

CONAMA 2024

CONGRESO NACIONAL DEL MEDIO AMBIENTE

SUPERA: Optimización de un protocolo de producción de ARNds para biopesticidas basados en ARNi



CONAMA 2024

TÍTULO

Autor Principal: Jose María Sanz (Fundación CARTIF)

Otros autores: Silvia Gómez (Fundación CARTIF), Bárbara Díez (Fundación CARTIF), Raúl Sánchez (Fundación CARTIF)

ÍNDICE

1. Título
2. Resumen
3. Introducción
4. Resultados
5. Conclusiones
6. Bibliografía

1. TÍTULO

SUPERA. Optimización de un protocolo de producción de ARNs para la obtención de biopesticidas basados en ARNi

2. RESUMEN

Los hongos y los oomicetos son los dos grupos más importantes de patógenos vegetales eucariotas. Actualmente, los métodos existentes para la gestión de las enfermedades causadas por estos patógenos suelen ser limitados, caros y con el tiempo pueden hacer que el patógeno tolere el método de control. Además, la aplicación de fungicidas químicos puede tener un impacto negativo en los ecosistemas. De hecho, el uso de productos químicos en los bosques europeos está extremadamente limitado debido a la normativa legal vinculante y a las condiciones específicas relativas a la aplicación de productos fitosanitarios (Okorski *et al.*, 2015).

Por lo tanto, la búsqueda de productos respetuosos con el medio ambiente para la gestión de las enfermedades de las plantas es una prioridad en todo el mundo, y el ARN de interferencia ambiental (ARNi) ofrece una solución prometedora (Niu *et al.*, 2021). La tecnología del ARNi, con su especificidad sin precedentes como objetivo de las plagas y su bajo impacto medioambiental, está evolucionando rápidamente como una prometedora alternativa segura a los pesticidas inorgánicos tóxicos (Taning *et al.*, 2020). Para ello, el procedimiento más directo de aplicación sobre el terreno consiste en la pulverización directa de ARNs "desnudo" o encapsulado sobre las plantas huésped. Sin embargo, el coste de producción del ARN representa un reto importante para el despliegue de la tecnología de pulverización de ARNs. De forma general, los métodos de producción de ARNs se basan en tres estrategias como son la transcripción *in vitro*, la síntesis química y la fermentación microbiana (Ray *et al.*, 2022). De estas tres aproximaciones, la fermentación microbiana se espera que se convierta en la alternativa más disponible y rentable para la producción a gran escala de dsARN en el laboratorio, con un coste objetivo cercano a los 4 USD por 1 g de ARNs (Zotti *et al.*, 2018). Sin embargo, aún está lejos de conseguirlo.

En CARTIF desarrollamos y probamos diferentes estrategias de fermentación microbiana diseñadas para el crecimiento bacteriano y la expresión de ARNs. Demostramos que la estrategia de fermentación optimizada producía un aumento del rendimiento en términos de peso celular seco (DCW) de hasta 3 veces en comparación con la estrategia de fermentación simple, además de aumentar la producción de ARN. Este estudio permite incrementar significativamente el rendimiento del ARNs generado durante el proceso de fermentación.

3. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, los patógenos de cultivos agrícolas, especialmente los hongos y oomicetos, han causado importantes pérdidas económicas a nivel mundial. Estos microorganismos son responsables de enfermedades devastadoras en una amplia variedad de plantas de importancia agrícola, lo que ha impulsado la búsqueda de métodos más efectivos y sostenibles para su control. Entre las nuevas estrategias emergentes, el uso de ARN de doble cadena (ARNds) ha ganado protagonismo como un enfoque innovador para la protección de cultivos. El ARNs, utilizado en tecnologías como el silenciamiento de genes por interferencia de ARN (ARNi), ofrece una forma precisa y eficaz de controlar a los patógenos vegetales, reduciendo la dependencia de productos químicos convencionales y minimizando el impacto ambiental (Cai *et al.*, 2018).

