níveis de

produção de moléculas heterólogas (HOFFMANN et al., 2004). Dentre os componentes nutricionais necessitados pelo microrganismo estão a fonte de carbono (para dar energia a célula), nitrogênio (que dá suporte para a construção de proteínas), fósforo, potássio, ferro, zinco e outros elementos (HORTSCH; WEUSTER-BOTZ et al., 2011).

Meios complexos proporcionam maiores velocidades específicas de crescimento, devido a presença da triptona, que supre as bactérias com aminoácidos e pequenos peptídeos enquanto que o extrato de levedura supre a demanda de nitrogênio, nutrientes orgânicos e inorgânicos (BROWN, 2003). Já meios quimicamente definidos permitem atingir maiores concentrações celulares, devido a maior facilidade de controle do fornecimento da fonte de carbono e, conseqüentemente, da velocidade específica de crescimento, o que torna possível controlar efeitos de inibição (YEE; BLANCH, 1992).

Um meio de cultivo mais rico em nutrientes favorece o crescimento microbiano, porém inibe a expressão de produtos recombinantes. Isso é devido a maior quantidade de metabólitos secundários que são produzidos pelo microrganismo durante a fermentação que funcionam como inibidores da expressão (CHAVES, 2009).

Os meios de cultivos para *E. coli* normalmente apresentam glicose como fonte de carbono, entretanto a rápida assimilação da glicose pode acarretar em uma intensa formação de ácido acético, causando inibição do crescimento e da produção do produto recombinante (SUÁREZ et al., 1998).

6.2 TEMPERATURA

Outra variável importante que influência o produto recombinante final é a temperatura. A maioria das bactérias cresce em uma faixa limitada de temperatura, havendo apenas 30 °C de diferença entre a temperatura máxima e mínima de crescimento. Elas crescem pouco nas temperaturas extremas considerando sua faixa ideal (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

A temperatura ótima de crescimento de *E. coli* é 37 °C e coincide com a temperatura ótima de indução do operon lac. Altas temperaturas tendem a favorecer um rápido crescimento celular, entretanto, desfavorece a produção do produto heterólogo, uma vez que o aumento da temperatura afeta a estabilidade do

plasmídeo e conseqüentemente a expressão do produto (TOMAZETTO et al., 2007; ZHANG et al., 2009; VAZ et al., 2011).

Sendo assim, a diminuição da temperatura de cultivo constitui um método simples e eficaz para aumentar a produção de um produto recombinante, uma vez que o uso de temperaturas menores reduz as alterações metabólicas indesejáveis, como a síntese de proteases, aumentando o rendimento do produto de interesse e, ainda, contribuindo para a aumentar a solubilidade da proteína, ou seja, reduzindo a formação de corpos de inclusão (SHOJAOSADATI et al., 2008; VAZ, 2011; NOOR et al., 2013).

6.3 AGITAÇÃO

A frequência de rotação durante a agitação ou velocidade de agitação é outra variável importante em todo processo de produção, apresentando um efeito significativo, principalmente, na síntese do produto de interesse e na produção de ácido acético. Uma elevada agitação tende a aumentar a troca metabólica da célula com o meio de cultivo obtendo energia suficiente para a bactéria exercer suas atividades metabólicas não desviando seu metabolismo para a formação de ácido acético (XUE et al., 2010).

Vaz (2011) utilizando a *E. coli* recombinante para produção de antígeno 503, constatou que as frequências de 200, 400 e 600 rpm, por atingirem concentrações de ácido acético inferiores a 0,9 g/L, não exerceram efeito inibitório no crescimento e na expressão da proteína.

6.4 INDUÇÃO

A expressão de genes em linhagens de *E. coli* normalmente necessita de indução. A indução é o fenômeno pelo qual a transcrição de genes estruturais de um operon aumenta em resposta a presença de um substrato específico no meio (ROZENDO et al., 2014). Esses indutores se unem a sítios específicos que podem estar localizados nas proximidades ao promotor, resultando no favorecimento da transcrição pelo aumento da afinidade da RNA-polimerase, dessa forma, tal composto químico também apresenta a capacidade de regular a expressão do gene (ZAHA, FERREIRA, PASSAGLIA, 2014).

O IPTG, um composto químico equivalente à lactose, representa uma das moléculas mais utilizadas na indução dos variados sistemas de expressão heteróloga sendo utilizado largamente nos processos em que se utiliza o operon lac (ZANFONATO, 2012). Ele não é dependente de lac permease, se difundindo pela membrana celular por difusão e não pode ser clivado pela β -galactosidase e assim não perde sua capacidade indutora, prevenindo o término da transcrição (SCHUMANN; FERREIRA, 2004; ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Apesar de ser um dos indutores mais utilizados em sistemas de alta expressão, o IPTG apresenta como desvantagem a alta toxicidade, o que interfere negativamente no crescimento celular, impactando nos custos do processo de produção em escala industrial (EINSFELDT et al., 2011).

A estratégia de indução empregando IPTG pode variar tanto em concentrações do indutor, fase da indução e tempo de indução. Essas condições devem ser testadas e otimizadas, pois dependerão do produto recombinante a ser produzido em *E. coli*, do meio de cultivo empregado, entre outros fatores que são específicos de cada processo (WANDREY et al., 2016)

As condições mais utilizadas para expressão de proteínas recombinantes utilizam uma concentração de 1,0 mM de IPTG a uma temperatura de 37 °C (VAZ et al., 2011). No entanto, tem sido observado que a utilização de menores concentrações de IPTG é capaz de induzir a síntese sem causar impacto negativo na produção da proteína recombinante (OLAOFE et al., 2010; EINSFELDT et al., 2011; LARENTIS et al., 2014). Quanto menor a concentração de indutor utilizada para se obter alta expressão da proteína recombinante, mais barato será o processo de produção.

A concentração do indutor pode ser reduzida em 10 vezes, utilizando uma concentração de 0,1 mM de IPTG sem impacto negativo na expressão. Olaofe et al. (2010), em ensaios para produção de amilase em função da concentração de IPTG observou que a maior expressão da proteína, foi obtida numa concentração de 400 μ M de IPTG.

Chen (1997) avaliando as condições de indução na produção e excreção de quitinase de *Aeromonas hydrophila* por *E. coli* constatou que a produção da proteína é afetada pela concentração do indutor e pelo tempo de indução. Embora a produção de quitinase tenha aumentado com o aumento da concentração de

IPTG, nenhuma melhoria adicional na produção foi observada quando o IPTG excedeu 0,5 mM.

De acordo com Olaofe et al. (2010), o melhor instante para indução é na fase exponencial, mesmo tendo observado efeitos negativos nas taxas de crescimento celular, comparado com a adição de IPTG ainda na fase lag, devido a maior geração da quantidade de produto recombinante.

REFERÊNCIAS

AGRORNA - (2017) Disponível em: http://www.agrona.com/sub_05.html Acesso em: 20 jun. 2019.

ANDRADE, E. C. et al. Non-transgenic Approach for RNAi Technology to Control Hemipteran Pests. **Agricultural Biotechnology International Conference**. (ABIC 2013), Calgary, Alberta, Canada.

ANTON, B. P.; RALEIGH, E. A. Complete Genome Sequence of NEB 5-alpha, a Derivative of Escherichia coli K-12 DH5. **Genome Announcements**, v. 4, 2016.

APSE – **The manufacturing cost leaders in RNA**. 2017. Disponível em: <http://www.apsellc.com/> Acesso em: 28 dez. 2018.

ARAUJO, C. E. C. **Desenvolvimento de um sistema de garantia da qualidade para os produtos químicos e meios de cultura utilizados em um departamento da FIOCRUZ-PE: uma proposta de gestão e a elaboração de um software**. Dissertação (Mestrado Profissional em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. 2013. 85p.

BACHMANN, B. J. Pedigrees of some mutant strains of Escherichia coli K-12. **Bacteriological Reviews**, v. 36, n. 4, p. 525–557, 1972.

BAILEY J. E.; OLLIS D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. McGraw-Hill. 2a. Edição. 1986.

BASSANEZI, R. B.; LOPES, S. A.; BELASQUE JÚNIOR, J.; SPÓSITO, M. B.; YAMAMOTO, P. T.; MIRANDA, M. P.; TEXEIRA, D. C.; WULFF, N. A. Epidemiologia do Huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. **Citrus Research & Technology**, v. 31, n. 1, p. 11–23, 2010.

BAUM, J.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G. R.; FELDMANN, P.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T.; ROBERTS, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, 25, 1322– 1326. 2007.

BELASQUE JUNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; BEOZZO BASSANEZI, R. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p.137–145. 2009.

BOVÉ, J.; GARNIER, M. Phloem-and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. **Plant Science**, v. 163, n. 6, p. 1083–1098, 2002.

BOVÉ, J. M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.88, p.7-37, 2006.

CAGLIARI, D.; DIAS, N. P.; GALDEANO, D. M.; SANTOS E. A.; SMAGGHE, G.; ZOTTI, M. J. Management of Pest Insects and Plant Diseases by Non-Transformative RNAi. **Frontiers Plant Science**, v. 10, p.1319. 2019.

