

Extração de RNA em *Cochlospermum regium* (Schrunk) Pilg. (Bixaceae): superando a recalcitrância da espécie

Salvato, L. A; Nascimento, K. C; Souza, C. S; Koehler, A. D; Araújo, H. H; Otoni, W. C.

ODS9

Pesquisa

Introdução

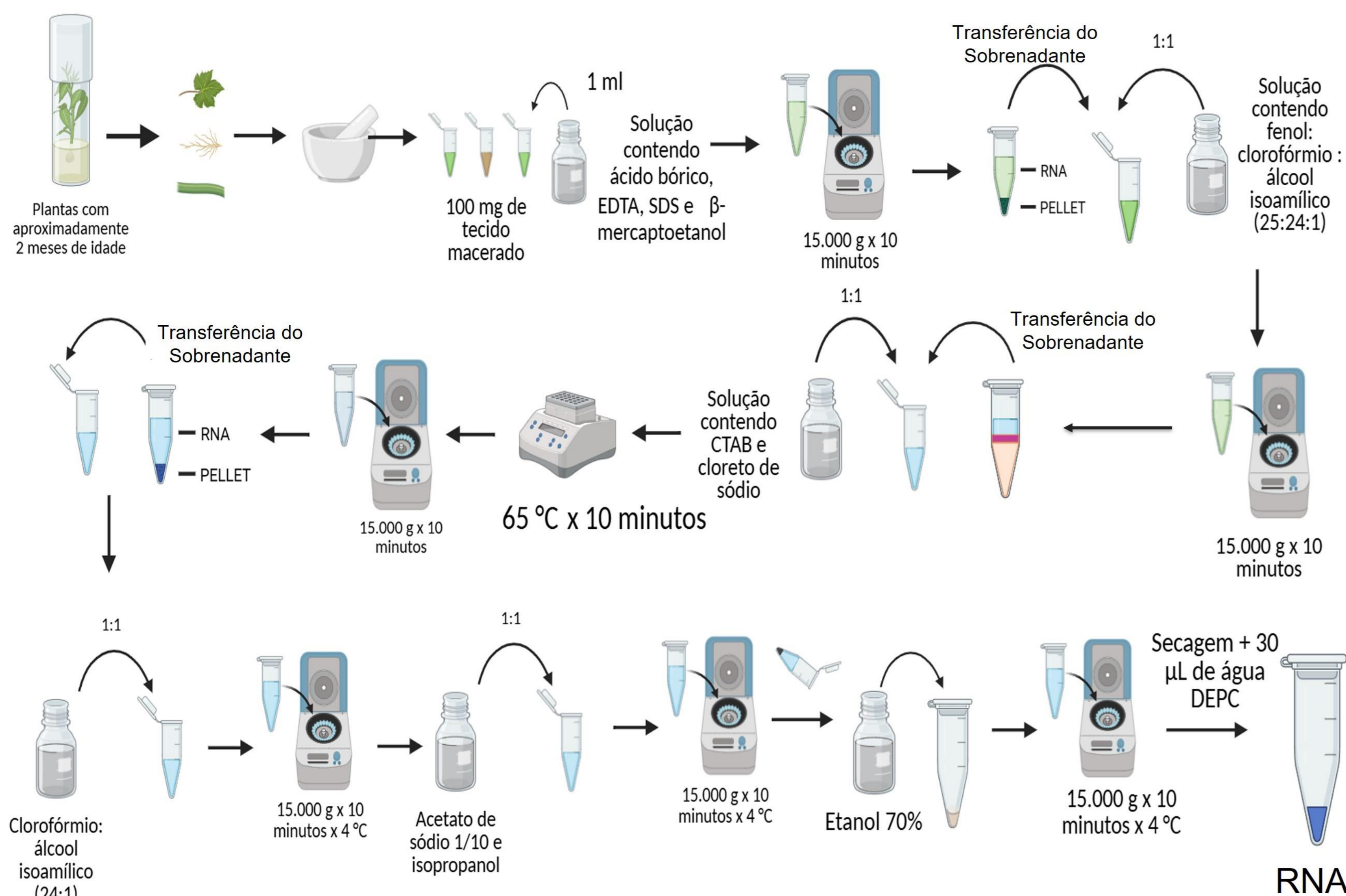
A espécie *Cochlospermum regium*, popularmente conhecida como "algodãozinho-do-cerrado", é uma planta nativa reconhecida por suas propriedades medicinais. No entanto, destaque-se que seu elevado teor de polissacarídeos, taninos e polifenóis representa um desafio para a aplicação de técnicas de biologia molecular, dentre elas a extração de RNA total.

Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de extração de RNA adaptado para a espécie. Foram testadas duas metodologias: I) baseada em Rodrigues *et al.* (2007), com adaptações e II) utilizando o kit RNAqueous™ (Total RNA Isolation Kit, Invitrogen).

Material e Métodos

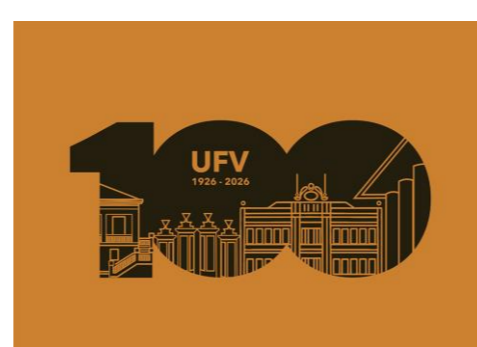
• Metodologia I:



Feito pelo aplicativo Biorender por Louise Salvato.

• Metodologia II: de acordo com as instruções do fabricante.

Agradecimentos



Apoio Financeiro

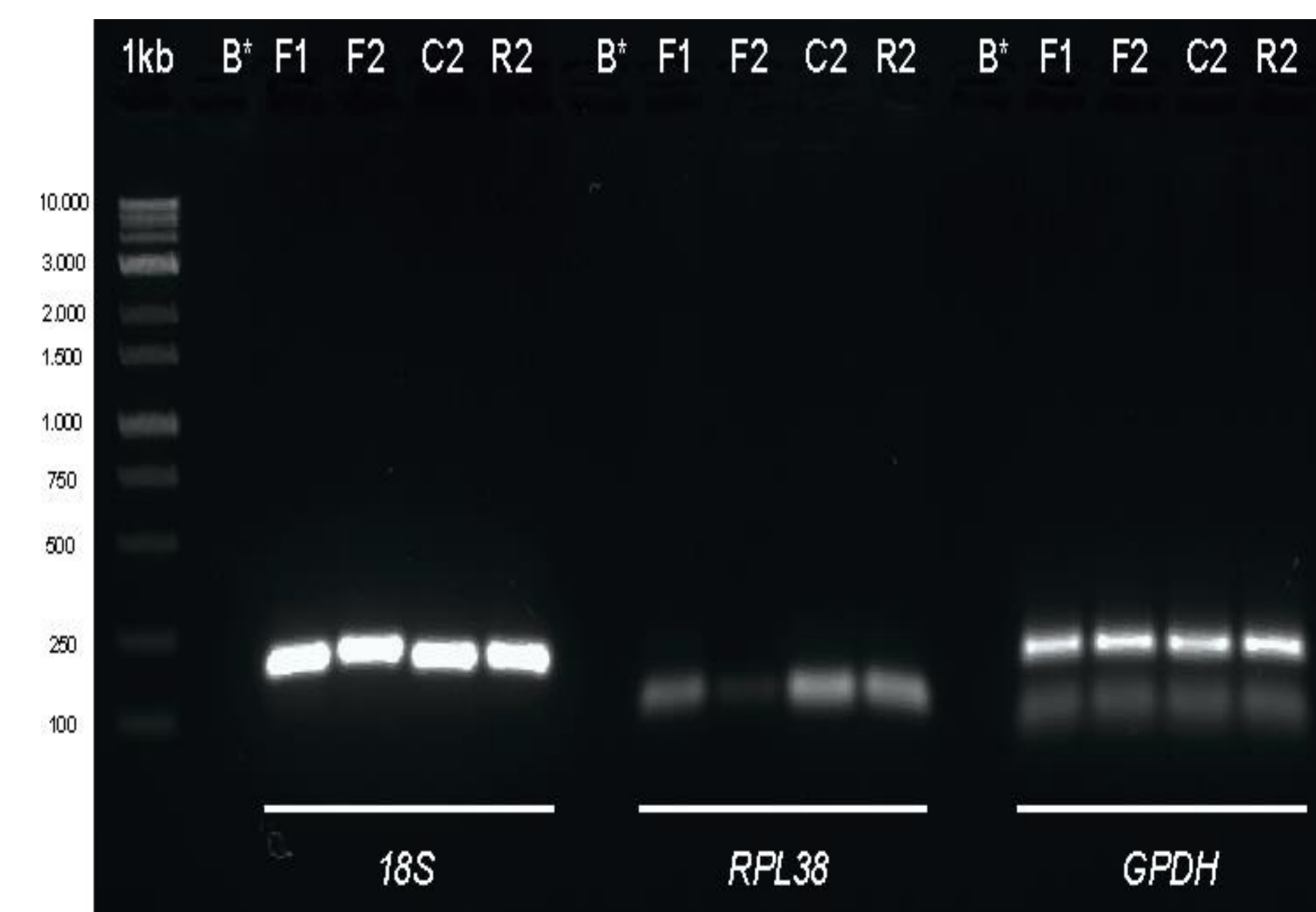


Resultados

A metodologia I foi adequada para extração de RNA de folhas, ao passo que a metodologia II adequou-se para caules e raízes. Em ambos os protocolos obteve-se RNA com concentração e qualidade adequadas para uso em análises moleculares. Reações de transcrição reversa foram realizadas para obtenção de cDNAs, utilizados para amplificação de genes endógenos normalizadores com primers heterólogos para os genes *18S*, *RPL38*, *RPS9*, *Actina*, *40S3* e *GPDH*. Os primers *18S*, *RPL38* e *GPDH* permitiram a amplificação de fragmentos de tamanhos esperados.

Quantificação de RNA					
RNA Não Tratado			RNA Tratado		
Amostras	Razão A260/280	RNA Total (lg/g FW)	Amostras	Razão A260/280	RNA Total (lg/g FW)
Folha - Metodologia I	1,77	209,3	Folha - Metodologia I	1,85	144,4
Folha - Metodologia II	1,47	185,4	Folha - Metodologia II	1,55	131,6