El ARN de doble cadena actúa a nivel molecular mediante un proceso conocido como interferencia por ARN, un mecanismo de regulación genética que se da de forma natural en plantas, animales y hongos. El ARNi se activa cuando una célula detecta la presencia de ARNs, desencadenando una serie de reacciones que culminan en la degradación de ARN mensajero (ARNm) específico. En el contexto de los patógenos de cultivos, el ARNs se diseña para ser complementario a secuencias de ARNm esenciales en el patógeno. Una vez que el ARNs entra en la célula del patógeno, es procesado en pequeños fragmentos de ARN de interferencia (ARNsi). Estos fragmentos son luego incorporados al complejo RISC, que guía el corte específico del ARNm objetivo. De esta forma, se impide la traducción de proteínas críticas para la supervivencia o virulencia del patógeno, lo que resulta en su debilitamiento o eliminación.

A nivel global, el ARNs está comenzando a ganar aceptación como una herramienta biotecnológica para el manejo de patógenos de plantas, aunque su adopción aún es limitada en comparación con pesticidas químicos tradicionales (Fletcher *et al.*, 2020). En Europa, el uso de ARNs está alineado con las políticas de la Unión Europea enfocadas en promover prácticas agrícolas más sostenibles y reducir el uso de productos fitosanitarios convencionales, especialmente aquellos con efectos negativos para la salud humana y el medio ambiente.

Diversas compañías y centros de investigación están desarrollando productos basados en ARNs para el control de plagas y enfermedades. Entre los patógenos objetivo se incluyen hongos como *Botrytis cinerea*, causante de la podredumbre gris en uvas y otras frutas, y *Fusarium spp.*, responsable de la fusariosis en cereales. En oomicetos, *Phytophthora infestans*, agente causal del tizón tardío en patata y tomate, es uno de los principales objetivos. Estudios de campo han demostrado que el uso de ARNs puede reducir significativamente la incidencia de estas enfermedades en diversas condiciones agrícolas (Das & Sherif, 2020).

La eficacia del ARNs como tratamiento fitosanitario ha sido evaluada en numerosos estudios, con resultados prometedores. Por ejemplo, se ha documentado que el ARNs dirigido contra genes específicos de *Phytophthora infestans* puede reducir la severidad de las infecciones hasta en un 70%, mientras que el ARNs contra *Botrytis cinerea* ha mostrado ser efectivo en la reducción de esporulación y propagación de la enfermedad en cultivos de tomate y fresa (Qiao *et al.*, 2021). Otras plagas objetivo incluyen especies de insectos que actúan como vectores de virus de plantas, donde el ARNi también ha mostrado potencial para interrumpir el ciclo de transmisión de patógenos (Wytinck *et al.*, 2020).

El uso de ARNs presenta varias ventajas sobre los métodos tradicionales de control de patógenos. En primer lugar, al estar basado en secuencias específicas de los patógenos, el ARNs es altamente selectivo, lo que reduce el riesgo de dañar organismos no objetivo, incluidos insectos beneficiosos y microorganismos del suelo. Además, el ARNs es biodegradable y no deja residuos tóxicos en el ambiente, lo que contribuye a la sostenibilidad del sistema agrícola. Otra ventaja es su flexibilidad: los productos basados en ARNs pueden ser diseñados para atacar múltiples genes diana, permitiendo un control más amplio y efectivo de patógenos resistentes a otros tratamientos.

No obstante, también existen desventajas y desafíos asociados a su uso. Uno de los principales obstáculos es la estabilidad del ARNs en el ambiente. Debido a su naturaleza biológica, el ARNs puede ser degradado rápidamente por enzimas del suelo o de las hojas de las plantas, lo que limita su eficacia en condiciones de campo. Además, la producción de ARNs a gran escala puede ser costosa, lo que podría afectar su viabilidad económica en comparación con pesticidas más baratos. Asimismo, aún se requiere más investigación para entender mejor los mecanismos de absorción y transporte del ARNs en las plantas y los patógenos.