CARTHEW, R.; SONTHEIMER, E. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, p. 642-655, 2009.

CDA - **Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo**. 2019. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/www/gdsv/index.php?action=dadosCitriculturaPaulista>. Acesso em: 18 nov. 2019.

CHAVES, R. V. A. **Avaliação de dois clones de Escherichia coli recombinante quanto ao crescimento e expressão de antígenos de Leishmania chagasi (kmp11 e P36)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.

CHEN, S.J.; CHANG, M.C.; CHENG, C.Y. Effect of induction conditions on production and excretion of Aeromonas hydrophila chitinase by recombinant *Escherichia coli*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, p. 610–613. 1997.

COLLETA-FILHO, H. D.; TAGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; DE NEGRI, J. D.; POMPEU JÚNIOR, J.; CARVALHO, A. S.; MACHADO, M. A. First report of the causal agent of huanglongbing ("*Candidatus Liberibacter asiaticus*") in Brazil. **Plant Disease** v.88, p.1382. 2004.

CUI, Y.; MENG, Y.; ZHANG, J.; CHENG, B.; YIN, H.; GAO, C.; XU, P.; YANG, C. Efficient secretory expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* with a novel actinomycete signal particle. **Protein Expression and Purification**, v. 129, p. 69-74, 2016.

DA GRAÇA, J. V. Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, n. 1, p. 109–136, 1991.

DEMAIN A.L., Genetics and microbiology of industrial microorganisms - Molecular genetics and industrial microbiology – 30 years of marriage. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 27, p. 352-356. 2001.

EINSFELDT, K.; SEVERO JÚNIOR, J. B.; ARGONDIZZO, A. P. C.; MEDEIROS, M. A.; ALVES, T. L.; ALMEIDA, R. V.; LARENTIS, A. L. Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: Study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability. **Vaccine**, v. 29, p. 7136-7143, 2011.

EL-SHESHENY, I.; HAJERI, S.; EL-HAWARY, I.; GOWDA, S.; KILLINY, N. Silencing Abnormal Wing Disc Gene of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Disrupts Adult Wing Development and Increases Nymph Mortality. **PLoS ONE**, v. 8, n.5, 2013.

ETTINGER, N. A.; DUGGAL, P.; BRAZ, R. F.; NASCIMENTO, E. T.; BEATY, T. H.; JERONIMO, S. M. B.; PEARSON, R. D.; BLACKWELL, J. M.; MORENO, L.; WILSON, M. E. Genetic admixture in Brazilians exposed to infection with *Leishmania chagasi*. **Annals of Human Genetics**, v. 73, p.304-313, 2009.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations** Disponível em: <http://faostat.fao.org/> Acesso em: 13 nov. 2019.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; 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.

GARNIER, M.; BOVÉ, J. M.; CRONJE, C.P. R.; SANDERS, G. M.; KORSTEN, L.; LE ROUX, H. F. Presence of "*Candidatus Liberibacter africanus*" in the Western Cape province of South Africa. Proceedings of 14th Conference of International Organization of Citrus Virologists. **Riverside CA**. p. 369-372. 2000.

GOLDEN, D. E., GERBASE, V. R., AND SONTHEIMER, E. J. An Inside Job for siRNAs. **Molecular Cell**, v. 31, p. 309–312. 2008.

GOTTWALD, T. R.; DA GRAÇA, J. V.; BASSANEZI, R. B. Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress** 2007.

HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W. et al. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo, SP: Edgar Blücher; p. 93-122. 2001.

HOFFMANN, F.; VAN DEN HEUVEL, J.; ZIDEK, N.; RINAS, U. Minimizing inclusion body formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* at bench and pilot plant scale. **Enzyme Microb Technol**, v.34, p.235-241, 2004.

HOGG, S. **Essential Microbiology**. 1 ed. The University of Glamorgan, UK: John Wiley & Sons Ltd., 2005. 468 p. 2005.

HORTSCH, R.; BOTZ, W. Growth and recombinant protein expression with *Escherichia coli* in different batch cultivation media. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 90, p. 69-76, 2011.

HUNTER, W.B. GLICK, E.; PALDI, N.; BEXTINE, B. R. Advances in RNA interference: dsRNA treatment in trees and grapevines for insect pest population suppression. **Southwestern Entomologist**, v. 37, n. 1, p. 85–87. 2012.

HUNTER, W. B.; ANDRADE, E. C. RNAi Feeding Bioassay – Development of a Non-transgenic approaches to Control Asian Citrus Psyllid and other Hemipterans. **Journal of Entomological Research** (In press).2016.

JAGOUÉIX S, BOVÉ JM, GARNIER M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the subdivision of the Proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology** 44:397-386. 1994.

KATOCH, R.; SETHI, A.; THAKUR, N.; MURDOCK, L.L. RNAi for insect control: current perspective and future challenges. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.171, p.847-873, 2013.

LARENTIS, A.; ARGONDIZZO, A.; ESTEVES, G.; JESSOURON, E.; GALLER, R.; MEDEIROS, M. Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) expression in *Escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage. **Protein Expression and Purification**, v. 78, p. 38-47. 2011.

LARENTIS, A. L.; NICOLAU, J. F. M. Q.; ESTEVES, G. S.; VARESCHINI, D. T.; ALMEIDA, F. V. R.; REIS, M. G.; GALLER, R.; MEDEIROS, M. A. Evaluation of preinduction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor. **BMC Research Notes**, p. 1-13, 2014.

LEDERBERG, J., AND E. L. TATUM. Gene recombination in *Escherichia coli*. **Nature (London)** 158:558. 1946.

LIPPMAN, Z., AND MARTIENSSEN, R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. **Nature**, v. 1, p. 364–370. 2004.

MACHADO, M.A., et al. *Candidatus Liberibacter* spp., agentes do huanglongbing dos citros. **Citrus Research & Technology**, v. 31, p. 25-35. 2010.

MARBACH, A.; BETTENBROCK, K. lac operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. **Journal of Biotechnology**. v. 57, p. 82-88, 2012.

MARQUES, M. V. Biologia molecular e genética bacteriana / Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**. 348. Il. 2012.

MARUTANI-HERT, M.; HUNTER, W.B.; KATSAR, C.S.; SINISTERRA, X.H.; HALL, D.G.; POWELL, C.A. Reovirus-like sequences isolated from adult Asian citrus psyllid, (Hemiptera: Psyllidae: *Diaphorina citri*). **Florida Entomologist**, Gainesville, v.92, p.314- 320, 2009.

MATRANGA, C., AND ZAMORE, P. D. Primer. Small silencing RNAs. **Current Biology**, v. 17, 2007.

NASCIMENTO, A. A. C.; ESPREAFICO, E. M.; LARSON, M. L. P.; MONESI, N.; ROSSI, N. M. M.; RODRIGUES, V. **Tecnologia do DNA recombinante**. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. 2003.

NATARO J. P.; KAPER J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p.142-201. 1998.

NOOR, R.; ISLAM, Z.; MUNSHI, S. K.; RAHMAN, F. Influence of Temperature on *Escherichia coli* Growth in Different Culture Media. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 7, p. 899-904, 2013.

OLAOFE, O. A.; BURTON, S. G.; COWAN, D. A.; HARRISON, S. T. L.; Improving the production of a thermostable amidase through optimising IPTG induction in a highly dense culture of recombinant *Escherichia coli*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 19-24, 2010.

ONGVARRASOPONEA, C.; ROSHORMA, Y.; PANYIM, S. A simple and cost-effective method to generate dsRNA for RNAi studies in invertebrates. **Sci Asia**, v. 33, p.35-39. 2007.

PELCZAR JRMJ; CHAN ECS, KRIEG NR. **Microbiologia: conceito e aplicações**. São Paulo: McGraw-Hill; 1997. v.2.

PIERCE, B. A. **Genética: um enfoque conceitual**. 5. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

PILAREK, M.; GLAZIRINA, J.; NEUBAUER, P. Enhanced growth and recombinant protein production of *Escherichia coli* by a perfluorinated oxygen carrier in miniaturized fed-batch cultures. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 1-9, 2011.

PREALL, J. B., AND SONTHEIMER, J. E. RNAi: RISC Gets Loaded. **Cell**, v. 123, p. 543– 545. 2005.

PRICE, D. R. G.; GATEHOUSE, J. A. RNAi-mediated crop protection against insects. **Trends in Biotechnology**, Oxford, v.26, p.393-400, 2008.

RAVISHANKAR, S.; AMBADY1, A.; RAMU, H.; et al. An IPTG Inducible Conditional Expression System for Mycobacteria. **PLOS ONE**, 2015.

ROBINSON, K. E., WORRALL, E. A., AND MITTER, N. Double stranded RNA expression and its topical application for non-transgenic resistance to plant viruses. **Journal of Plant Biochemistry Biotechnology**, v. 23, p. 231–237. 2014.

