

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**ADAPTAÇÃO DE VETORES PARA USO NO
SILENCIAMENTO DE GENES EM ARROZ**

MÔNICA DE MEDEIROS SILVA

Orientador: MARCELO GRAVINA DE MORAES

Trabalho apresentado como um dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel no
Curso de Ciências Biológicas Ênfase Molecular, Celular e Funcional

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jadyr Araújo da Silva e Maria Isabel de Medeiros Silva, pelo apoio durante todos esses anos.

Às minhas irmãs pela compreensão em todos os momentos em que eu as mantive acordadas por ter que estudar.

Ao professor Marcelo Gravina de Moraes pela orientação, ensinamentos e amizade.

À amiga e “co-orientadora” Sandra Maria de Souza pelos ensinamentos, confiança, paciência e amizade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Fitopatologia Molecular, Adriana, Alex, Caren, Elisangela, Jeferson, Johannes, Marcos, Ricardo e Vanina, por proporcionarem um ótimo ambiente de trabalho, pelos ensinamentos e pela amizade.

Às amigas da biologia, Ana Paula, Luana, Luciana, Michele, Paula, Thais e Yole, por todos os momentos que passamos juntas desde o primeiro dia de faculdade.

Aos demais colegas da biologia pela amizade e pelo convívio ao longo do curso, tanto nos momentos de estudos quanto nas horas de festa. Não há espaço para citar todos, mas cada um contribui de seu modo para fazer com que esses quatro anos de faculdade fossem os melhores de minha vida.

Às amigas de longa data, Caterine, Danielle, Kátia e Paola, simplesmente por estarem sempre presentes nos momentos bons e ruins.

À FAPERGS pelo apoio financeiro.

ADAPTAÇÃO DE VETORES PARA USO NO SILENCIAMENTO DE GENES EM ARROZ¹

Autora: Mônica de Medeiros Silva

Orientador: Marcelo Gravina de Moraes

RESUMO

A seqüência genômica proporciona grande riqueza de informações na predição de produtos gênico. Entretanto, somente as seqüências não fornecem informações suficientes sobre a função dos genes no genoma. O seqüenciamento de genoma de plantas modelo favorece o estudo da genômica funcional, fornecendo importantes informações sobre as possíveis participações de genes em processos biológicos. Diversas técnicas têm sido empregadas na análise funcional de genes *in vivo*, sendo o silenciamento gênico pós-transcrição (PTGS) uma destas. O presente trabalho tem como objetivo construir vetores com genes de arroz para otimização da técnica de PTGS. Para as construções, foi utilizado o vetor pLITIMUS 38i, no qual foram clonados os cDNAs de ferritina e de PDS. Os produtos da reação de ligação foram utilizados para transformação de *E. coli* XL1-Blue e HT115 (DE3) eletrocompetentes. Após a confirmação da inserção, foram produzidos dsRNAs *in vivo* e *in vitro*. Além disso, os dsRNAs de PDS produzidos *in vitro* foram utilizados para produção de siRNAs, em uma reação realizada pela RNase III. A produção de dsRNA *in vitro* mostrou-se mais eficiente do que a produção *in vivo*, com rendimentos de aproximadamente 100 µg e 1,7 µg por 10¹⁰ células de *E. coli*, respectivamente. No entanto, a última é mais adequada para análises em larga escala por seu baixo custo. Os vetores construídos nesse trabalho serão utilizados para a determinação de um método de silenciamento que permita a análise funcional de um grande número de genes, de forma rápida e com baixo custo.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 – A cultura de arroz | 1 |
| 1.2 – Genômica | 2 |
| 1.3 – Silenciamento gênico | 4 |
| 1.4 – Silenciamento induzido | 6 |
| 1.5 – Metodologias utilizadas na indução do PTGS | 8 |
| 1.5.1 – Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) | 9 |
| 1.5.2 – Silenciamento gênico induzido por vetor não viral | 10 |
| 1.6 – Genes-alvo no estudo do silenciamento | 11 |
| 2. OBJETIVOS | 13 |
| 2.1 – Objetivo geral | 13 |
| 2.2 – Objetivos específicos | 13 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 15 |
| 3.1 – Material vegetal | 15 |
| 3.2 – Extração de RNA | 15 |
| 3.3 – Amplificação dos cDNAs de ferritina e PDS | 16 |
| 3.4 – Clonagem dos cDNAs | 18 |
| 3.5 – Transformação em <i>Escherichia coli</i> | 19 |
| 3.6 – Seleção de colônias transformadas | 20 |
| 3.7 – Extração de plasmídeos recombinantes | 21 |
| 3.8 – Produção de RNA fita dupla (dsRNA) | 22 |

| | |
|--|----|
| 3.8.1 – <i>In vivo</i> | 22 |
| 3.8.2 – <i>In vitro</i> | 24 |
| 3.9 – Produção de pequenos RNAs de interferência (siRNA) | 25 |
| 4. RESULTADOS | 27 |
| 5. DISCUSSÃO | 31 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 33 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 – A cultura de arroz

O arroz é um dos cereais mais cultivados no mundo, constituindo uma das principais fontes de alimento da população. No Brasil, esta cultura representa cerca de 15 a 20% do volume total de grãos colhidos, sendo que os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina respondem por quase 60% da produção nacional (Carmona et al., 1994).

Um dos maiores obstáculos ao aumento da produtividade na cultura de arroz reside na toxicidade por ferro, caracterizada por retardamento do crescimento e um alto grau de esterilidade, resultando em perdas acima de 88% (Bienfait, 1989). Este problema é comum para o cultivo de arroz no sul do Brasil, onde o solo é rico em ferro e possui baixo pH, o que contribui para o aumento na concentração de Fe (II). Além disso, no sul do Brasil predomina o cultivo de arroz pelo sistema irrigado, que faz com que o Fe (III) seja reduzido, aumentando a concentração de Fe (II), que é muito solúvel e facilmente absorvido pelas plantas (Silva et al., 2003).

As plantas que crescem em solos com altas concentrações de ferro necessitam desenvolver certo grau de tolerância para sobreviver. Isso ocorre, provavelmente, pela existência de moléculas que possam ligar-se aos metais. Uma dessas moléculas é a ferritina, uma proteína que regula a quantidade de ferro livre na célula, uma vez que impede a existência de níveis elevados, ao mesmo tempo em que mantém o ferro

armazenado em seu interior disponível para ser fornecido à célula quando necessário (Beinfait, 1989).

Em estudos recentes com cultivares de arroz (Silva et al., 2003), uma cultivar suscetível e uma cultivar tolerante, BR-IRGA 409 e EPAGRI 108, respectivamente, foram submetidas a altos níveis de ferro (500 mg/L). Após o sexto dia de tratamento, a cultivar BR-IRGA 409 apresentou um significativo aumento de ferro no apoplasto, enquanto que o cultivar EPAGRI 108 não teve os níveis de ferro aumentados. Estes resultados sugerem que a toxidez por ferro está diretamente relacionada com a captura e a acumulação deste metal pela planta. Portanto, o mecanismo de tolerância da cultivar EPAGRI 108 pode ser sua capacidade de capturar menos ferro da solução e impedir o acúmulo de níveis tóxicos para as células.

1.2 – Genômica

O final do século passado foi marcado pelo desenvolvimento de grande número de projetos de seqüenciamento de genomas, incluindo organismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*, e *Homo sapiens* (Tyagi et al., 2004), resultando em vasta quantidade de informações sobre os mesmos. A partir das seqüências de DNA, pode-se clonar e expressar o gene, fazer fusões com o gene codificador da proteína verde fluorescente (GFP) a fim de verificar a localização da proteína no tecido, órgão ou até mesmo na célula do indivíduo em uma tentativa de determinar sua função. Além disso, por meio de técnicas de bioinformática, torna-se possível inferir a função de genes

com base na similaridade entre seqüências de outros organismos depositadas nos bancos de genes (Meagher, 2002).

