

113

**Circular
Técnica***Campina Grande, PB
Outubro, 2007***Autores****Marleide Magalhães de Andrade Lima**
Eng. Flor., D.Sc., da
Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143 – Centenário
58107-720 – Campina Grande, Pb
E-mail: marleide@cnpa.embrapa.br**Marcia Soares Vidal**
Bióloga, D.Sc., da
Embrapa Agrobiologia
Rodovia BR 465, KM 7
23890-000 – Seropédica, RJ
E-mail: marcia@cnpab.embrapa.br**Leonardo Henrique Guedes
de Moraes Lima**
Biólogo, M.Sc., Bolsista do CNPq/
Embrapa Algodão**Carlos Henrique Salvino
Gadelha Meneses**
Biólogo, M.Sc., Doutorando da UFRJ
Av. Pedro Calmon, 550
Cidade Universitária
21941-901- Rio de Janeiro - RJ**Márcia Vanusa da Silva**
Eng. Agrôn., D.Sc., da UFPE
Av. Prof. Moraes Rego, 1235
Cidade Universitária
50670-901 - Recife - PE**Extração de RNA Total de Folhas de Algodoeiro**

O algodão é um dos produtos agrícolas de maior importância econômica do grupo das fibras, pelo volume e valor da produção. Seu cultivo é também de grande importância social, pelo número de empregos que gera direta ou indiretamente (RICHETTI; MELO FILHO, 2001).

A busca por cultivares de algodão tolerantes a diversos tipos de estresses bióticos e abióticos é de fundamental importância, face à expressão econômica que a cotonicultura representa em nível mundial.

Os métodos inovadores, envolvendo a compreensão da expressão de genes que propiciam a melhoria de genótipos, envolvem, além do seqüenciamento de DNA em larga escala, estratégias para ordenação de seqüências contíguas e métodos para identificação de genes em uma seqüência genômica, culminado na tecnologia da genômica funcional, que engloba estudos de transcriptoma e proteoma. (ARPAT et al., 2004, BRUCE et al., 2002, RONG et al., 2005).

O RNA total é utilizado em diversos tipos de análises de expressão gênica e caracterização de transcritos, baseando-se nos métodos de Northern, RT-PCR, construção de bibliotecas de cDNA e ESTs. Para essas análises, é recomendável a purificação da moléculas de RNA, de maneira que estas estejam intactas e completas, em termos de comprimento, além de puras e íntegras.

A principal preocupação na extração de RNA, por ser uma molécula instável, consiste em evitar a sua degradação por ribonucleases (RNases), que são enzimas extremamente resistentes a vários tratamentos, inclusive aos térmicos (fervura, autoclavagem). A utilização de agentes desnaturantes fortes permitem a quebra das células e a inativação das ribonucleases. No método básico, a extração é realizada com fenol seguida da precipitação do RNA por etanol. Para diminuir a contaminação por RNases - das soluções, equipamentos, vidrarias e reagentes -, é recomendável a autoclavagem e/ou o tratamento com dietilpirocarbonato (DEPC), que é um forte inibidor de RNases.

Um outro fator, que dificulta a obtenção de um RNA total de boa qualidade, é a presença de compostos fenólicos no material vegetal. Esses compostos estão presentes em todos os vegetais e compreendem um grupo heterogêneo de substâncias, umas com estruturas químicas relativamente simples e outras, complexas. Os compostos fenólicos causam oxidação no produto final da extração DNA ou RNA, de forma irreversível, tornando-o inviável para posterior uso nas técnicas de biologia molecular; no algodão, esse problema é agravado pela abundância desses compostos nas suas folhas.

Dentre os tipos de RNA, o mais utilizado em pesquisas de biologia molecular - visando o melhoramento de plantas - é o RNA mensageiro (RNAm), que permite determinar onde e quando certo gene está sendo expresso, para o entendimento posterior da sua função. Uma das estratégias envolvendo estudos com RNAm é a análise da expressão diferenciada de genes em respostas de tolerância, de resistência ou de fatores envolvidos com a interação patógeno-hospedeiro.

Após a realização de testes - utilizando vários protocolos de extração com a finalidade de neutralizar o efeito oxidativo dos compostos fenólicos presentes nas folhas de algodão sobre o RNA total -, pode-se estabelecer que o protocolo no qual foi usado o reagente o "Concert™ Plant RNA Reagent" foi o que melhor atendeu ao objetivo proposto (Fig. 1), cujo processo de extração será detalhado a seguir.