ROSANO, G. L. CICCARELLI, E. A. R. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Front Microbiol**, v. 5, p.172. 2014.

ROZENDO, A. S.; BRAZ, L. C. C.; OLIVEIRA, F. J. C.; ALMEIDA, E. S.; JÚNIOR, F. C. S.; GUIMARÃES, J. R.; NÓBREGA, F. F. F.; VAZ, M. R. F. Estratégias de indução na produção de antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi*. **Revista Saúde e Ciência**, v. 3, p. 174-188, 2014.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 307, p. 249-264, 2008.

SCHUMANN, W. AND FERREIRA, L. C. S. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Genetics Molecular Biology**, v.27, n.3, p.442-453. 2004.

SHOJAOSADATI, S. A.; KOLAEI, S. M. V.; BABAEIPOUR, V.; FARNOUD, A. M. Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. Review Article. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 63-84, 2008.

SHULER M.L.; KARGI F. **Bioprocess engineering, basic concepts**. PTR Prentice Hall. 1992.

STUCHI, E.S.; GIRARDI, E.A. **Use of horticultural practices in citriculture to survive huanglongbing**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, Documentos 189. 2010. 71 p.

TAKIFF, H. E.; CHEN, S. M.; COURT, D. Genetic analysis of the rnc operon of *E. coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 171, p. 2581-2590. 1989.

TEIXEIRA, D.; AYRES, J.; DE BARROS, A. First report of a huanglongbing-like disease of citrus in São Paulo State, Brazil and association of a new liberibacter species, "*Candidatus Liberibacter americanus*", with the disease. **Plant Disease** v. 89, p.107, 2005.

TIMMONS, L.; COURT DL AND FIRE A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. **Gene**, v. 263, p. 103- 263. 2001.

TOMARI, Y.; ZAMORE, P. Machines for RNAi. **Genes and Development**, v. 19, p. 517–529. 2005.

TOMAZETTO, G.; MULINARI, F.; STANISÇUASKI, F.; SETTEMBRINI, B.; CARLINI, C. R.; AYUB, M. A. Z. Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 821-827, 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VAZ, M. R. F. **Influência das condições de cultivo na produção de antígenos recombinantes de *Leishmania i. chagasi* utilizando *Escherichia coli* M15 cultivada em incubador rotativo e biorreator**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2011.

VAZ, M. R. F.; SOUSA JUNIOR, F. C.; COSTA, L. M.R.; SANTOS, E. S.; MARTINS, D. R. A.; MACEDO, G. R. Optimization of culture médium for cell growth and expression of 648 antigen from *Leishmania infantum chagasi* in recombinant *Escherichia coli* M15. **Annals of Microbiolgy**, v. 65, p.1607-1613. 2014.

WANDREY, G.; BIER, C.; BINDER, D.; HOFFMANN, K.; JAEGER, K. E.; PIETRUSZKA, J.; DREPPER, T.; BUCHS, J. Light-induced gene expression with photocaged IPTG for induction profiling in a high-throughput screening system. **Microbial Cell Factories**, v. 15, 63, 2016.

WOOD, T.; PERETTI, S. Effect of chemically-induced, cloned-gene expression on protein synthesis in *E. coli*. **Biotechnology and bioengineering**. v. 38. n. 4, p.397-412. 1991.

WURIYANGHAN, H. et al. Oral delivery of double-stranded RNAs and siRNAs induces RNAi effects in the potato/tomato psyllid, *Bactericerca cockerelli*. **PLoS One** 6, e27736. 2011.

XUE, W.; FAN, D.; SHANG, L.; Effects of acetic acid and its assimilation in fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* containing human-like collagen cDNA. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, p. 257-261, 2010.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia molecular básica**. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014.

ZANFONATO, K. **Produção de poli (3-hidroxiacetato) por linhagens de *Escherichia coli* DH5 α e JM101 recombinantes**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. 96p, 2012.

ZHANG, H.; ZHENG, Y.; LIU, Q.; TAO, X.; ZHENG, W.; MA, X.; WEI, D. Development of a fed-batch process for the production of anticancer drug TATm-survivin(T34A) in *Escherichia coli*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 163-168, 2009.

CAPÍTULO II

Otimização da produção de dsRNA em *Escherichia coli* (HT-115) visando o controle do psílídeo *Diaphorina citri*

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE dsRNA EM *Escherichia coli* (HT-115) VISANDO O CONTROLE DO PSILÍDEO *Diaphorina Citri*

Layanna Rebouças de Santana Cerqueira^a, Eduardo Chumbinho de Andrade^b

^a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (Rua Rui Barbosa, 710 - Campus Universitário CEP 44380-000, Cruz Das Almas/BA)

^b Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – BA - BRASIL.

Resumo

O uso da tecnologia de RNA de interferência (RNAi) para o manejo de pragas se apresenta como uma estratégia de controle ecologicamente correta, possibilitando o controle específico de uma praga sem afetar outras espécies do ecossistema. A molécula de dsRNA apresenta-se como ingrediente ativo de uma nova classe de biopesticidas. Para que produtos à base de dsRNA sejam realidade na agricultura, é preciso estratégias de produção de dsRNA em larga escala e baixo custo. O objetivo deste trabalho foi determinar os melhores parâmetros para o crescimento de *E. coli* HT115 e produção de dsRNA. Os parâmetros avaliados individualmente foram meio de cultivo (LB, 2YT e SOC); tempo de indução (DO₆₀₀ 0,4 e 0,7); concentração de IPTG (0,6; 0,8; 1,0; 1,5 e 2,0 mM); temperatura de crescimento/indução (30 e 37 °C); agitação (180 e 250 rpm) e DO₆₀₀ de coleta. O meio LB promoveu uma maior produção de dsRNA quando induzido em DO₆₀₀ 0,4, agitação 250 rpm e momento para a coleta da bactéria na DO₆₀₀ 1,0. Dentre as concentrações testadas não houve diferença estatística entre 0,6, 0,8 e 1,0 mM. As concentrações de 1,5 e 2,0 mM de IPTG apresentaram menores rendimentos de dsRNA. Para avaliação dos parâmetros combinados foi utilizado o delineamento central rotacional (DCCR) no intuito de avaliar a interação de diferentes concentrações de IPTG e temperaturas. A análise DCCR permitiu a confirmação do meio LB e DO₆₀₀ de indução 0,4 como mais eficiente para produção de dsRNA. A otimização desses parâmetros permitiu um aumento na produção de dsRNA de 700 ng/mL para 4851 ng/mL (693%).

Palavras-chave: RNA de interferência. Fermentação. Controle de pragas. Indução.

Abstract

The use of RNA interference technology (RNAi) for pest management is presented as an environmental-friendly control strategy, enabling specific control of a pest without affecting other species in the ecosystem. The dsRNA molecule presents itself as an active ingredient in a new class of biopesticides. For dsRNA-based products to become a reality in agriculture, large-scale, low-cost dsRNA production strategies are needed. The objective of this work was to determine the best parameters for the growth of *E. coli* HT115 and production of dsRNA. The parameters evaluated individually were culture medium (LB, 2YT and SOC); induction time (DO₆₀₀ 0.4 and 0.7); concentration of IPTG (0.6; 0.8; 1.0; 1.5 and 2.0 mM); growth / induction temperature (30 and 37 °C); agitation (180 and 250 rpm) and point of bacterial collection DO₆₀₀. The LB medium promoted a higher production of dsRNA when bacteria was induced at DO₆₀₀ 0.4, agitation 250 rpm and collected at DO₆₀₀ 1.0. Among IPTG concentrations tested, there was no statistical difference between 0.6, 0.8 and 1.0 mM. The concentrations of 1.5 and 2.0 mM showed lower yields of dsRNA. To evaluate the combined parameters, a central rotational design (DCCR) was used in order to evaluate the interaction of different concentrations of IPTG and temperatures. The DCCR analysis allowed the confirmation of the LB medium and induction at DO₆₀₀ 0.4 as the most efficient for dsRNA production. The optimization of these parameters allowed an increase in the production of dsRNA from 700 ng / mL to 4851 ng / mL (693%).

Keywords: RNA interference. Fermentation. Pest control. Induction.

Introdução

A agroindústria citrícola brasileira se destaca como uma das mais importantes atividades do agronegócio brasileiro, movimentando a geração de empregos e impactando diretamente na economia dos 350 municípios de São Paulo e Triângulo Mineiro, onde a atividade é predominante. Entretanto, a expansão de pragas e doenças tem refletido significativamente nos custos de produção. O aumento da incidência da doença Huanglongbing (HLB) tem sido um dos principais responsáveis pelos prejuízos econômicos enfrentados pela citricultura brasileira. Estima-se que apenas no Brasil mais de 55 milhões de árvores foram erradicadas nos últimos doze anos [1].

O HLB é causado por três espécies de bactérias denominadas *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter americanus* e *Candidatus Liberibacter africanus*, não cultivável em meio de cultura e limitada ao floema da planta hospedeira. No Brasil a espécie asiática predomina, mas os sintomas podem também ser causados por *Ca. L. americanus*, ambas transmitidas pelo psíldeo *Diaphorina citri* [2, 3]. Não existe resistência genética identificada no gênero citros e as principais medidas de controle para o HLB são a eliminação de plantas sintomáticas, o controle do inseto vetor, e o uso de mudas saudáveis [4].