En conclusión, el ARNs emerge como una herramienta prometedora para el control de patógenos en cultivos, especialmente aquellos de difícil manejo como los hongos y oomicetos. Sin embargo, la investigación y desarrollo continúan siendo esenciales para optimizar su uso y superar los retos asociados.

4. RESULTADOS

Estudio de diferentes estrategias de fermentación para incrementar la producción de ARNs

Se planteó llevar a cabo diferentes pruebas de crecimiento empleando cepas de *E. coli* modificadas genéticamente productoras de ARNs, con el fin de evaluar el rendimiento del proceso de fermentación y la producción de ARNs. Para ello se utilizaron biorreactores a escala de laboratorio de 2 L y 5 L y se estudiaron diferentes parámetros de fermentación como los medios de cultivo (LB, DeLisa) y el modo de operación (batch, fed-batch, continuo).

En primer lugar, se estudió la influencia del medio de cultivo en el crecimiento de la bacteria, utilizando distintos medios de cultivo como LB (medio de cultivo control) o DeLisa (medio de

cultivo alternativo, más económico). Otros parámetros del proceso de fermentación como temperatura, pH, agitación o tiempo total se mantuvieron constantes durante los ensayos. Tras cada ensayo de fermentación se llevó a cabo la determinación del DCW (g/L) que indica el crecimiento de biomasa bacteriana, así como la extracción del ARNs y posterior cuantificación (ng/uL) para confirmar que la cepa bacteriana *E. coli* era capaz de producir el ARNs de forma adecuada. Para inducir la expresión del ARNs se añadió IPTG (1 mM) tras las 8 primeras horas de fermentación. Las extracciones de ARNs se llevaron a cabo por triplicado utilizando el kit comercial Quick RNA Fungal/Bacterial Miniprep kit (ZymoResearch), adaptando el protocolo para la purificación de ARNs.

Como se observa en la Tabla 1, los resultados finales de DCW (g/L) muestran un incremento de biomasa bacteriana utilizando el medio de cultivo DeLisa, en lugar del medio de cultivo LB que es utilizado de manera convencional para procesos de fermentación. Además, la cantidad promedio de ARNs extraído durante las fermentaciones utilizando medio DeLisa como medio de cultivo alternativo también fue mayor, manteniendo los ratios de pureza 260/280 y 260/230 en niveles adecuados, en torno a 1.8-2.2.

Tabla 1: Comparación de DCW, ARN total y ratios 260/280 y 260/230 en los diferentes medios de cultivo testados. *promedio de 3 extracciones utilizando Quick RNA Fungal/Bacterial Miniprep kit de ZymoResearch.

	LB	DeLisa
DCW (g/L)	5.6	6.9
Total RNA (ng/uL)*	492	550
260/280	1.91	2.04
260/230	1.94	2.11

Todo ello supone una ventaja económica importante si el proceso quiere ser escalado para llevar a cabo la producción industrial de ARNs.

Posteriormente, una vez seleccionado un medio de cultivo más económico que favorece el incremento de biomasa bacteriana, se continuaron los ensayos de crecimiento en biorreactor de 2 L para tratar de optimizar aún más los parámetros del proceso de fermentación. Se probaron tres tipos de operación diferentes: discontinuo (batch), semicontinuo (fed-batch) y continuo. Para llevar a cabo las alimentaciones de las fermentaciones en modo semi-continuo y continuo se utilizaron bombas peristálticas con flujo programable y una solución de alimentación con glucosa a 60 g/L (w/v). Para la fermentación en modo continuo se utilizó un sistema de microfiltración tangencial con membranas de fibra hueca, que permite recircular la biomasa al interior del biorreactor y retirar simultáneamente el caldo de cultivo exhausto del fermentador al exterior. Cada ensayo de fermentación se realizó por triplicado para reducir los errores de variabilidad en los resultados de DCW.