Além das espécies já citadas, o arroz (*Oryza sativa* L.) também teve seu genoma recentemente seqüenciado (Sasaki et al., 2002; Feng et al., 2002). É importante ressaltar que o arroz é uma das principais fontes de alimento da população brasileira, conferindo à cultura uma grande importância econômica. Além disso, uma grande coleção de cDNAs completos está disponível, fazendo com que muitos esforços sejam realizados para identificar as funções dos genes do arroz (Miki et al., 2005), uma vez que somente a seqüência não fornece informação suficiente para a compreensão de mecanismos biológicos em nível molecular. Portanto, um grande desafio na era pós-genômica é identificar como cada um desses genes atua no crescimento e no desenvolvimento de organismos-modelo, como o arroz (Waterhouse & Helliwell, 2002).

Os estudos de genômica funcional, que visam determinar a função de genes por meio de análises *in vivo* por genética direta e/ou reversa, fornecem importante informação sobre as possíveis participações de genes em processos biológicos. Estes métodos serão responsáveis pela transformação dos dados obtidos a partir do seqüenciamento, em informação para uso no melhoramento genético (Meagher, 2002).

Diversas técnicas têm sido empregadas na análise funcional de genes, sendo que as mais utilizadas são aquelas que suprimem a função do gene de interesse. Uma destas consiste na mutagênese insercional por transposons ou retrotransposons, com a qual se pode relacionar a mutação obtida em um determinado gene a um fenótipo. No entanto, essa técnica não permite o direcionamento da mutação a um determinado

gene, revelando ser um processo longo, trabalhoso (Waterhouse & Helliwell, 2002). Outra técnica que vem sendo utilizada mais recentemente é o silenciamento gênico pós-transcrição (PTGS). Esse método permite o direcionamento da supressão do gene-alvo, sendo uma ferramenta eficiente, rápida e específica na detecção da função gênica (Tyagi et al., 2004).

1.3 – Silenciamento gênico

O silenciamento em nível de RNA tem sido referido como um controle da expressão gênica em plantas, animais e fungos (Voinnet, 2001). Este é um mecanismo que ocorre naturalmente como uma forma de proteger os organismos contra infecções virais e contra a mobilização de elementos genéticos móveis. Além disso, o silenciamento de genes atua no controle dos programas de desenvolvimento de organismos eucarióticos (Agrawal et al., 2003).

O silenciamento foi observado pela primeira vez em plantas, quando Napoli et al. (1990) tentavam superexpressar o gene da chalcona sintase, enzima envolvida na pigmentação em petúnias. No entanto, parte das plantas transformadas apresentaram perda na coloração das flores. Análises do mRNA destas revelaram que o nível de transcritos era baixo, mostrando ter havido perda na atividade tanto do gene endógeno quanto do transgene, motivo pelo qual o fenômeno foi denominado co-supressão (Napoli et al., 1990; Lecellier & Voinnet, 2004). Em 1998, Fire et al. verificaram que a aplicação de RNA fita dupla (dsRNA) era capaz de induzir um mecanismo de

degradação de mRNA altamente específico. Tal processo foi denominado de interferência por RNA (RNAi).

Além de co-supressão e RNAi, outros termos são utilizados para descrever o silenciamento em nível de RNA, incluindo silenciamento gênico pós-transcrição (PTGS, em plantas), “quelling” (fungos) e supressão senso (Baulcombe, 2002). O silenciamento também foi observado em uma variedade de espécies, incluindo plantas, fungos, nematóides, protozoários, insetos (*Drosophila melanogaster*) e vertebrados (Stanislawska & Olszewski, 2005). Estudos genéticos e bioquímicos indicam que os fenômenos observados em diferentes espécies possuem um mecanismo comum e que as enzimas envolvidas nesse processo exibem alta similaridade entre espécies (Stanislawska & Olszewski, 2005). Isso sugere uma origem evolutiva antiga desse fenômeno, a partir de um ancestral comum de fungos, plantas e animais (Mello & Conte Jr., 2004; Novina & Sharp, 2004).

A etapa-chave para a ocorrência de silenciamento é a formação de um dsRNA, o qual pode ser sintetizado intracelularmente a partir de transcritos anormais, ou codificado por RNA viral (Dalmay et al., 2000; Stanislawska & Olszewski, 2005). Esse dsRNA é reconhecido como estranho ao organismo, ativando a enzima Dicer, ou Dicer-like (DCL), em plantas. Essas enzimas são evolutivamente conservadas, sendo encontradas em *C. elegans*, *D. melanogaster*, plantas e mamíferos (Stanislawska & Olszewski, 2005). No entanto, elas podem variar em número. Por exemplo, humanos e *C. elegans* apresentam somente uma Dicer, já *A. thaliana* e arroz possuem quatro Dicer com diferentes funções (Lecellier & Voinnet, 2004; Wang & Metzloff, 2005). A Dicer apresenta cinco domínios: um domínio de helicase, um domínio PAZ

(PIWI/ARGONAUTA/ZWILLE), dois domínios de RNase III e um domínio de ligação a dsRNAs (Lecellier & Voinnet, 2004). Os dsRNAs são processados pela Dicer em pequenas moléculas de RNA de interferência (siRNAs) fita dupla com tamanho variando de 21 a 26 nucleotídeos (Horiguchi, 2004; Miki et al., 2005). Plantas produzem duas classes de siRNAs: curtos, formados por 21 a 23 nucleotídeos, e longos, com 24 a 26 nucleotídeos (Lecellier & Voinnet, 2004; Wang & Metzlaff, 2005). Essas moléculas possuem extremidades 5' fosforiladas e dois nucleotídeos não pareados em suas extremidades 3' (Dykxhoorn et al., 2003; Novina & Sharp, 2004). Segundo Stanislawski & Olszewski (2005), essas características são essenciais para a atividade dos siRNAs, pois foi demonstrado que moléculas que possuem as extremidades cegas se mostram ineficientes nas próximas etapas do processo. Os siRNAs são incorporados em um complexo protéico, o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), o qual deve ser convertido de uma forma latente, contendo um siRNA fita dupla, para uma forma ativa pela separação das fitas do siRNA por uma helicase. A fita antisense permanece ligada ao complexo e tem a função de guiar o RISC no reconhecimento de mRNAs homólogos ao dsRNA que desencadeou todo processo, os quais serão clivados (Stanislawski e Olszewski, 2005).

1.4 – Silenciamento induzido

O conhecimento do mecanismo de silenciamento de mRNA estimulou sua utilização como uma ferramenta na genômica funcional. Sua aplicação tem sido

estudada extensivamente e aprimorada para facilitar a investigação de diferentes fenômenos na biologia vegetal (Baulcombe, 2002; Horiguchi, 2004).

O silenciamento em plantas pode ser induzido de três maneiras. A primeira forma seria pela utilização de vetores que expressam dsRNA com repetições invertidas, formando um RNA em forma de grampo (hpRNA, Vaucheret et al., 2001). Outra maneira consiste na introdução de transgenes com promotores fortes pois, segundo Mello e Conte Jr. (2004), um alto nível de expressão do transgene acarretaria defeitos no processamento do mRNA, como por exemplo, a falta da cauda de poli-A. Além desses métodos clássicos, Tenllado et al. (2003), utilizaram um lisado bruto de bactérias que expressavam dsRNA para induzir o silenciamento em plantas de *Nicotiana benthamiana*, resultados estes que não foram reproduzidos até o momento. Por fim, existe um método de indução de silenciamento que vem sendo utilizado em mamíferos, o qual consiste na aplicação de siRNAs nas espécies estudadas (Elbashir et al., 2001; Dykxhoorn et al., 2003). A utilização desse sistema em células de mamíferos foi importante, pois permitiu prevenir o desencadeamento de uma resposta por interferons, que resulta na degradação não específica de mRNAs e na inibição da tradução (Dykxhoorn et al., 2003).