Uma nova possibilidade para o manejo de pragas é o controle do inseto vetor pela tecnologia de RNA de interferência (RNAi), um mecanismo altamente conservado em eucariotos envolvido no controle da expressão gênica e defesa antiviral. O mecanismo de RNAi é ativado pela presença de uma molécula de fita dupla de RNA (dsRNA), que pode ter origem endógena ou exógena [5, 6].

A aplicação do RNAi na agricultura irá estabelecer um novo padrão no controle de pragas, o “Controle de pragas altamente específico” (Highly Specific Pest Control, HiSPeC) [7], a qual é possível controlar uma determinada espécie sem que afete espécies não alvo. Estudos [7-11] constataram que a aplicação de dsRNAs específicos para o psíldeo acarretou em elevada mortalidade dos insetos que se alimentaram em brotações de citros que absorveram dsRNAs, demonstrando que a tecnologia de RNAi é promissora para o controle do psíldeo.

Nesse contexto, o dsRNA apresenta-se como ingrediente ativo para produção de biopesticidas. A produção de dsRNA em larga escala e baixo custo é um dos principais gargalos para o uso da tecnologia de RNAi no campo. Um método de produção que tem sido explorado é o uso de sistemas fermentativos, utilizando estirpes engenheradas de *Escherichia coli* como a HT115 (DE3).

Para a produção dos produtos heterólogos, várias etapas são necessárias para a viabilidade do processo, desde o aperfeiçoamento da engenharia genética no desenvolvimento de cepas que trazem consigo os melhores genes exógenos, até o apuramento da estratégia do processo de produção em si [12, 13]. O rendimento final de um produto recombinante depende de diversos parâmetros, dentre eles destacam-se a temperatura, as condições de aeração, composição do meio de cultivo, além do tipo e concentração do agente indutor empregado [14].

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de dsRNA em *E. coli* HT115, para aplicação na agricultura, com foco no controle de *D. citri*.

utilizada para inocular 10 mL de meio LB suplementado com ampicilina e incubado a 37 °C/250 rpm. O crescimento bacteriano foi acompanhado pela leitura da densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) em espectrofotômetro. Ao atingir um DO_{600} igual a 0,4 a suspensão bacteriana foi induzida pela adição de Isopropil β -D1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a uma concentração final de 0,4 mM e mantido a 37 °C/250 rpm até atingir uma leitura de DO_{600} igual a 1,0, quando a suspensão bacteriana foi coletada por centrifugação à 5000 rpm/5 minutos.

Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet de bactéria ressuspenso em 800 μ L de solução SDS 0,1% e aquecido a 95 °C por 2 minutos. Em seguida foram adicionados 800 μ L de Trizol[®] (Thermo-Fisher), agitado vigorosamente e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. O volume foi transferido para um microtubo de 2 mL, seguido da adição de 200 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), homogeneizado e centrifugado a 12.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e o dsRNA foi precipitado pela adição de 800 μ L de isopropanol seguido de centrifugação a 12.000g por 10 minutos. O pellet foi ressuspenso em 100 μ L de água livre de nucleases e armazenado a -20 °C até o uso.

Uma alíquota de 5 μ L do dsRNA extraído foi tratado com DNase (2U) e S1 nuclease (2U) para remoção do DNA e RNA de fita simples, respectivamente, e a concentração do dsRNA foi estimada em gel de agarose 1%, e comparado com o DNA Lambda (λ) diluído a 100 ng/ μ L. A imagem do gel foi capturada utilizando sistema Kodak Gel Logic 200. O rendimento na produção de dsRNA (em ng/mL) foi calculado de acordo com a fórmula: $Rend. = C \times 100 / V$, onde C= concentração do dsRNA (ng/ μ L) observada no gel de agarose; V= volume (em mL) de suspensão bacteriana utilizada no processo de extração.

A partir desse protocolo foi montado o experimento, modificando apenas o parâmetro a ser avaliado. Cada parâmetro foi testado individualmente.

Parâmetros avaliados

Foram avaliados, individualmente, seis parâmetros: meio de cultivo, densidade óptica (DO_{600}) no momento da indução, densidade óptica da coleta, concentração do agente indutor (IPTG), temperatura de incubação e agitação.

Os meios de cultivo avaliados foram o LB, 2YT (Extrato de levedura tripton) e SOC (meio SOB - Super Optimal Broth, suplementado com 20 mM de glicose). Os meios foram preparados de acordo com a Tabela 1 e suplementados com antibiótico ampicilina (100 μ g/mL).

O crescimento celular foi acompanhado pela medida da DO_{600} , e os momentos de indução avaliados ocorreram quando a leitura de DO_{600} atingiu 0,4 ou 0,7. A avaliação no momento da coleta foi realizada quando a DO_{600} atingiu 1,0 e 1,3. Foram testadas cinco concentrações finais de IPTG: 0,6; 0,8; 1,0; 1,5 e 2,0 mM, duas temperaturas de crescimento e indução, 30 e 37 °C, e agitação a 180 e 250 rpm. Todos os parâmetros foram testados em triplicatas e repetidos pelo menos três vezes. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos três vezes. Os dados foram apresentados como média e submetidos à análise de variância e teste t a 5% de significância utilizando o programa R Studio [18].

Tabela 1. Composição dos meios de cultivo para *Escherichia coli*.

Composição	Meios de Cultivo		
	LB	2TY	SOC
Triptona (g/L)	10	16	20
Extrato de levedura (g/L)	5	10	5
NaCl (g/L)	10	5	0,59
KCl 2,5 mM (g/L)	-	-	0,19
MgSO ₄ 10mM (g/L)	-	-	9,52
Glicose 20mM (mL/L)	-	-	20
pH	7	7	7

Análise Fatorial

Após a avaliação dos parâmetros de crescimento e indução, foi realizada a otimização das variáveis concentração de IPTG e temperatura na produção de dsRNA utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), ou seja, um 2^2 incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios [17]. A Tabela 2 demonstra o delineamento adotado.

Os ensaios foram montados seguindo o protocolo padrão, descrito anteriormente. O planejamento foi aplicado aos meios de cultivo (LB, 2YT e SOC) e na D.O. de indução 0,4 e 0,7. A velocidade de agitação foi fixada em 250 rpm e a coleta da cultura foi realizada na DO_{600} de 1,0. A análise dos efeitos do DCCR foi feita utilizando o programa “Statistic 7.0®” [19]. A validação do modelo proposto, a partir da análise dos efeitos, foi feita por meio da análise de variância (Anova).

Para validar o experimento fatorial, o ensaio de melhor rendimento foi repetido em triplicata, e o resultado apresentado como média.

Tabela 2. Valores codificados e reais utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 para análise de produção de dsRNA em diferentes concentrações de IPTG e temperatura.

Variável	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Concentração(mM)	0,1	0,23	0,55	0,87	1,0
Temperatura (°C)	25	28	32,5	37	40

Após otimização dos parâmetros foi realizada um escalonamento da produção para 100 mL de meio de cultivo.

Resultados

A concentração do dsRNA foi estimada em gel de agarose 1%, e comparado com o DNA Lambda (λ), de acordo com a Figura 2.

Os valores médios de rendimento de dsRNA, medidos em nanogramas de dsRNA por mililitro de meio de cultivo (ng/mL), para cada parâmetro avaliado estão apresentados na Figura 3. A análise dos parâmetros: meios de cultivo, DO₆₀₀ de indução e temperatura apresentaram diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o teste t a 5% de probabilidade. O meio LB obteve maior produção de dsRNA atingindo um rendimento de 700 ng/mL, muito superior ao obtido com os meios 2YT (221,30 ng/mL) e SOC (36,82 ng/mL). Em relação ao momento da indução, quando realizada na DO₆₀₀ 0,4 a produção de dsRNA se mostrou superior com um rendimento de 504,25 ng/mL, enquanto que a indução realizada na DO₆₀₀ 0,7 apresentou um rendimento de 208,08 ng/mL. O cultivo a uma temperatura de incubação de 37 °C obteve um rendimento de 1803,57 ng/mL de dsRNA, quase três vezes maior que o rendimento obtido com um cultivo a temperatura de 30 °C, 730,81 ng/mL.

A análise das médias de rendimento entre as concentrações de IPTG avaliadas apresentou diferença estatística. As concentrações 0,6, 0,8 e 1,0 mM apresentaram maiores rendimentos. É possível observar que quanto menor a concentração de IPTG, maior o rendimento de dsRNA, visto que as concentrações de 1,5 e 2,0 mM de IPTG apresentaram menores rendimentos de dsRNA.

Os parâmetros agitação e DO de coleta não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos, de acordo com o teste t a 5% de probabilidade.