La Figura 1 muestra la configuración del biorreactor para funcionamiento continuo. La solución de alimentación se bombea continuamente y se introduce en el biorreactor. El caldo de fermentación que contiene la biomasa bacteriana se extrae del biorreactor también en funcionamiento continuo y se envía a una membrana de microfiltración tangencial (Watersep Explorer 24, Sartorius). La corriente de retenido, que contiene las células, se recircula al

biorreactor. La corriente de permeado se extrae a un caudal tal que el volumen en el biorreactor permanece aproximadamente constante. Gracias al sistema de agitación, la composición de la corriente de permeado es en todo momento similar a la composición del interior del biorreactor. Este modo de funcionamiento permite procesar grandes volúmenes de sustrato, lo que alarga el proceso de fermentación y, por tanto, obtiene presumiblemente una mayor concentración de producto, en este caso acumulación de ARN en el interior celular.



Figura 1: Montaje del biorreactor con el modo de operación en continuo. Incluye un sistema de filtración tangencial con membrana de fibra hueca para aumentar la producción de biomasa.

Tras llevar a cabo las pruebas de fermentación con los diferentes modos de operación se concluyó que aquella fermentación que mejores resultados mostraba en términos de DCW era la fermentación con el modo de alimentación en continuo, obteniéndose unos valores bastante superiores (15.4 g/L) respecto a aquellos valores obtenidos con los otros modos de operación (batch, 5.6 g/L y fed-batch, 11.4 g/L).

A continuación, en la Figura 2 se muestran los resultados de DCW obtenidos con cada uno de los diferentes modos de fermentación, y utilizando distintos medios de cultivo (LB y DeLisa).

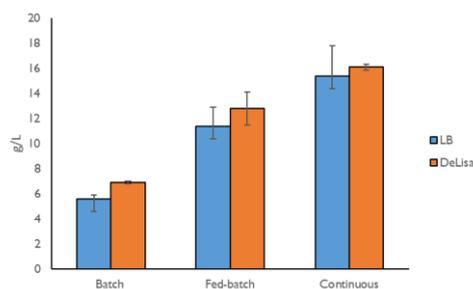


Figura 2: Representación de DCW (g/L) utilizando distintos modos de operación (batch, fed-batch y continuo) y medios de cultivo (LB y DeLisa).

Finalmente, en la Figura 3 se muestra una imagen representativa de la estrategia de cultivo optimizada para llevar a cabo la producción de biomasa bacteriana y ARNs, utilizando un modo de operación en continuo y medio de cultivo DeLisa.

La estrategia de cultivo puede resumirse en las siguientes fases:

- **Fase de preinóculo**: En esta fase se lleva a cabo el de crecimiento inicial del cultivo que servirá como preinóculo al cultivo posterior. Se realiza en matraz durante 8 horas, utilizando el medio de cultivo DeLisa.

- **Fase batch**: En esta fase se lleva a cabo la inoculación del preinóculo en el biorreactor. El cultivo se mantiene creciendo durante 4 horas, utilizando el medio de cultivo DeLisa y comienza a producirse la biomasa bacteriana.

- **Fase fed-batch con inducción**: En esta fase comienza la alimentación con la solución de glucosa a 60 g/L. Se lleva a cabo la acumulación de biomasa bacteriana debido a la alimentación con glucosa y comienza la inducción de la expresión génica para producir ARNs en el interior de las bacterias. La fase se mantiene durante 24 horas.

- **Fase fed-batch con inducción y cosecha**: En esta fase continúa la alimentación con glucosa a 60 g/L y comienza la microfiltración del caldo de fermentación para separar la biomasa bacteriana del caldo de cultivo exhausto. Se lleva a cabo la acumulación de biomasa bacteriana y una mayor producción de ARNs. La fase se mantiene durante 40 horas. Al finalizar, se recoge el caldo de cultivo y se centrifuga a alta velocidad para separar la biomasa bacteriana del caldo de cultivo. La biomasa será utilizada para realizar la extracción de ARNs.