Em plantas, foi observada a ocorrência de amplificação e deslocamento do sinal de silenciamento (Stanislawska & Olszewski, 2005). Esse processo requer uma RNA Polimerase dependente de RNA (RdRP) responsável pela geração e amplificação de siRNAs em dsRNAs. Os siRNAs são utilizados como oligonucleotídeos iniciadores para geração de novos dsRNAs pela RdRP, os quais podem subseqüentemente servir de alvo para a Dicer e serem processados em novos siRNAs (Novina & Sharp, 2004;

Stanislawska e Olszewski, 2005). Essa amplificação permite que o sinal de silenciamento seja disseminado por outros tecidos das plantas, efeito chamado de supressão sistêmica (Hannon, 2002). A transmissão do sinal pode ocorrer a curtas distâncias (10 a 15 células) através dos plasmodesmos, ou a distâncias maiores pelo sistema vascular (Lecellier & Voinnet, 2004; Stanislawska e Olszewski, 2005). O silenciamento sistêmico está relacionado com o movimento de siRNAs pertencentes à classe de moléculas longas, com 24 a 26 nucleotídeos (Hamilton et al., 2002).

A transmissão sistêmica do silenciamento foi verificada pela localização do PTGS do gene de nitrato redutase que ocorreu em tecidos localizados acima do ponto de introdução do vetor de silenciamento na planta, sugerindo que existe a propagação do sinal de PTGS (Vaucheret et al., 2001). Vaucheret et al. (2001) verificaram que o silenciamento não ocorreu em transgênicos com seqüências não homólogas, indicando que o sinal é transmitido de modo específico. Baulcombe (2002) teve uma conclusão similar com PTGS em plantas transgênicas expressando GFP. Quando as plantas transformadas eram silenciadas por infiltração, o silenciamento era inicialmente localizado, manifestando-se somente em alguns tecidos que perdiam a coloração da proteína GFP, mas, por fim, tornou-se sistêmico, silenciando a proteína por toda a planta.

1.5 – Metodologias utilizadas na indução do PTGS

Os dois sistemas mais utilizados para indução do silenciamento em plantas são o silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) em *N. benthamiana*, e transgenes

codificando hpRNAs em *A. thaliana* (Waterhouse & Helliwell, 2002). Os métodos de transformação geralmente incluem *Agrobacterium tumefaciens* (Voinnet et al., 2000; Liu et al., 2002) e bombardeamento de partículas (Miki & Shimamoto, 2004).

1.5.1- Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS)

Em plantas, o VIGS é desencadeado pela formação de intermediários de dsRNA durante a replicação viral. Diversos estudos vêm sendo realizados com a utilização desse sistema, o qual mostra ser um poderoso método para verificação da função de genes em plantas (Benedito et al., 2004). O VIGS envolve a infecção de uma planta com o vetor viral carregando um fragmento de seqüência do gene do hospedeiro. A planta que sofreu infecção apresenta o gene endógeno silenciado e o papel biológico do mesmo indicado pelo fenótipo produzido. Desta forma, VIGS representa um método rápido para associar funções às seqüências de genes que ainda não foram caracterizados (Waterhouse & Helliwell, 2002).

Segundo Waterhouse & Helliwell (2002) o sistema VIGS é útil em plantas que são difíceis de transformar e também para análises de genes em larga escala, pois vetores virais podem ser aplicados por simples inoculação mecânica nas plantas estudadas. No entanto, o alto custo da transcrição *in vitro* dos vetores pode limitar sua utilização. Esse problema pode ser contornado pela utilização de vetores virais em *A. tumefaciens*, a qual pode ser infiltrada em folhas por injeção (Waterhouse & Helliwell, 2002).

Burton et al. (2000) confirmaram a função de um gene de *N. tabacum* utilizando VIGS. Vários vírus, dentre os quais TMV (Vírus do Mosaico do Tabaco, Kumagai et al., 1995), PVX (Vírus X da Batata, Ruiz et al., 1998; Dalmay et al., 2000) e TGMV (Vírus do Mosaico Dourado do Tomate, Kjemtrup et al., 1998) foram desenvolvidos como vetores VIGS.

O maior obstáculo para a utilização desse método consiste no número limitado de vetores virais disponíveis, devido à necessidade de compatibilidade vírus-hospedeiro (Waterhouse & Helliwell, 2002).

1.5.2 - Silenciamento gênico induzido por vetor não viral

Em 2001, foram desenvolvidos vetores de silenciamento para análises em larga escala visando a supressão estável de função gênica em plantas (Wesley et al. 2001). A supressão transitória foi também demonstrada com sucesso em vários sistemas experimentais em plantas (Johansen & Carrington, 2001).

Modelos iniciais induziam o silenciamento pela transformação de plantas com vetores contendo seqüências de DNA na orientação senso ou antisenso. No entanto, esse tipo de estratégia resulta em baixa freqüência de silenciamento, em relação ao PTGS desencadeado por dsRNA (Fire et al., 1998). Então, têm sido utilizadas construções com seqüências nas orientações senso e antisenso com capacidade de produzir dsRNA, pela formação de transcritos com uma estrutura de RNA na forma de grampo (hpRNA, Waterhouse & Helliwell, 2002). Uma seqüência interveniente de DNA entre as seqüências invertidas complementares não afeta a especificidade do silenciamento e é requerida para facilitar a construção. Sendo que o uso de um *intron*

entre as seqüências tem aumentado a frequência do silenciamento para até 100% (Wesley, 2001; Waterhouse & Helliwell, 2002).

Vetores que codificam hpRNAs podem ser utilizados para transformação estável ou transitória. Miki & Shimamoto (2004) testaram o mesmo vetor em diferentes sistemas em arroz: transformação estável por *A. tumefaciens* e transformação transitória por bombardeamento de partículas, obtendo silenciamento em ambos os casos.

Tenllado et al. (2003) empregaram um sistema de produção de dsRNA *in vivo* pela utilização de uma bactéria capaz de produzir grande quantidade de dsRNA, sem degradá-lo. Os autores promoveram uma interferência específica em infecções virais com o uso de dsRNAs purificados, aplicados por inoculação mecânica e, ainda, pela pulverização de extratos brutos de lisados bacterianos em folhas de *N. benthamiana*. No entanto, esse experimento não foi reproduzido, sendo difícil avaliar seu impacto na genômica funcional.

1.6 – Genes-alvo no estudo do silenciamento

Desde as primeiras observações, o silenciamento envolve genes que promovem modificações fenotípicas capazes de serem facilmente identificadas. Isso ocorreu, por exemplo, no caso do silenciamento da enzima chalcona sintase em petúnias (Napoli et al., 1990).

O gene PDS, o qual codifica a enzima fitoeno desaturase, é ideal para demonstrar a eficiência do silenciamento (Benedito et al., 2004). Essa enzima participa

na via de biossíntese de carotenóides e seu silenciamento leva à redução nos níveis desses pigmentos, resultando na perda da coloração das folhas (Liu et al., 2002; Benedito et al., 2004).

Vetores contendo GFP têm sido usados para demonstrar o silenciamento em plantas transgênicas e, juntamente com a β -Glucuronidase (GUS), são considerados ideais para estudos da supressão desse mecanismo (Benedito et al., 2004). Voinnet et al. (2000) mostraram a ocorrência de silenciamento sistêmico pela supressão da fluorescência verde após a inoculação com vetores virais PVX-GFP.

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Construção de vetores para otimização do processo de silenciamento gênico pós-transcrição (PTGS) em plantas de arroz.

