

Adaptação de protocolo de extração de RNA para acessos de *Paspalum* e *Brachiaria brizantha* cv. Marandu

Tatiane Beloni¹
Cristiana de Gaspari Pezzopane²
Mônica Mascaro Ruscito³
Bianca Baccili Zanotto Vigna⁴
Jacqueline Geraldo Lima¹
Patrícia Menezes Santos⁴

¹Aluna de doutorado em Ciências Animal e Pastagens, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, e-mail: tbeloni@usp.br.

²Bolsista de Pós-doutorado, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

³Aluna de graduação em Engenharia Agrônoma, Centro Universitário de Araraquara, Araraquara, SP;

⁴Pesquisadora, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

O gênero *Paspalum* é o mais importante da família Poaceae nas Américas e a *Brachiaria brizantha* cv. Marandu é a espécie mais utilizada em pastagens brasileiras, o que torna essas plantas interessantes para serem exploradas em estudos moleculares. Contudo, a presença de grandes quantidades e variedades de compostos secundários nos tecidos vegetais torna difícil a padronização da metodologia de extração de RNA (ácido ribonucléico) total de alta qualidade entre as diferentes espécies e tecidos da planta. O objetivo desse trabalho foi adaptar o protocolo de extração de RNA total desenvolvido para gramíneas tropicais por Chiari et al. (2011) para uma extração mais eficiente de RNA de lâminas foliares de seis acessos de *Paspalum* (BRA 19186, BRA 23469, BRA 23540, BRA 21377 e BRA 23671) e *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, visando posteriores estudos de expressão gênica. Todos os passos indicados no protocolo original foram seguidos, entretanto algumas modificações foram realizadas. Foi adicionado um passo com Trizol[®] (Invitrogen) refrigerado (2mL) após a maceração manual, sendo retirados os passos seguintes com Trizol[®]. Houve a inclusão de uma a duas lavagens, de acordo com a necessidade, com clorofórmio:ácido isoamílico após o passo com clorofórmio puro gelado. Nos passos finais, a secagem do precipitado passou de 10 minutos em temperatura ambiente para 30 minutos em gelo e o tempo de eluição do precipitado a 37°C passou de 30 para 10 minutos, a fim de evitar a degradação do RNA total. Para minimizar a oxidação e a degradação, todos os passos foram realizados no gelo. Após o isolamento, o RNA total foi quantificado por meio do espectrofotômetro Nanodrop 2000 e a integridade foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (5 µg/ml), pela análise das bandas 28S, 18S e 5S de RNA ribossômico. A utilização desse método rendeu quantidades (ng/mL) de RNA variáveis, entretanto, suficientes para dar seguimento ao trabalho. A razão das absorbâncias A260nm/A280nm ficou próxima da ideal (1,8 a 2,0), o que demonstra menor contaminação e maior pureza na extração desse ácido nucleico. Desta forma, pode-se observar que as pequenas modificações realizadas no protocolo para extração de RNA, considerando tanto a qualidade e quantidade das amostras, se mostrou mais eficaz para extração de RNA das lâminas foliares desses genótipos estudados, uma vez que puderam ser submetidas às etapas posteriores para estudos de expressão gênica diferencial.

Palavras-chave: Ácidos nucleicos, germoplasma, gramíneas, *Paspalum*, RNA

Apoio financeiro: FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Processo #2011/20558-0) e Bolsa CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Área: Biotecnologia/ Genética e Melhoramento Vegetal