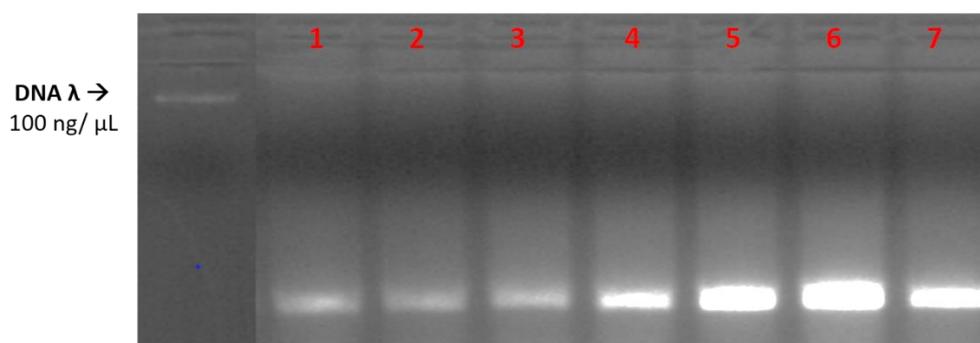


Fig. 2 Eletroforese em gel de agarose. DNA Lambda (λ) diluído a 100 ng/ μ L. Linhas 1 a 7: dsRNA purificado

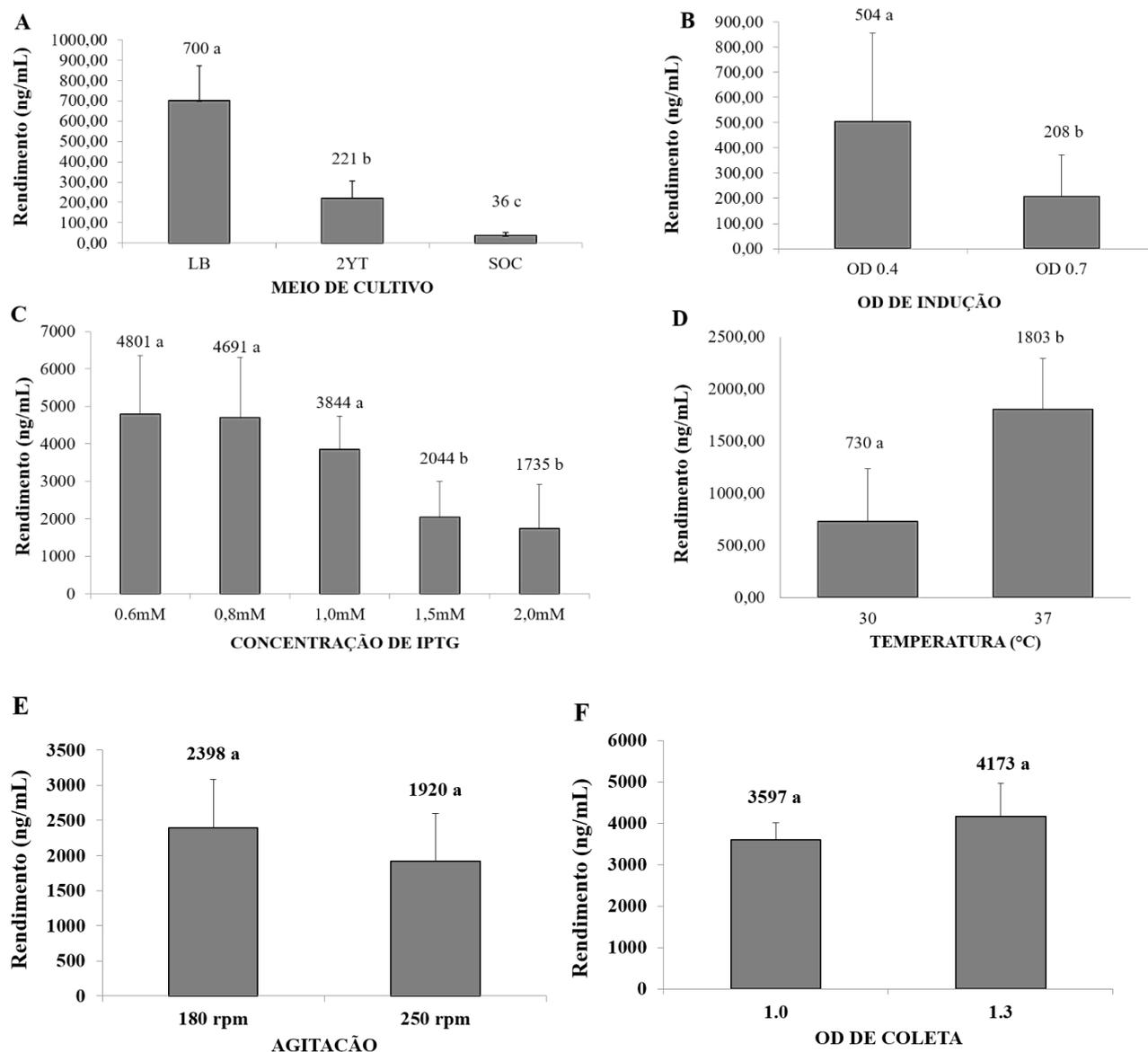


Fig. 3 Valores médios de rendimento de dsRNA produzido em *E. coli* HT-115(DE3) para os parâmetros meios de cultivo (A), densidade óptica de indução (DO_{600}) (B), concentração de IPTG (C), temperatura (D), agitação (E) e densidade óptica de coleta (DO_{600}) (F). Médias seguidas pelas mesmas letras não se diferem estatisticamente pelo teste t ($p < 0,05$).

Em processos fermentativos, cada variável pode interagir e influenciar no efeito das outras variáveis, sendo necessário a utilização de um método de otimização que permita detectar essas possíveis interações, de modo que um ponto ótimo seja escolhido. O delineamento composto central rotacional (DCCR) é um delineamento econômico para a superfície de resposta, devido ao número reduzido de combinações entre os níveis dos fatores estudados [20].

Os planejamentos DCCR com os meios LB, 2YT e SOC e DO_{600} 0,4 e 0,7 foram considerados não significativos nas condições testadas, pois os valores de F calculado foram menores que F tabelado a 5% de probabilidade.

Entretanto, a análise conjunta dos dados possibilita observar que, na leitura DO_{600} 0,7, o ensaio 8 (0,55 mM de IPTG e 40 °C) apresentou maiores rendimentos para os três meios de cultura (Tabela 3). O mesmo foi observado na leitura DO_{600} 0,4 para os meios 2YT e SOC (2280,7 e 1133,6 ng/mL), enquanto o maior rendimento no meio LB foi no ensaio 6 (1,0 mM de IPTG e 32,5 °C) com 2631,58 ng/mL (Tabela 4).

Tabela 3. Matriz do delineamento fatorial com as diferentes concentrações de IPTG e temperatura para determinação do rendimento de dsRNA (ng/mL de meio) quando a indução da expressão ocorreu na densidade ótica 0,7.

Tratamento	Concentração (mM)	Temperatura (°C)	Rendimento meio LB	Rendimento meio 2YT	Rendimento meio SOC
1	0,23	28	382,78	133,97	17,54
2	0,87	28	574,16	133,97	0,00
3	0,23	37	647,77	242,91	0,00
4	0,87	37	647,77	129,55	0,00
5	0,1	32,5	877,19	263,16	0,00
6	1,0	32,5	701,75	140,35	145,75
7	0,55	25	421,05	421,05	76,56
8	0,55	40	956,94	526,32	145,75
9	0,55	32,5	350,88	140,35	70,18
10	0,55	32,5	323,89	129,55	80,97
11	0,55	32,5	323,89	129,55	16,19

Tabela 4. Matriz do delineamento fatorial com as diferentes concentrações de IPTG e temperatura para determinação do rendimento de dsRNA (ng/mL de meio) quando a indução da expressão ocorreu na densidade ótica 0,4.

Tratamento	Concentração (mM)	Temperatura (°C)	Rendimento meio LB	Rendimento meio 2YT	Rendimento meio SOC
1	0,23	28	1339,71	1148,33	526,32

2	0,87	28	1339,71	1148,33	350,88
3	0,23	37	1339,71	1148,33	263,16
4	0,87	37	1578,95	1403,51	16,19
5	0,1	32,5	2280,7	647,77	701,75
6	1,0	32,5	2631,58	647,77	701,75
7	0,55	25	2573,1	1637,43	765,55
8	0,55	40	2105,26	2280,7	1133,6
9	0,55	32,5	1403,51	1403,51	350,88
10	0,55	32,5	1403,51	809,72	485,83
11	0,55	32,5	1403,51	809,72	809,72

Apesar do ensaio 6 (Tabela 5) apresentar o maior rendimento de dsRNA (2631,58 ng/mL), foi possível observar que os ensaios 5 (0,1 mM de IPTG e 32,5 °C), 7 (0,5 mM de IPTG e 25 °C) e 8 (0,5 mM de IPTG e 40 °C) também apresentaram altos rendimentos (2280,7; 2573,10 e 2105,26 ng/mL, respectivamente). Uma concentração a 0,55 mM de IPTG se mostrou eficiente tanto a 25 °C quanto a 40 °C. Enquanto que a temperatura de 32,5 °C apresentaram bons rendimentos utilizando 0,1 e 1,0 mM de IPTG.