2.2 – Objetivos específicos

a) Construção do vetor de silenciamento com seqüências dos genes de ferritina e de PDS;

Estratégia: Foi utilizado o vetor de clonagem pLITMUS 38i, que possui 2.800 pb, com um gene que confere tolerância ao antibiótico ampicilina como agente seletivo. Este vetor apresenta um sítio de clonagem flanqueado por dois promotores T7 em orientações opostas, possibilitando a formação de dsRNA. Foram clonados neste vetor os fragmentos correspondentes aos cDNAs de ferritina e PDS, previamente obtidos por RT-PCR a partir de mRNA de arroz. A verificação da inserção da seqüência no vetor foi avaliada por PCR.

b) Produção de dsRNA tanto *in vivo* quanto *in vitro*;

Estratégia: Para produção de dsRNA *in vivo* foi utilizada a linhagem de *Escherichia coli* HT115 (DE3), a qual é deficiente na atividade da RNase III, enzima que degrada dsRNA. As bactérias foram transformadas com os plasmídeos recombinantes por eletroporação e, então, induzidas à produção de dsRNA pela adição

de IPTG. Os produtos obtidos foram incubados com RNase A, enzima que degrada RNA fita simples (ssRNA), para confirmar se trataram de dsRNA. Para produção *in vitro*, foi utilizada a enzima RNA Polimerase T7, a qual induz os promotores T7 do vetor pLITMUS 38i. Como citado anteriormente, esses promotores estão em orientações opostas, permitindo a produção de dsRNA.

c) Produção de pequenos RNAs de interferência (siRNA);

Estratégia: Os dsRNA obtidos *in vitro* foram digeridos com RNase III, resultando na formação de moléculas de aproximadamente 21 nucleotídeos, os siRNAs. O tamanho das moléculas foi verificado em gel de poliacrilamida.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Material vegetal

Sementes de *Oryza sativa* das cultivares EPAGRI 108 e BR-IRGA 409 foram cedidas pelo Instituto Rio-grandense do Arroz (IRGA). As mesmas foram cultivadas em câmara de crescimento no escuro sob temperatura controlada de 28°C. Após a germinação, as plântulas formadas foram transferidas para copos de plástico contendo substrato e colocadas em casa de vegetação com fotoperíodo de 12 h. Após 60 dias, as partes aéreas das plantas geradas foram utilizadas para extrações de RNA.

3.2 – Extração de RNA

Folhas das plantas de arroz foram utilizadas para a extração de RNA total, segundo método descrito por Bugos et al. (1995). O tecido foi pulverizado em nitrogênio líquido, transferindo-se para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL aproximadamente 100 mg de material vegetal. Acrescentaram-se 400 µL de tampão de extração de RNA (100 mM de Tris-HCl pH 9,0, 200 mM NaCl, 15 mM EDTA, 0,5% SDS), adicionado de 2,3 µL de 2-mercaptoetanol, 400 µL de fenol e 80 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v:v). Após homogeneização por vigorosa agitação, foram acrescentados 28 µL de acetato de sódio 3 M (pH 5,2), seguindo-se incubação no gelo por 15 min. Em seguida, o material foi centrifugado a 16000 x g durante 10 min (4°C). A fase superior foi utilizada para extração com 400 µL de fenol

e 80 μL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v:v). O material foi agitado vigorosamente por 2 min e centrifugado a 16000 x g por 5 min (4°C). A fase superior foi separada e os ácidos nucleicos foram precipitados utilizando isopropanol (1:1, v:v) durante 1 h a -20°C e em seguida centrifugados a 10000 x g por 10 min a 4°C. A fase superior foi descartada e o precipitado foi lavado com 500 μL de etanol 70%, seguido de centrifugação a 10000 x g por 5 min a 4°C. O precipitado foi ressuspensão em água ultra pura e centrifugado a 10000 x g por 5 min a 4°C, com transferência da fase superior para novo tubo. A precipitação seletiva de RNA foi realizada utilizando 37,5 μL de cloreto de lítio 8 M a 4°C por 12 h, seguida de centrifugação a 10000 x g por 10 min (4°C). O material precipitado foi lavado com 500 μL de etanol 70%, e ressuspensão em água ultra pura. A concentração das amostras foi estimada por leitura em espectrofotômetro (Smart SpecTM Bio-Rad) a 260 nm. O material foi verificado em gel de agarose 1% e armazenado a -20°C.

3.3 – Amplificação dos cDNAs de Ferritina e PDS

O RNA total de plantas de arroz foi submetido à técnica de transcrição reversa acoplada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores Ferr-F (5' – ATG CTA TGG AGT TGG CCT TG – 3') e Ferr-R (5 – TGG ATG GAA GAA ACG AAA CC – 3') , para ferritina, e PDS-F (TGC AAT GGA AGG AAC ACT CC – 3') e PDS-R (5' – ACA TAA GCT TGG CCA CCA AC – 3') para fitoeno desaturase (PDS). Os mesmos foram sintetizados a

partir das seqüências de arroz depositadas no GenBank (XM_470568, PDS e AF519571 e AF519570, ferritina).

Primeiramente, foi realizado um processo de transcrição reversa (RT) na reação composta de 500 ng de RNA total de arroz, 320 μ M de cada dNTP, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 3 mM de $MgCl_2$, 6,6 mM ditioneitol (DTT), 1,32 μ M de oligonucleotídeo iniciador antisense (FER-R ou PDS-R) e 6,4 U de enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen), sendo incubada a 37°C por 1 h. Seguindo o procedimento, foi realizada a PCR (25 μ L), no termociclador PTC-100™ (MJ Research), contendo a reação de RT (5 μ L), 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 25 mM KCl, 2 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen), 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen). As condições da PCR para amplificação de ferritina foram: desnaturação inicial a 94°C (3 min), seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C (30 s), anelamento a 60°C (30 seg) e extensão a 72°C (2 min), e uma etapa final de extensão 72°C (5 min). A PCR para amplificação de PDS foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C (10 min), seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C (1 min), anelamento a 50°C (1 min) e extensão a 72°C (1 min), e uma etapa final de extensão a 72°C (10 min).

Os produtos da reação foram visualizados pela separação por eletroforese em gel de agarose 2% contendo tampão TBE 1x (45 mM Tris-HCl, pH 8,3; 45 mM de ácido bórico; 1 mM de EDTA), seguida da coloração em brometo de etídio (0,5 μ g/mL). Um padrão de DNA (1kb DNA Ladder Invitrogen) foi incluído em cada gel. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de

3.4 – Clonagem dos cDNAs

Os produtos das RT-PCR utilizados na clonagem foram previamente tratados com a enzima Klenow (Large Fragment of DNA polymerase I, Promega) na reação (30 μ L) composta de 200 ng de cDNA, tampão React 2 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl), 0,02 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen) e 0,5 U de enzima Klenow, sendo incubada por 20 min no gelo. O produto da reação foi purificado pela adição de 10% de acetato de amônio 7,5 M e 2,5x o volume de etanol 100%. O material foi homogeneizado e precipitado a $-20^\circ C$ por 1 h, seguido de centrifugação a 16000 x g por 20 min ($4^\circ C$). A fase superior foi descartada e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, sendo centrifugado a 16000 x g por 5 min e ressuspensão em água ultra pura. A concentração dos cDNAs foi estimada por visualização em gel de agarose 2% (TBE 1x) com a utilização de marcador de massa molecular λ *Hind* III (Promega).

Os cDNAs foram inseridos no vetor de clonagem pLITMUS 38i (Biolabs), o qual foi digerido em uma reação com volume final de 15 μ L contendo 15 μ g do vetor, tampão D (6 mM Tris-HCl, pH 7,9, 0,15 M NaCl, 6 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT) e 15 U de *Eco* RV, sendo incubada por 2 h a $37^\circ C$. Logo após o vetor foi desfosforilado pela adição na reação de digestão de 0,12 U da enzima fosfatase alcalina (Promega) e tampão de reação 1x (5 mM Tris-HCl, pH 9,3, 0,1 mM $MgCl_2$, 0,01 mM $ZnCl_2$, 0,1 mM espermidina). A reação foi incubada por 15 min a $37^\circ C$, seguida de 15 min a $56^\circ C$, processo que foi repetido após nova adição de 0,12 U de enzima fosfatase alcalina. O vetor foi, então, purificado como descrito anteriormente. A concentração

de vetor foi determinada por visualização em gel de agarose 2% (TBE 1x) com a utilização de marcador de massa molecular λ Hind III (Promega).