Caule - Metodologia II	1,9	108,5	Caule - Metodologia II	1,9	88,1
Raiz - Metodologia II	1,9	78,8	Raiz - Metodologia II	1,95	63,9

B



C

PCR Semi-quantitativo	
Amostra	Quantificação relativa
Branco	0
FI - 18S	1
FII - 18S	0,9365
CII - 18S	1,049
RII - 18S	0,994
FI - RPL38	0,261289
FII - RPL38	0,0758
CII - RPL38	0,524754
RII - GPDH	0,474114
FI - GPDH	0,565015
FII - GPDH	0,584613
CII - GPDH	0,705104
RII - GPDH	0,706994

Figura 1. Quantificação do RNA (A) Eletroforese evidenciando os amplicons de cDNAs de normalizadores endógenos (genes *18S*, *RPL38* e *GPDH*) obtidos a partir da extração de RNA com as metodologias I e II (B) e quantificação relativa por PCR semi-quantitativa (C). B* = Branco; F1 = RNA de folha extraído com a metodologia I; F2 = RNA de folha extraído com a metodologia II; C2 = RNA de caule extraído com a metodologia II; R2 = RNA de raiz extraído com a metodologia II.

Conclusões

As duas metodologias foram eficazes para a extração de RNA íntegro. Vislumbra-se a aplicação dessas metodologias em futuras análises de expressão de genes associados à biossíntese de bixina.

Bibliografia

RODRIGUES, S.M. *et al.* (2007). Isolation and purification of RNA from tissues rich in polyphenols, polysaccharides, and pigments of annatto (*Bixa orellana* L.). *Molecular Biotechnology*, 37,(3): 220–224.