Folhas jovens medindo, aproximadamente, 2,5 cm foram coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido. De cada amostra, 0,1 g foi macerado em nitrogênio líquido com auxílio de pistilos e almofarizes de porcelana previamente resfriados, até torna-se um pó fino, que foi transferido para microtubos, aos quais, posteriormente, adicionou-se 0,5 mL de "Concert™ Plant RNA Reagent". O material contido nos microtubos foi lentamente misturado e incubado por cinco minutos à temperatura ambiente, tendo-se o cuidado de deixar os microtubos sempre na horizontal, para aumentar a superfície de contato. Após o período de incubação, o material foi centrifugado a 12.000 rpm, por dois minutos, à temperatura ambiente e o sobrenadante transferido para um novo microtubo. Em seguida, adicionaram-se 0,1 mL de cloreto de sódio (NaCl) 5M e

0,3 mL de clorofórmio, em cada tubo, os quais foram invertidos por dois minutos. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm à temperatura de 4 °C por 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, aos quais foi adicionado igual volume de isopropanol gelado. Posteriormente, o material foi incubado por dez minutos à temperatura ambiente e centrifugado novamente, a 12.000 rpm à temperatura de 4 °C, por 10 minutos. O precipitado formado foi lavado com 1 mL de etanol 75%, centrifugado a 12.000 rpm, por 1 minuto; em seguida, foi mantido à temperatura ambiente até a sua secagem e novamente mantido em 30 µL de água Milli-Q Rnase free. O RNA total extraído foi armazenado em um deep freezer à temperatura de -80 °C.

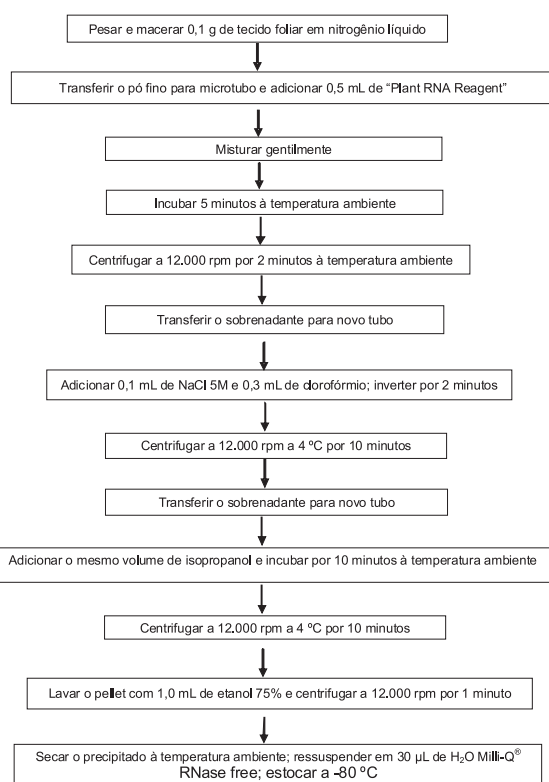


Fig. 1. Esquema do protocolo de extração utilizando o Plant RNA Reagent.

Para verificar a eficiência do protocolo, foi realizada a corrida do RNA extraído em gel de agarose a 0,8% (p/v), no qual observou-se a presença de bandas, concluindo-se que o protocolo é adequado para extração de RNA de folhas de algodoeiro.

Referências Bibliográficas

ARPAT, A.B.; WAUGH, M.; SULLIVAN, J.P.; GONZALES, M.; FRISCH, D.; MAIN, D.; WOOD, T.; LESLIE, A.; WING, R.A.; WILKINS, T.A. Functional genomics of cell elongation in developing cotton fibers. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 54, n. 6, p. 911-929, 2004.

BRUCE, W. B.; EDMEADES, G. O.; BARKER, T. C. Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p.13-25, 2002.

RICHETTI, A., MELO FILHO, G. A. de. Aspectos socioeconômicos do algodoeiro. In: **ALGODÃO: tecnologia de produção**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Campina Grande: Embrapa Algodão, 2001. p. 13-34.

RONG, J.; BOWERS, J. E.; SCHULZE, S. R.; WAGHMARE, V. N.; ROGERS, C. J.; PIERCE, G. J.; ZHANG, H.; ESTILL, J. C.; PATERSON, A. H. Comparative genomics of *Gossypium* and *Arabidopsis*: unraveling the consequences of both ancient and recent polyploidy. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 15, n. 9, p. 1198-1210, 2005.

Circular Técnica, 113

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143 Centenário, CP 174
58107-720 Campina Grande, PB
Fone: (83) 3315 4300 Fax: (83) 3315 4367
e-mail: sac@cnpa.embrapa.br

1ª Edição
Tiragem: 500

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Comitê de Publicações

Presidente: Nair Helena Castro Arriel
Secretária Executiva: Nivia Marta Soares Gomes
Membros: Demóstenes Marcos Pedroza de Azevedo
Everaldo Paulo de Medeiros
Fábio Aquino de Albuquerque
Francisco das Chagas Vidal Neto
João Luiz da Silva Filho
José Wellington dos Santos
Luiz Paulo de Carvalho
Nelson Dias Suassuna

Expedientes: Supervisor Editorial: Nivia M.S. Gomes
Revisão de Texto: Nisia Luciano Leão
Tratamento das ilustrações: Oriel Santana Barbosa
Editoração Eletrônica: Oriel Santana Barbosa