A reação de ligação (20 μ L) foi composta de 30 ng, para ferritina, ou 50 ng, para PDS, da mistura das reações de PCR purificadas, 100 ng do vetor pLITMUS 38i, 1 U de T4 DNA ligase e tampão de ligação 1x (25 mM de Tris-HCl, pH 7,6, 5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM DTT, 0,5 mM ATP, 25% polietileoglicol, MW 8000) e incubada durante aproximadamente 18 h a 14°C.

3.5 – Transformação em *Escherichia coli*

Células eletrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue e HT115 (DE3) foram preparadas segundo manual Micro PulserTM (Bio-Rad), conforme instruções do fabricante. As reações de ligação (100 ng) foram misturadas com 40 μ L de células eletrocompetentes e transformadas por eletroporação (Micro PulserTM Bio-Rad). Em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio líquido Luria-Bertani (LB – 1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl, pH 7,5) e mantidas a 37°C a 250 rpm. Após 1 h, 200 μ L de células bacterianas foram plaqueadas em meio LB acrescido de ampicilina (50 μ g/mL) e tetraciclina (12,5 μ g/mL), além de 1,6 mg de X-Gal e 0,8 mg de isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para células de *E. coli* XL1-Blue.

3.6 – Seleção de colônias transformadas

A seleção das colônias de *E. coli* XL1-Blue contendo plasmídeo recombinante (colônias positivas) foi realizada pelo sistema de coloração de colônias brancas/azuis. As colônias positivas são aquelas em que o produto de interesse foi inserido no plasmídeo causando ruptura da seqüência codificante da β -galactosidase, enzima que degrada o substrato X-Gal produzindo uma coloração azul na colônia. Assim, as colônias que tiveram a ruptura dessa seqüência ficam brancas. Estas, além de algumas colônias de HT115 (DE3), foram repicadas para placas contendo meio LB acrescido de ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e tetraciclina (12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para a confirmação da clonagem e obtenção de maior quantidade de material bacteriano. As colônias obtidas foram submetidas à PCR com oligonucleotídeos PUC/M13 FOR (5'– CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3') e REV (5'–TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C–3') para confirmação final da clonagem dos fragmentos de cDNA. Foi realizada a PCR (25 μL) contendo 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Invitrogen), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 25 mM KCl, 2,0 mM MgCl_2 , 0,4 μM de cada oligonucleotídeo PUC/M13 FOR e REV e parte de cada colônia de bactéria transformada, coletadas com a utilização de ponteiras. A PCR foi realizada no termociclador PTC-100™ (MJ Research), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 10 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 50°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos da reação foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose 2% contendo tampão TBE 1x, seguida da coloração em

brometo de etídio (0,5 µg/mL). Um padrão de DNA (1kb DNA Ladder Invitrogen) foi incluído em cada gel. O gel foi fotografado pelo sistema de fotodocumentação computadorizado EDAS 120 (Kodak Sciences 2d).

3.7 – Extração de plasmídeos recombinantes

A extração de plasmídeos foi baseada na técnica descrita por Brasileiro & Carneiro (1998). Três colônias foram transferidas para 3 mL de meio LB líquido com adição de ampicilina (50 µg/mL) e tetraciclina (12,5 µg/mL) sob agitação (250 rpm) em torno de 16 h a 37°C. As células foram coletadas por centrifugação a 4000 x g durante 5 min. Em seguida, foram ressuspensas em 200 µL de solução P1 (RNase 100 µg/mL; Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM), seguida de adição de 200 µL da solução P2 (NaOH 200 mM; SDS 1%), vertendo o tubo para completa homogeneização e observando a formação de uma solução viscosa indicando lise celular. Após, foi adicionado 200 µL da solução P3 (Acetato de Potássio 3 M, pH 5,5), vertendo o tubo para a homogeneização, seguida de centrifugação a 16000 x g por 10 min. A fase superior foi transferida para novo tubo e foram realizadas duas extrações pela adição de igual volume (aproximadamente 500 µL) de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v:v) e agitação, seguida de centrifugação 16000 x g por 2 min. Para a precipitação do material, utilizou-se igual volume de isopropanol (aproximadamente 500 µL) e 10% de acetato de sódio 3 M, pH 5,2, durante 2 h a -20°C e centrifugação a 16000 x g durante 15 min. O precipitado obtido foi lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugado a 16000 x g por 5 min e ressuspensso em 30 µL de água ultra pura. A

estimativa da concentração do material foi realizada em espectrofotômetro (Smart Spec™ Bio-Rad) a 260 nm.

3.8 – Produção de RNA fita dupla (dsRNA)

3.8.1 – *In vivo*

A produção de dsRNA foi realizada segundo método descrito por Tenllado et al. (2003). Inicialmente, plasmídeos recombinantes foram extraídos de *E. coli* XL1-Blue, como descrito anteriormente, e utilizados para transformação em células eletrocompetentes de *E. coli* HT115 (DE3). Uma colônia de *E. coli* HT115 (DE3) contendo plasmídeo recombinante foi adicionada a 2 mL de meio líquido LB acrescido de ampicilina (50 µg/mL) e tetraciclina (12,5 µg/mL) sob agitação (250 rpm) a 37°C. Após aproximadamente 16 h, 500 µL do crescimento bacteriano foram adicionados a 25 mL de meio líquido LB, com os antibióticos citados anteriormente, sob agitação (250 rpm) a 37°C, até atingir leitura de $OD_{600} = 0,4$. Seguindo o procedimento, as bactérias foram induzidas à produção de dsRNA pela adição de 0,4 mM de IPTG e incubadas a 37°C sob agitação (250 rpm) por 3 h.

Após indução à produção de dsRNA, foi realizada uma extração de ácidos nucléicos totais das bactérias, conforme descrito por Timmons et al. (2001). As células foram coletadas por centrifugação a 1500 x g por 10 min e ressuspensas em 800 µL de solução de extração (acetato de amônio 1 M, EDTA 10 mM) e igual volume de fenol: clorofórmio (1:1; v:v) a 65°C, seguido de vigorosa agitação por 1 min. O material foi

transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e centrifugado a 18000 x g por 10 min (4°C). A fase superior foi transferida para novo tubo, adicionando-se 2,5x o volume de etanol absoluto para precipitação do material durante 1 h a - 70°C, seguida de centrifugação a 16000 x g por 20 min (4°C). A fase superior foi descartada e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%. Foi realizada nova centrifugação a 16000 x g por 5 min (4°C), e o material foi ressuspensão em solução de eluição (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM). O material foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1% contendo tampão TBE 1x, seguida da coloração em brometo de etídio (0,5 µg/mL). Um padrão de DNA (1kb DNA Ladder Invitrogen) foi incluído em cada gel. Os géis foram fotografados pelo sistema de fotodocumentação computadorizado EDAS 120 (Kodak Sciences 2d).

A natureza fita dupla do material foi confirmada pela incubação com RNase A, a qual degrada RNA fita simples (ssRNA). A reação (10 µL) foi composta de 36 ng de RNA, 0,1 µg de enzima RNase A e 1 µL de acetato de amônio 7,5 M, com incubação a 37°C por 1 h. Os produtos da reação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% contendo tampão TBE 1x, seguida da coloração em brometo de etídio (0,5 µg/mL). Um padrão de DNA (1kb DNA Ladder Invitrogen) foi incluído em cada gel. Os géis foram fotografados pelo sistema de fotodocumentação computadorizado EDAS 120 (Kodak Sciences 2d).