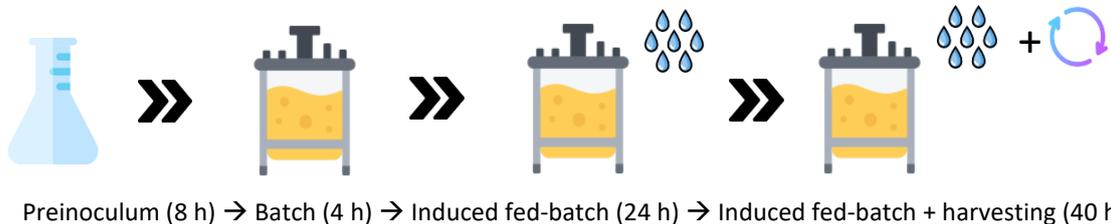


Figura 3: Estrategia de cultivo seguida para la producción de ARNs

5. CONCLUSIONES

Como conclusión, en este estudio se ha logrado evaluar un medio de cultivo que mejora el rendimiento de la fermentación convencional, así como un modo de operación más optimizado que también permite incrementar la biomasa bacteriana producida.

Todo ello redunda en una mayor cantidad de ARNs generado por proceso, con lo cual se incrementa el rendimiento final y se abaratan costes.

Esta estrategia puede ser utilizada para la producción a gran escala de ARNs y es adecuada para entornos industriales y de bajos recursos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Cai, Q., Qiao, L., Wang, M., He, B., Lin, F. M., Palmquist, J., Huang, S. Da, & Jin, H. (2018). Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science*, *360*(6393), 1126–1129.
- Das, P. R., & Sherif, S. M. (2020). Application of Exogenous dsRNAs-induced RNAi in Agriculture: Challenges and Triumphs. *Frontiers in Plant Science*, *11*.
- Fletcher, S. J., Reeves, P. T., Hoang, B. T., & Mitter, N. (2020). A Perspective on RNAi-Based Biopesticides. *Frontiers in Plant Science*, *11*.
- Niu, D., Hamby, R., Sanchez, J. N., Cai, Q., Yan, Q., & Jin, H. (2021). RNAs — a new frontier in crop protection. *Current Opinion in Biotechnology*, *70*, 204–212.
- Okorski, A., Pszczółkowska, A., Oszako, T., & Nowakowska, J. A. (2015). Current possibilities and prospects of using fungicides in forestry. *Forest Research Papers*, *76*(2), 191–206.
- Qiao, L., Lan, C., Capriotti, L., Ah-Fong, A., Nino Sanchez, J., Hamby, R., Heller, J., Zhao, H., Glass, N. L., Judelson, H. S., Mezzetti, B., Niu, D., & Jin, H. (2021). Spray-induced gene silencing for disease control is dependent on the efficiency of pathogen RNA uptake. *Plant Biotechnology Journal*, *19*(9), 1756–1768.
- Ray, P., Sahu, D., Aminedi, R., & Chandran, D. (2022). Concepts and considerations for enhancing RNAi efficiency in phytopathogenic fungi for RNAi-based crop protection using nanocarrier-mediated dsRNA delivery systems. In *Frontiers in Fungal Biology* (Vol. 3). Frontiers Media S.A.
- Taning, C. N. T., Arpaia, S., Christiaens, O., Dietz-Pfeilstetter, A., Jones, H., Mezzetti, B., Sabbadini, S., Sorteberg, H. G., Sweet, J., Ventura, V., & Smagghe, G. (2020). RNA-based biocontrol compounds: current status and perspectives to reach the market. *Pest Management Science*, *76*(3), 841–845.
- Wytinck, N., Manchur, C. L., Li, V. H., Whyard, S., & Belmonte, M. F. (2020). dsRNA Uptake in Plant Pests and Pathogens: Insights into RNAi-Based Insect and Fungal Control Technology. *Plants 2020*, Vol. 9, Page 1780, *9*(12), 1780.
- Zotti, M., dos Santos, E. A., Cagliari, D., Christiaens, O., Taning, C. N. T., & Smagghe, G. (2018). RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest Management Science*, *74*(6), 1239–1250.