Apesar dos resultados não permitirem a obtenção de um modelo preditivo, a análise fatorial confirmou os resultados obtidos com a análise individual dos parâmetros, que apontam o meio LB e a DO de indução 0,4 como mais eficientes para produção de dsRNA (Figuras 4 e 5). Não foi possível determinar qual a melhor combinação entre concentração de IPTG e temperatura, o que demonstra haver é uma tendência de maior rendimento na DO=0,4 nos ensaios 5 a 8.

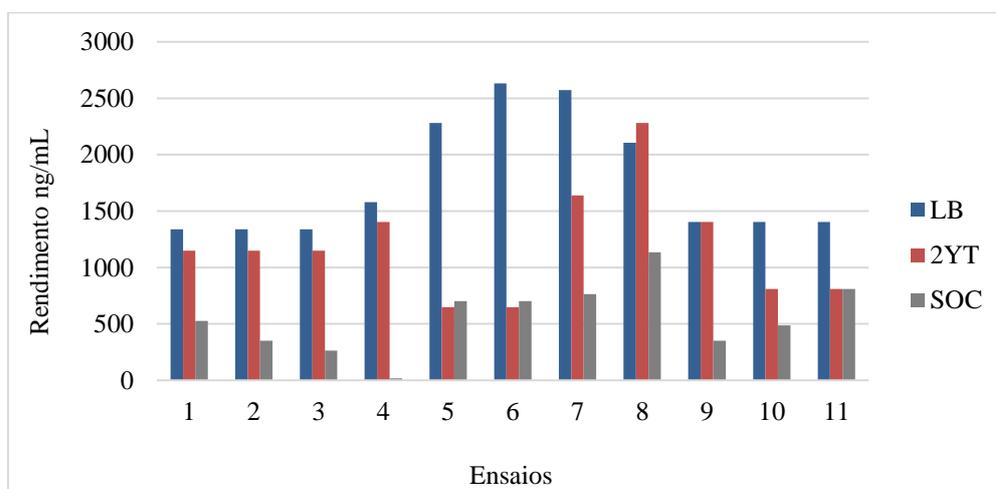


Fig. 4 Rendimento de dsRNA em diferentes combinações de concentração de IPTG e temperatura nos meios LB, 2YT e SOC à densidade óptica 0,4.

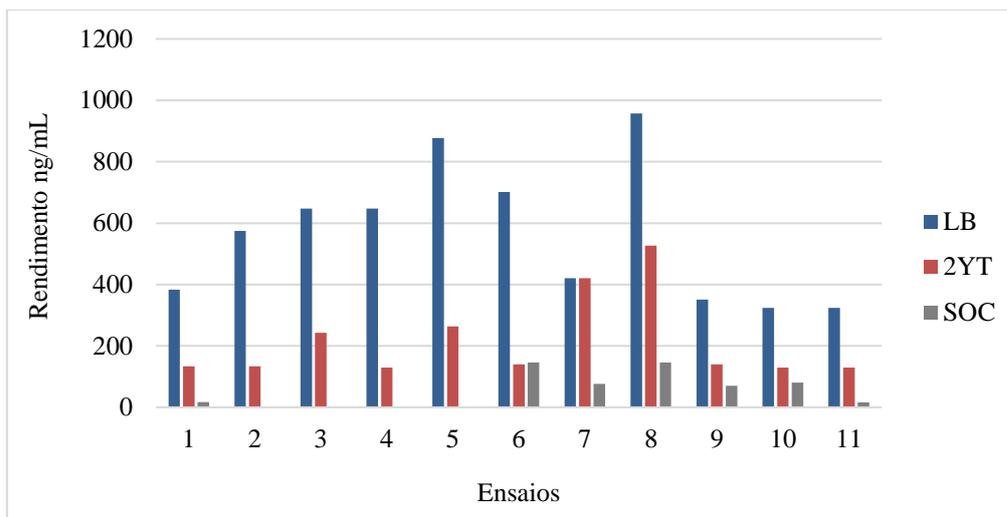


Fig. 5 Rendimento de dsRNA em diferentes combinações de concentração de IPTG e temperatura nos meios LB, 2YT e SOC à densidade óptica 0,7.

Para a validação experimental a concentração de IPTG foi fixada em 0,5 mM e foi testado três temperaturas (25, 33 e 40 °C) utilizando o meio LB (Figura 6). As três temperaturas não apresentaram diferenças estatística entre si.

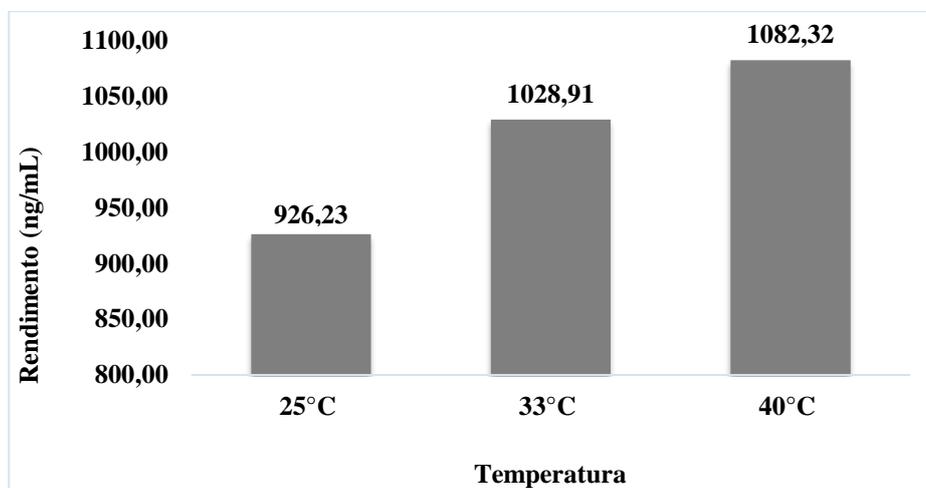


Fig. 6 Validação experimental para produção de dsRNA em meio LB e diferentes temperaturas.

Após os testes de otimização, o protocolo foi aplicado a um volume de 100 mL de meio, produzindo cerca de 1220 ng/mL de dsRNA (Figura 7).

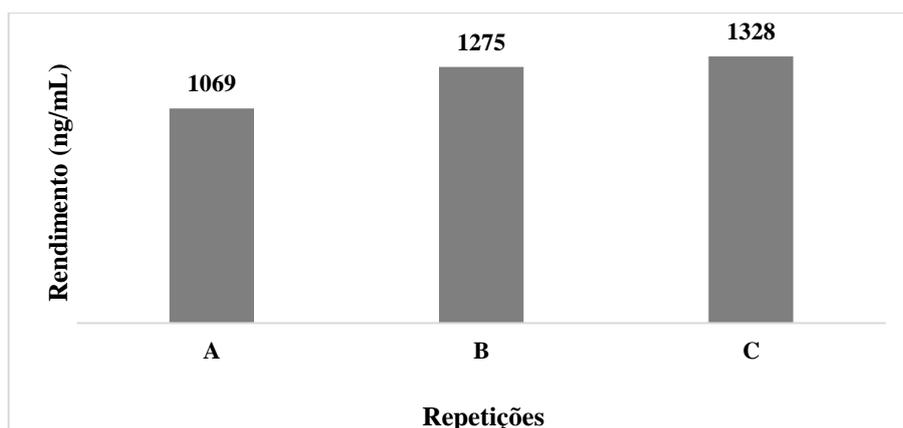


Fig. 7 Rendimentos de dsRNA em produção utilizando 100 mL de meio de cultivo

Discussão

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a produção *in vivo* de dsRNA utilizando a estirpe de *E. coli* HT115 pode ser usada como uma alternativa para produzir grandes quantidades de dsRNA a baixo custo. A cepa de *E. coli* HT115 foi modificada para expressar a RNA polimerase do fago T7, expressão controlada por um promotor induzível por IPTG [21].

Altas concentrações celulares são geralmente obtidas quando se adiciona componentes complexos aos meios como, por exemplo, extrato de leveduras, triptonas e, em alguns casos, casaminoácidos [22]. Entre os meios analisados, o LB se mostrou mais eficiente na produção de dsRNA, tanto na análise individual quanto na análise fatorial, comparado com os meios 2YT e o SOC, produzindo cerca de 3 e 19 vezes mais dsRNA respectivamente. A maior disponibilidade de nutrientes favoreceu o rápido crescimento celular, mas foi insatisfatória para produção de dsRNA. Isso acontece devido a maior quantidade de metabólitos secundários produzidos pelo microrganismo durante a fermentação que funcionam como inibidores da expressão. Em meio de cultivo complexo, a quantidade de nutrientes, disponíveis sob forma de aminoácidos e vitaminas presentes no extrato de leveduras ou na triptonas, faz com que o microrganismo consuma estes compostos para biossíntese e a fonte de carbono (glicose) para obtenção de energia, utilizando as vias fermentativas como forma de regulação do fluxo de nutrientes presentes. Assim, uma maior concentração de extrato de leveduras, como no meio 2YT, acarreta uma maior produção de subprodutos no meio de cultivo, como o ácido acético [23].