3.8.2 – *In vitro*

A produção de dsRNA *in vitro* foi realizada pelo kit Hi Scribe™ RNAi Transcription (Bio Labs), conforme instruções do fabricante. A partir de produtos de PCR com oligonucleotídeos PUC/M13, os quais incluem os promotores T7, foi realizada a reação para produção de dsRNA *in vitro*. A reação foi realizada em volume final de 100 µL, contendo 0,5 µg de cDNA, 120 U de enzima RNA Polimerase T7, tampão de reação 1x (4 mM Tris-HCl, 0,6 mM MgCl₂, 0,2 mM espermidina, 1 mM DTT, pH 7,9), 0,4 mM de cada NTP (ATP, UTP, CTP, GTP) (Invitrogen), seguida de incubação a 37°C por 3 h.

Além disso, foi realizada a produção de ssRNA, o qual foi utilizado como controle. Para isso, plasmídeos recombinantes foram amplificados com oligonucleotídeos PUC/M13 e, então, digeridos de modo que somente um dos promotores T7 podia gerar produtos. A reação (30 µL) de digestão foi composta por 700 ng de plasmídeo recombinante, tampão D 1x (6 mM Tris-HCl, pH 7,9, 0,15 M NaCl, 6 mM MgCl₂, 1 mM DTT), 30 U de enzima Sal I (Promega), seguida de incubação a 37°C por 2 h, e a 60°C por 15 min para inativação da enzima. O ssRNA foi produzido nas mesmas condições de reação de dsRNA descritas anteriormente.

Os produtos das reações de dsRNA e ssRNA foram verificados por eletroforese em gel de agarose 2% contendo tampão TBE 1x, seguida da coloração em brometo de etídio (0,5 µg/mL). Um padrão de dsRNA (Invitrogen) foi incluído em cada gel. Os géis foram fotografados pelo sistema de fotodocumentação computadorizado EDAS 120 (Kodak Sciences 2d).

3.9 – Produção de pequenos RNAs de interferência (siRNA)

O dsRNA produzido *in vitro* foi purificado conforme manual da enzima RNase III (Short Cut™ RNAi Kit, Biolabs). À reação de 100 µL, foi acrescentado 100 µL de água ultra pura, 100 µL de fenol equilibrado e 100 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1; v:v). Foi realizada vigorosa agitação por 1 min, seguida de centrifugação a 16000 x g por 10 min. A fase superior foi transferida para novo tubo, adicionando-se 2x o volume da reação inicial de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1; v:v), seguido de vigorosa agitação por 1 min e centrifugação a 16000 x g por 10 min. A fase superior foi transferida para novo tubo, acrescentando-se 10% de acetato de amônio 7,5 M e 2,5x o volume de etanol 70%. Após homogeneização, o material foi precipitado por 2 h a – 20°C. Seguindo o procedimento, foi realizada centrifugação a 16000 x g por 20 min. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, invertendo o tubo várias vezes, e ressuspensão em 30 µL de água ultra pura.

A reação de digestão do dsRNA foi realizada conforme o kit Short Cut™ RNAi (Biolabs), seguindo instruções do fabricante. A reação (100 µL) foi composta de 0,5 µg de dsRNA purificado, tampão de reação (5 mM Tris-HCl, 0,1 mM DTT, pH 7,5), 20 mM MnCl₂ e 1,3 U de enzima RNase III, seguida de incubação a 37°C por 20 min. Após esse período, 25 mM EDTA foram adicionados para parar a reação.

Seguindo o procedimento, a reação foi purificada pela adição de 10% de acetato de sódio (3 M, pH 5,2), 20 µg de glicogênio e 3x o volume de etanol 95%. O material foi homogeneizado e precipitado a – 20°C por 2 h. Em seguida, foi realizada centrifugação a 18000 x g por 15 min (4°C). A fase superior foi descartada e o

precipitado foi lavado com 600 μL de etanol 80%, deixando o material por 10 min em temperatura ambiente. Após, foi realizada nova centrifugação a 18000 x g por 5 min. A fase superior foi descartada e o precipitado foi ressuspenso em 30 μL de água ultra pura. Os produtos da reação foram visualizados em gel não-desnaturante de poliacrilamida 20% contendo tampão TBE 1x, seguida da coloração em brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O gel foi fotografado pelo sistema de fotodocumentação computadorizado EDAS 120 (Kodak Sciences 2d).

4. RESULTADOS

A partir de seqüências depositadas em banco de genes, sintetizou-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para os cDNAs dos genes de ferritina e PDS. A RT-PCR gerou produtos únicos de 290 pb para ferritina (Fig. 1a) e de 220 pb para PDS (Fig. 1b), conforme o esperado.

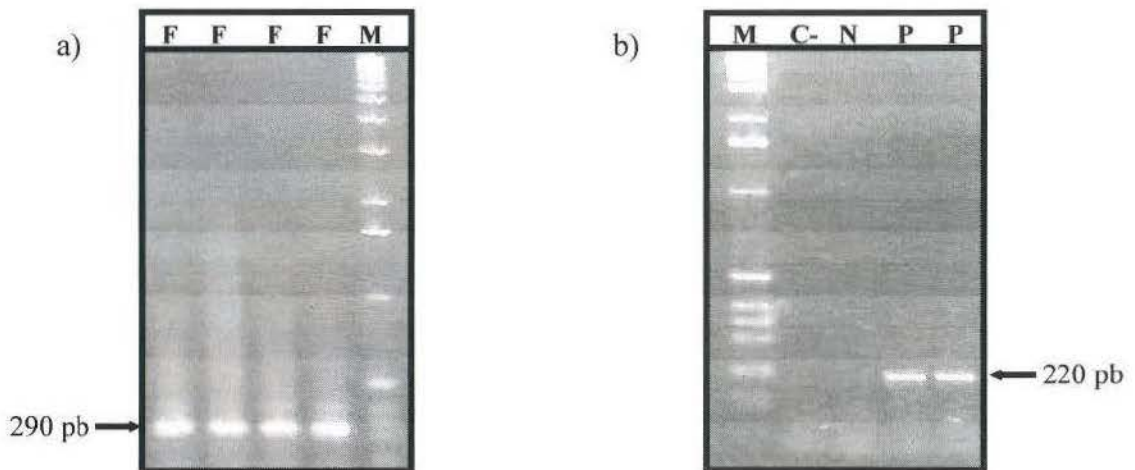


Fig. 1 – Produtos da amplificação do mRNA de *Oryza sativa*. Géis de agarose demonstrando padrões de amplificação do mRNA de *Oryza sativa* separados por eletroforese. **a)** Produtos da reação de RT-PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores Ferr-F e Ferr-R. **b)** Produtos da reação de RT-PCR, com oligonucleotídeos iniciadores PDS-F e PDS-R. **F** – Ferritina; **P** – PDS; **M** – Marcador de peso molecular; **C-** – Controle negativo; **N** – Reação negativa.

Após reação de polimento das extremidades com a enzima DNA polimerase Klenow, os fragmentos foram purificados por precipitação, e ligados no vetor pLITMUS 38i, previamente digerido e desfosforilado. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram projetados para amplificar, além das seqüências de ferritina e PDS, parte da seqüência do vetor, resultando em fragmentos de 560 pb para ferritina e de 490 pb para PDS (Fig. 2).

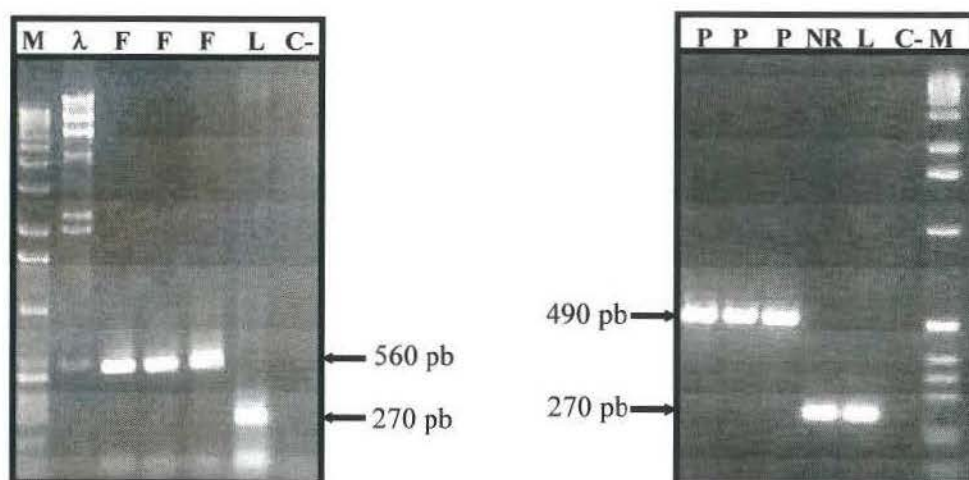


Fig. 2 – Produtos da amplificação de colônias transformadas. Produtos da PCR de colônias de *E. coli* HT115 (DE3) transformadas com Ferritina e PDS, utilizando oligonucleotídeos iniciadores PUC/M13 FOR e PUC/M13 REV. **F** – Ferritina; **P** – PDS; **L** – Plasmídeo sem inserto; **NR** – Colônia com plasmídeo não recombinante; **C-** – Controle negativo; **M** – Marcador de peso molecular; **λ** - Marcador de peso molecular.

O vetor pLITMUS 38i possui dois promotores T7 em orientações opostas, possibilitando a formação de dsRNA. A produção de dsRNA *in vivo* resultou em um rendimento de 1,7 µg de dsRNA por 10^{10} células de *E. coli*, no caso de ferritina. Os ácidos nucleicos extraídos das bactérias após a indução da produção de dsRNA, foram separados em gel de agarose (Fig. 3), sendo possível a visualização de um fragmento presente em todas as outras amostras, exceto nas 2 amostras extraídas de bactérias que foram transformadas com plasmídeos sem inserto. Para confirmar que esse fragmento realmente se tratava de dsRNA, algumas amostras foram incubadas com RNase A (Fig. 4), a fim de degradar qualquer ssRNA presente nas amostras. Após esse tratamento, somente o fragmento diferencial, de aproximadamente 500 pb se manteve, confirmando se tratar de dsRNA.



Fig. 3 – Extração de RNA de *E. coli* HT115 (DE3) induzidas à produção de dsRNA de ferritina. RNA de *E. coli* HT115 (DE3) separado por eletroforese em gel de agarose 1%. 1 e 2 – RNA de bactérias contendo plasmídeo sem inserto; 3-12 – RNA de bactérias contendo plasmídeo recombinante para ferritina; M – Marcador de peso molecular.

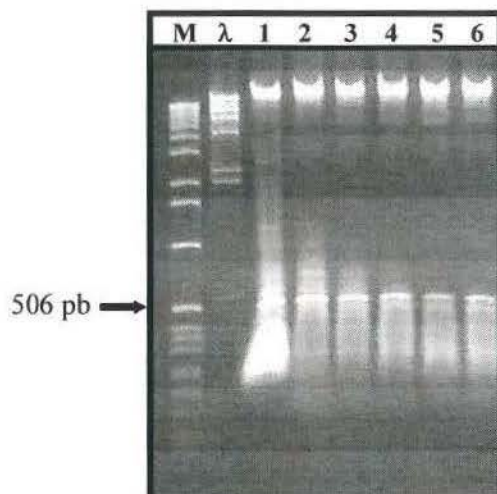


Fig. 4 – dsRNAs de ferritina *in vivo* incubados com RNase A. RNA total de *E. coli* HT115 (DE3) induzidas à produção de dsRNA de ferritina, incubado com 0,1μg de RNase A. M – Marcador de peso molecular; λ - Marcador de peso molecular; 1-6 – dsRNAs de ferritina incubados com RNase A.

Na produção de dsRNA *in vitro* pela RNA Polimerase T7 (Fig. 5), obteve-se um rendimento de 94 μg de dsRNA de ferritina e 98 μg de dsRNA de PDS, a partir de 0,5 μg de cDNA utilizado em cada reação. A transcrição *in vitro* resultou em dois fragmentos para o dsRNA, sendo que o de menor tamanho corresponde ao ssRNA.

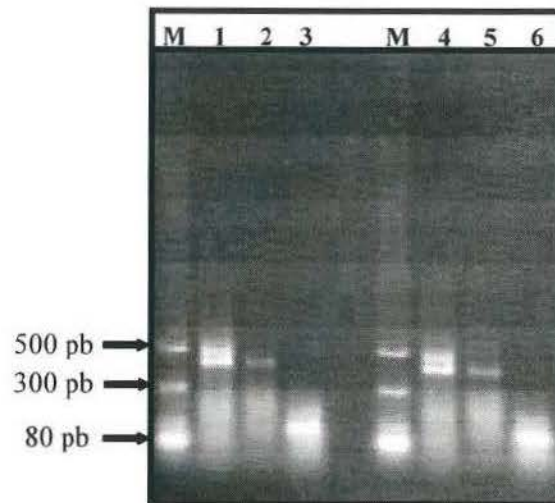


Fig. 5 – dsRNA *in vitro*. dsRNA de ferritina e PDS produzido *in vitro* pela enzima RNA Polimerase T7. **1** – dsRNA de ferritina; **2** – ssRNA de ferritina; **3 e 6** – Plasmídeo sem inserto; **4** – dsRNA de PDS; **5** – ssRNA de PDS; **M** – Marcador de peso molecular de dsRNA.

Os dsRNAs de PDS produzidos *in vitro* foram utilizados na produção de siRNAs. Após a reação de digestão com a enzima RNase III, a formação de pequenas moléculas foi verificada em gel de poliacrilamida (Fig. 6), possibilitando a visualização de fragmentos de aproximadamente 21 pb.

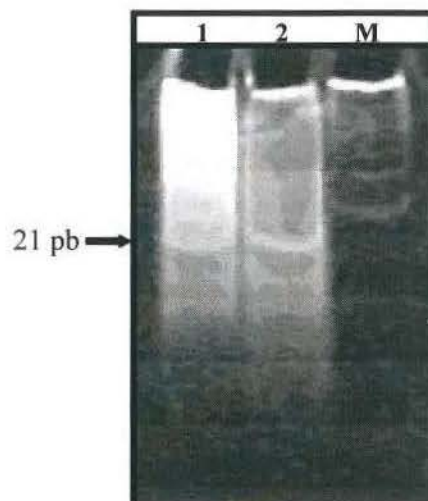


Fig 6 – Produtos da digestão do dsRNA de PDS com RNase III. **1 e 2** – siRNA de PDS; **M** – Marcador de peso molecular.

5. DISCUSSÃO

A maior parte dos trabalhos com silenciamento envolve a utilização de vetores virais ou de vetores que codificam hpRNAs (Waterhouse & Helliwell, 2002). Muitas vezes, a utilização desses vetores requer o uso de métodos de transformação por *A. tumefaciens* ou bombardeamento de partículas (Miki & Shimamoto, 2004). Esses podem ser processos demorados e de baixa eficiência, pois seus protocolos incluem longos períodos em cultura e regeneração de tecidos.

Um método alternativo consiste na inoculação mecânica de dsRNAs, pelo uso de abrasivos que causam ferimentos superficiais nas folhas. Sua utilização foi relatada na aplicação de dsRNAs derivados de seqüências virais em *N. benthamiana* (Ruiz et al., 1998; Tenllado e Días-Ruiz, 2001), constituindo-se em um método simples, rápido e de baixo custo. Tenllado et al. (2003) utilizaram um método no qual bactérias que expressavam dsRNAs foram lisadas com prensa francesa e o extrato bacteriano bruto foi pulverizado sobre plantas de *N. benthamiana*, desta maneira obtendo sucesso no silenciamento.