Vaz et al. [14] analisaram dois meios de cultivos para crescimento celular e expressão do antígeno 504 de *Leishmania infantum chagasi*, um meio rico em extrato de leveduras e glicerol, e outro rico em triptonas. Foi observado que o meio rico em extrato de leveduras

favoreceu apenas o crescimento celular. Já o meio com alta concentração de triptona resultou em altos níveis da proteína desejada. Diferente do que foi encontrado no presente trabalho, onde uma menor quantidade de triptona e extrato de levedura favoreceu uma maior produção de dsRNA, evidenciando que os níveis de expressão gênica são específicos do sistema e podem variar de acordo com o produto recombinante.

Ahn et al. [24] produziram dsRNA com o sistema de expressão de *E. coli* utilizando o meio 2YT e conseguiram rendimentos de 3,9 µg/mL, resultado similar ao obtido neste trabalho. Chen et al [25], utilizando o meio LB, conseguiram uma concentração final de 425 ng/µL de dsRNA, porém neste trabalho eles não indicam o volume de cultura bacteriana utilizada, assim não é possível estimar o rendimento de dsRNA.

A produção de dsRNA em uma agitação de 180 ou 250 rpm não apresentou diferenças estatísticas, além disso, a diminuição da frequência de agitação não afetou o tempo de indução, que foi em média 4,5 horas para os dois tratamentos. Optamos por utilizar uma frequência de agitação de 250 rpm nas avaliações seguintes baseada no fato de que uma elevada agitação tende a aumentar a troca metabólica da célula com o meio de cultivo obtendo energia suficiente para bactéria exercer suas atividades metabólicas, sem desviar seu metabolismo para formação de ácido acético, que é um inibidor da expressão [26]. O mesmo aconteceu com a DO de coleta, não apresentando diferenças estatísticas, no entanto foi possível observar uma variação grande no tempo de indução. Enquanto que para atingir a DO₆₀₀ 1.0 foram necessárias 5 horas de indução, precisou-se de 21 horas de indução, quatro vezes mais, para que a cultura atingisse uma DO₆₀₀ de 1.3. Um tempo maior de indução acarreta em maiores custos para o processo de produção ficando inviável economicamente.

A temperatura e o indutor são parâmetros que também afetam diretamente a expressão do produto recombinante. A indução consiste no aumento da transcrição de genes estruturais de um operon em resposta à presença de um substrato específico no meio, no caso o IPTG, que pode ser influenciada por diversos parâmetros, entre eles a fase de indução e a concentração do indutor [27]. As condições mais utilizadas para expressão de proteínas recombinantes utilizam uma concentração de 1,0 mM de IPTG à uma temperatura de 37 °C [28].

Na avaliação individual foram testadas as temperaturas de 30 e 37 °C. O cultivo da bactéria numa temperatura de 30 °C, além de ter apresentado um crescimento mais lento ainda produziu cerca de três vezes menos dsRNA comparado ao cultivo na temperatura de 37 °C. Resultado semelhante ao obtido por Nguyen [29], que comparou o crescimento celular de *E. coli* DH5α nas temperaturas de 28, 37 e 45 °C e observou que a bactéria conseguiu

crescer mais na temperatura de 37 °C, enquanto que houve uma média de 35% e 32% menos células, na temperatura de 28 e 45 °C, respectivamente. Já na análise fatorial o cultivo da bactéria nas temperaturas de 25, 33 e 40 °C, obtiveram um rendimento maior de dsRNA comparadas com o cultivo na temperatura de 28 e 37 °C, porém, nessa análise, não foram testadas todas as faixas de temperaturas com a mesma concentração de IPTG.

Na análise individual da concentração de IPTG, os cultivos induzidos com 0,6; 0,8 e 1,0 mM de IPTG não apresentaram diferenças significativas no rendimento do dsRNA. As concentrações de 1,5 e 2,0 mM também não apresentaram diferenças entre si, porém, produziram menos dsRNA. Hu et al. [30], produzindo proteína recombinante L23, Collins et al. [31] produzindo proteínas do tipo seda-elastina, e Malik et al. [32] na produção da proteína cHSPA6, utilizaram concentrações de IPTG que variaram de 0,1 a 3,0 mM e observaram que não houve variação significativa na concentração da proteína expressa. O que difere do presente trabalho que mostrou haver uma redução significativa na produção de dsRNA quando utilizado concentrações acima de 1,0 mM.

De acordo com Wood [33], existe uma tendência linear de aumento da atividade de β -galactosidase com o aumento da concentração do IPTG até 1,0 mM. Provavelmente devido a titulação completa da proteína repressora LacI pelo IPTG, ou seja, quase todas as moléculas repressoras já estão ligadas pelo IPTG a 1,0 mM logo, o IPTG adicional não irá aumentar significativamente a transcrição do lacZ [33, 34]. No caso da produção de dsRNA a bactéria expressa a T7 polimerase, em função do IPTG, que irá se ligar a região promotora do plasmídeo e realizar a transcrição do dsRNA. Uma possível explicação para concentrações de 0,1 a 1,0 mM resultarem em rendimentos similares, é que concentrações maiores de IPTG (acima de 1,0 mM) podem levar a uma super expressão da T7 polimerase, aumentando a competição pela região do promotor no plasmídeo diminuindo a eficiência da transcrição do dsRNA.

Sendo assim é possível afirmar é que o cultivo da bactéria nas temperaturas 25, 33 ou 40 °C, utilizando 0,5 mM de IPTG (resultado confirmado com a validação da análise fatorial), ou a 37 °C utilizando 0,6 mM de IPTG permite produzir altas quantidades de dsRNA. Entretanto, levando-se em consideração que a concentração do IPTG pode influenciar negativamente o crescimento celular, devido a efeitos tóxicos para células bacteriana, e possuir um alto impacto nos custos do processo [34, 35] a condição de cultivo da *E. coli* a 33 °C e 0,1 mM de IPTG, também pode ser uma opção.

Tanto nos ensaios individuais quanto no DCCR as culturas foram induzidas no momento em que a DO₆₀₀ atingiu 0,4 (início da fase exponencial) e 0,7 (meio da fase

exponencial). A indução em DO₆₀₀ 0,4 foi mais eficiente, nas duas análises, chegando a produzir até 4 vezes mais dsRNA do que quando induzida em DO₆₀₀ 0,7. Assim como Olaofe et al. [34], que produzindo amidase induziram a cultura bacteriana em três momentos distintos, no final da fase lag, no início da fase exponencial e no meio da fase exponencial, e observaram um aumento de 3 vezes na expressão da amidase quando a cultura foi induzida no início da fase exponencial em comparação com a fase exponencial média. A indução na fase lag inibiu o crescimento celular. O baixo rendimento de dsRNA quando induzido no meio da fase exponencial pode ser atribuída a uma diminuição na concentração de nutrientes, especialmente a fonte de carbono, inibindo assim o crescimento celular.

Na análise desse trabalho, um alto coeficiente de variação observado não permitiu uma análise significativa do DCCR. As possíveis causas dessa variação podem estar relacionadas com uma reversão da mutação do gene *rnc*, codificador da enzima RNase III, que degrada o dsRNA ou com o protocolo de extração escolhido, sendo necessário um ajuste a fim de minimizar esses efeitos. Uma outra alternativa para o uso do DCCR e minimizar os efeitos dessa variação é aumentar o número de repetições por tratamento [20].

Ongvarrasopone, Roshorme e Panyim [21], utilizaram a cepa de *E. coli* HT 115 para produzir grandes quantidades de dsRNA com um baixo custo e obtiveram 1,5 mg de dsRNA em 50 mL de cultura bacteriana (30 µg/mL). Eles relataram que conseguiram produzir 30 mg de dsRNA a um custo de 1/3 em relação ao custo da produção de dsRNA in vitro.

Com otimização dos parâmetros, foi possível produzir até 57 µg de dsRNA em 10 mL de cultura. Escalonando essa produção para 100 mL é possível obter cerca de 570 µg de dsRNA a um custo de R\$0,047/µg. Nessa perspectiva, será possível produzir cerca de 10mg de dsRNA a um custo de ~US\$100, quatro vezes mais barato que o custo da transcrição in vitro [35].

Conclusão

As condições mais promissoras para produção de dsRNA em *E. coli* são o meio LB, DO₆₀₀ de indução 0,4, 250 rpm de agitação e DO₆₀₀ de coleta 1,0.

Uma concentração de 0,6 mM de IPTG a uma temperatura de 37 °C, permitiu a maior produção de dsRNA.

A otimização desses parâmetros permitiu um aumento de 685% na produção de dsRNA.

A produção *in vivo* de dsRNA usando um sistema bacteriano de *E. coli* pode ser eficazmente empregada para produzir uma grande quantidade de dsRNA com baixo custo para estudos de RNAi.

Referências

1. CDA - Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/www/gdsv/index.php?action=dadosCitriculturaPaulista>, publicado em 18/11/2019
2. Machado MA, Locali E, Coletta Filho H. (2010) *Candidatus Liberibacter* spp., agentes do Huanglongbing dos citros. *Citrus Research & Technology* 31:25-35. doi: 10.5935/2236-3122.20100003
3. Teixeira D, Ayres J, De Barros A. (2005) First report of a huanglongbing-like disease of citrus in São Paulo State, Brazil and association of a new liberibacter species, “*Candidatus Liberibacter americanus*”, with the disease. *Plant Dis* 89 (1):107. doi: 10.1094/PD-89-0107A
4. Belasque Junior J, Bergamin Filho A, Beozzo Bassanezi R. (2009) Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology*, 34:137–145.
5. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391:806-811. doi:10.1038/35888
6. Carthew R, Sontheimer E. (2009) Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136: 642-655.
7. Gordon KHJ, Waterhouse PM (2007) RNAi for insect-proof plants. *Nature Biotechnology* 25: 1231–1232.
8. Hunter WB, Glick E, Paldi N, Bextine BR. (2012). Advances in RNA interference: dsRNA treatment in trees and grapevines for insect pest population suppression. *Southwestern Entomologist* 37 (1):85–87. <https://doi.org/10.3958/059.037.0110>
9. Andrade EC, Hunter WB. (2016) RNAi Feeding Bioassay – Development of a Non-transgenic approaches to Control Asian Citrus Psyllid and other Hemipterans. *Journal of Entomological Research* (In press). <https://doi.org/10.1111/eea.12544>
10. Wuriyangan, H. et al. 2011. Oral delivery of double-stranded RNAs and siRNAs induces RNAi effects in the potato/tomato psyllid, *Bactericerca cockerelli*. *PLoS One* 6, e27736.
11. El-Shesheny, I. et al. (2013). Silencing Abnormal Wing Disc Gene of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Disrupts Adult Wing Development and Increases Nymph Mortality. *PLoS ONE*, 8(5), e 65392. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065392>
12. Andrade, E.C. et al. 2013. Non-transgenic Approach for RNAi Technology to Control Hemipteran Pests. *Agricultural Biotechnology International Conference (ABIC 2013)*, Calgary, Alberta, Canada September 15 – 18.
13. Gupta P, Ghosalkar A, Mishra S. et al. (2009) Enhancement of over expression and chaperone assisted yield of folded recombinant aconitase in *Escherichia coli* in bioreactor cultures. *J Biosci Bioeng*, 107 (2):102-107. doi: 10.1016/j.jbiosc.2008.10.020
14. Hortsch R, Botz W. (2011) Growth and recombinant protein expression with *Escherichia coli* in different batch cultivation media. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90:69-76. doi: 10.1007/s00253-010-3036-y
15. Timmons L, Court DL, Fire A. (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 263:103-112. doi: 10.1016/s0378-1119(00)00579-5
16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (2^a ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

17. Rodrigues MI, Iemma AF (2009) Planejamento de experimentos e otimização de processos (2nd ed., pp. 358). Campinas: Cárita.
18. R Development Core Team (2008) R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
19. Statsoft, INC. Programa computacional Statistica 7.0. E.A.U. 2004.
20. Mendonça LA (2012) Desempenho do delineamento composto central em experimentos com alto coeficiente de variação. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal de Viçosa. 68f.
21. Ongvarrasoponea C, Roshorma Y, Panyim S. (2007) A simple and cost-effective method to generate dsRNA for RNAi studies in invertebrates. *Sci Asia* 33:35-39. doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2007.33.035.
22. Olsson L, Hahn-Hagerdalh B. (1995) Kinetics of ethanol production by recombination *Escherichia coli* KO11. *Biotechnology and Bioengineering*, 45: 356-365.
23. Ahn S, Donahue K, Koh Y, Martin RR, Choi M (2019) Microbial-Based Double-Stranded RNA Production to Develop Cost-Effective RNA Interference Application for Insect Pest Management. *International Journal of Insect Science* 11: 1–8. doi: 10.1177/1179543319840323
24. Chen Z, He J, Luo P, Li X, Gao Y (2018) Production of functional double-stranded RNA using a prokaryotic expression system in *Escherichia coli*. *Microbiol Open*. 2018; e787. doi: 10.1002/mbo3.787
25. Xue W, Fan D, Shang L, Zhu C, Ma X, Zhu X, Yu Y (2010) Effects of acetic acid and its assimilation in fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* containing human-like collagen cDNA. *J Biosci Bioeng* 109:257–261. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.08.008.
26. Rozendo AS, Braz LCC, Oliveira FJC, Almeida ES, Júnior, FCS, Guimarães JR, Nóbrega FFF, Vaz MRF. (2014) Estratégias de indução na produção de antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi*. *Rev Saúde e Ciência*, 3:174-188.
27. Vaz MR, França RL, Andrade SS, Sousa Junior FC, Santos ES, Martins DR, Macedo GR (2011) Influence of culture medium on the production of eif antigen from *Leishmania chagasi* in recombinant *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol* 42:1390– 1396.
28. Nguyen MT. (2006) The effect of temperature on the growth of the bacteria *Escherichia coli* DH5 α . *Saint Martin's University Biology Journal*, I:87-94.
29. Hu P, He X, Zhu C, Guan W, Ma Y. (2014) Cloning and characterization of a ribosomal protein L23a gene from Small Tail Han sheep by screening of a cDNA expression library. *Meta Gene*. 2: 479-488. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2014.06.005>.
30. Collins T, Azevedo-Silva J, Costa A, Branca F, Machado R, Casal M. (2013) Batch production of a silk-elastin-like protein in *E. coli* BL21 (DE3): key parameters for optimization. *Microb Cell Facts*, 12:1-16. doi: 10.1186/1475-2859-12-21.
31. Malik A, Alsenaidy AM, Elrobh M, Khan W, Alanazi MS, Bazzi MD. (2016) Optimization of expression and purification of HSAP6 protein from *Camelus dromedarius* in *E. coli*. *Saudi J Biol Sci*, 23: 410-419. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.04.017.
32. Wood T, Peretti S. (1991) Effect of chemically-induced, cloned-gene expression on protein synthesis in *E. coli*. *Biotechnology and bioengineering*. 38(4):397-412.
33. Olaofe OA, Burton SG, Cowan DA, Harrison STL. (2010) Improving the production of a thermostable amidase through optimising IPTG induction in a highly dense culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal*, 52:19-24. doi:10.1016/j.bej.2010.06.013.

34. Einsfeldt K, Severo Júnior J, Corrêa Argondizzo A, Medeiros M, Alves T, Almeida R et al. (2011) Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: Study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability. *Vaccine*. 29(41):7136-43. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.073
35. AGRORNA - (2019) Disponível em: http://www.agrorna.com/sub_05.html

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A interferência de RNA (RNAi) envolve um mecanismo natural de regulação de genes e um sistema de defesa antiviral em células eucarióticas, resultando na degradação de RNAs por sequência específica. A tecnologia de RNAi é uma possibilidade o “Controle de Pragas Altamente Específico”, capaz de controlar de forma específica uma determinada praga sem afetar outras espécies presentes no ecossistema. O RNAi pode ser integrado ao manejo de importantes pragas agrícolas, reduzindo o número o uso de inseticidas químicos e problemas de contaminação ambiental e à saúde humana.

Nesse contexto, o dsRNA pode ser considerado como um ingrediente ativo de uma nova classe de biopesticida. Entretanto, a aplicabilidade do dsRNA depende do desenvolvimento de métodos econômicos para a produção em massa dessas moléculas. O dsRNA pode ser produzido utilizando kits comerciais, baseados na transcrição *in vitro*, entretanto, é demorado, trabalhoso e caro para produzir em larga escala. A alternativa de produzir dsRNA via processo fermentativo, utilizando cepas de *Escherichia coli* é um método mais econômico, uma vez que não depende de insumos caros, possibilitando que países com menos tecnologia possam produzir o dsRNA a um custo acessível.

Neste estudo, foi otimizado o protocolo para produzir grandes quantidades de dsRNA utilizando a cepa de *E. coli* HT115. Conseguimos determinar parâmetros mais eficientes para produção, como meio de cultivo, a DO₆₀₀ de indução e de coleta e a agitação, além de determinar uma faixa eficiente de concentração de IPTG e de temperatura. Ainda é necessário estudos complementares a fim de minimizar variações no processo de produção e extração do dsRNA, além de realizar testes com volume maiores de cultivo (500 e 1000 mL).

Desse modo, o presente trabalho reforça a eficiência do uso de sistemas de expressão bacteriana de *E. coli*, para produção de dsRNA em grande quantidade com custo relativamente baixo, possibilitando o desenvolvimento de produtos baseados na tecnologia de RNAi, tanto para o controle de *D. citri* como para outras pragas.