Para uma análise funcional rápida e em larga escala, adaptamos vetores que possibilitam a produção de dsRNA, tendo como base o trabalho desenvolvido por Tenllado et al., em 2003. No presente trabalho, dois métodos de produção de dsRNA foram avaliados: a produção pelo uso de uma cultura de bactérias (*in vivo*) e a produção por meio de síntese pela RNA polimerase T7 (*in vitro*). As vantagens da produção *in vitro* são o maior rendimento, simplicidade da reação e rapidez do processo. No entanto, o alto custo de produção inviabiliza sua utilização para análises

em larga escala (Tenllado et al., 2003). Esse obstáculo pode ser contornado através da utilização de uma bactéria, *E. coli* HT115 (DE3), que não degrada dsRNA, permitindo a produção de grande quantidade dessas moléculas. Timmons et al. (2001) testaram diferentes linhagens de *E. coli* na produção de dsRNA. Enquanto outras bactérias produziam quantidades variáveis de dsRNAs de baixo peso molecular, *E. coli* HT115 (DE3) foi capaz de acumular dsRNAs longos (Timmons et al., 2001). Isso é devido à deficiência dessa linhagem na atividade da RNase III, uma enzima que degrada dsRNAs (Tenllado et al., 2003).

Recentemente, diversos grupos têm utilizado RNase III de *E. coli* ou uma Dicer recombinante humana para clivar dsRNAs transcritos *in vitro* em siRNAs, promovendo a formação de moléculas com múltiplas especificidades ao gene-alvo (Dykxhoorn et al., 2003). O método de inoculação de siRNAs tem sido muito utilizado em células de mamíferos, devido aos problemas que podem ser desencadeados pela utilização de moléculas com mais de 30 nucleotídeos (Dykxhoorn et al., 2003).

Tanto o método de aplicação direta de dsRNAs utilizado por Tenllado et al., em 2003, quanto o método de inoculação de siRNAs, mostram-se muito promissores para estudos da função gênica. Entretanto, em ambos os casos não foram encontrados relatos de sua utilização em plantas de arroz. Sendo assim, torna-se necessária uma avaliação do potencial do uso desses métodos nessa cultura.

Portanto, os vetores construídos nesse trabalho serão utilizados para a determinação de um método de silenciamento que permita a análise funcional de um grande número de genes, de forma rápida e com baixo custo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, N. et al. RNA interference: Biology, mechanism and applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.67, n.4, p.657-685, 2003.

BAULCOMBE, D. RNA silencing. **Current Biology**, Cambridge, v.12, n.3, p.R82-R84, 2002.

BENEDITO, V.A. et al. The potencial of virus-induced gene silencing for speeding up functional characterization of plant genes. **Genetics and Molecular Research**, Brasil, v.3, p.323-341, 2004.

BEINFAIT, H.F. Prevention of stress in iron metabolism of plants. **Acta Bot. Neerl**, v.38, p.105-129, 1989.

BRASILEIRO, A.C.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de Transformação genética de plantas**. Brasília. Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998.

BURTON, R.A et al. Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene. **Plant Cell**, v.12, p.691-706, 2000.

BUGOS, R.C. et al. RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine. **BioTechniques**, v.19, p. 734-737, 1995.

CARMONA, P.S.; TERRES, A.L.; SCHIOCCHET, M. Avaliação crítica dos projetos do PNP-Arroz na área de melhoramento genético, no período de 1980 a 1990: Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. **A pesquisa de arroz no Brasil nos anos 80: avaliação crítica dos principais resultados**. EMBRAPA-CNPAP. Goiânia, p.269-275, 1994.

DALMAY, T. et al. Potato Virus X amplicons in Arabidopsis mediate genetic and epigenetic gene silencing. **The Plant Cell**, Rockville, v.12, p.369-379, 2000.

DYKXHOORN, D.M., NOVINA, C.D. & SHARP, P.A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, Londres, v.4, p.457-467, 2003.

ELBASHIR, S.M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, Londres, v.411, p. 494-498, 2001.

FENG, Q et al. Sequence and analysis of rice chromosome 4. **Nature**, v.420, p.316-320, 2002.

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

HAMILTON, A.J. et al. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. **EMBO Journal**, Oxford, v.21, p.4671-4679, 2002.

HANNON, G.J. RNA interference. **Nature**, Londres, v.418, p.244-251, 2002.

HORIGUCHI, G. RNA silencing in plants: a shortcut to functional analysis. **Differentiation**, Londres, v.72, p.65-73, 2004.

JOHANSEN, L.K. & CARRINGTON, J.C. Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. **Plant Physiology**, Lancaster, v.126, p.930-938, 2001.

KJEMTRUP, S. et al. Gene silencing from plant DNA carried by geminivirus. **The Plant Journal**, Oxford, v.14, p.91-100, 1998.

KUMAGAI, M.H. et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v.92 p.1679-1683, 1995.

LECELLIER, C.H. & VOINET, O. RNA silencing: no mercy for viruses? **Immunological Reviews**, Copenhagen, v.198, p.285-303, 2004.

LIU, Y.; SCHIFF, M. & DINESH-KUMAR, S.P. Virus-induced gene silencing in tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v.31, p.777-786, 2002.

MEAGHER, R. Post-genomics networking of biotechnology for interpreting gene function. **Current Opinion in Plant Biology**, Londres, v.5, p.135-140, 2002.

MELLO, C.C. & CONTE JR, D. Revealing the world of RNA interference. **Nature**, Londres, v.431, p.338-342, 2004.

MIKI, D. & SHIMAMOTO, K. Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v.45, p.490-495, 2004.

MIKI, D.; ITOH, R. & SHIMAMOTO, K. RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. **Plant Physiology**, Lancaster, v.138, p.1903-1913, 2005.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C. & JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. **The Plant Cell**, Rockville, v.2, p.279-289, 1990.

NOVINA, C.D. & SHARP, P.A. The RNAi revolution. **Nature**, Londres, v.430, p.161-164, 2004.

RUIZ, M.T.; VOINNET, O. & BAULCOMBE, D.C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. **The Plant Cell**, Rockville, v.10, p.937-946, 1998.

SASAKI, T et al. The genome sequence end structure of rice chromosome 1. **Nature**, v. 420 p. 312-316, 2002.

SILVA, M.M. et al. Method development for the determination of iron in milligram amounts of rice plants (*Oryza sativa* L.) from cultivation experiments using furnace atomic absorption spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, 2003.

STANISLAWSKA, J. & OLSZEWSKI, W.L. RNA interference – significance and applications. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, Warszawa, v.53, p.39-46, 2005.

TENLLADO, F. & DÍAZ-RUIZ, J.R. Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. **Journal of Virology**, Baltimore, v.75, p.12288–12297, 2001.

TENLLADO, F. et al. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. **BMC Biotechnology** (electronic resource), Londres, 2003.

TIMMONS, L., COURT, D.L. & FIRE, A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. **Gene**, Amsterdam, v.263, p.103-112, 2001.

TYAGI, A.K. et al. Structural and functional analysis of rice genome. **Journal of Genetics**, Londres, v.83, n.1, p.79-99, 2004.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN C. & FAGARD, M. Post transcriptional gene silencing in plants. **Journal of Cell Science**, Londres, v.114, p.3083-3091, 2001.

VOINNET, O.; LEDERER, C. & BAULCOMBE, D.C. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. **Cell**, Cambridge, v.103, p.157-167, 2000.

VOINNET, O. RNA silencing as a plant immune system against viruses. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v.17, n.8, p.449-459, 2001.

WANG, M.B. & METZLAFF, M. RNA silencing and antiviral defense in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, Londres, v.8, p.216-222, 2005.

WATERHOUSE, P.M. & HELLIWELL, C.A. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. **Nature Reviews Genetics**, Londres, v.4, p.29-38, 2002.

WESLEY, S.V. et al. Construct design for efficient, effective and highthroughput gene silencing in plants. **The Plant Journal**, Oxford, v.27, p.581-590, 2001.