

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio-Norte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

DOCUMENTOS 284

VI Jornada Científica da Embrapa Meio-Norte

25 a 27 de novembro de 2020

*Fábia de Mello Pereira
Edvaldo Sagrilo
Rosa Maria Cardoso Mota de Alcantara*

Editores Técnicos

Anais

Embrapa Meio-Norte
Teresina, PI
2021

Protocolo de extração de RNA de jurema-preta para estudo de expressão gênica por RT-qPCR

Aryanny Paula Sousa Ferreira¹; Cleidiane Macêdo Santos¹; Letícia Soares Ribeiro²;
Leonardo Castelo Branco Carvalho³; Paulo Sarmanho da Costa Lima⁴

¹Mestre em Genética e Melhoramento/UFPI. ²Graduanda em Engenharia Agrônoma/UFPI. ³Bolsista do Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD-CAPES)/UFPI. ⁴Pesquisador da Embrapa Meio-Norte

Jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) é uma espécie forrageira com ampla distribuição na região semiárida brasileira, para a qual ainda são desconhecidas informações envolvendo análises moleculares. Atualmente, existe grande variedade de protocolos para a extração de RNA total com alta qualidade. No entanto nem todo protocolo se adequa a qualquer espécie devido a certas particularidades. Plantas, principalmente as espécies perenes e lenhosas, contêm grande quantidade de compostos fenólicos e polissacarídeos, que podem atuar comprometendo o isolamento e a purificação do material genético. O presente estudo objetivou determinar um método para a extração de RNA com concentração e pureza adequadas ao uso em ensaios de expressão gênica por PCR em tempo real (RT-qPCR) para jurema-preta. Foram testados cinco métodos: (I) Trizol; (II) Purelink-Mini Kit; (III) Concert™; (IV) Híbrido-CTAB; e (V) Concert™ Modificado, utilizando-se 100 mg de tecido foliar apical. O rendimento do RNA foi determinado por fluorimetria e a pureza, por espectrofotometria. A integridade nos métodos I a IV foi determinada por meio da avaliação do RIN (*RNA integrity number*), enquanto no método V foi utilizada eletroforese em gel desnaturante. O RNA extraído foi transcrito reversamente em DNA complementar (cDNA) a fim de ser utilizado como template para prospecção dos genes β -ACT (Actina) e HSP (*Heat-shock proteins*) por RT-qPCR. Para cada gene, foram testadas quatro temperaturas de anelamento em triplicata. Os protocolos I a IV obtiveram concentração média de 12,01 ng/ μ L a 173,78 ng/ μ L, com razões de pureza 0,32-0,78 (A260/230) e 0,73-0,92 (A260/280), e a análise do RIN < 3 mostrou intensa degradação. O protocolo V obteve concentração média de 2.940 ng/ μ L, com razões de pureza 2,25 (A260/230) e 2,11(A260/280). A análise de integridade evidenciou de forma moderadamente definida a presença das bandas ribossômicas 28S e 18S, com pouco sinal de arraste e ausência de fragmentos de bandas menores. A plotagem das curvas de amplificações dos transcritos da β -ACT (Cq=17,95) demonstrou boa reprodutibilidade, apresentando baixo desvio-padrão ($\sigma < 0,4$). Enquanto isso, as detecções mais tardias das amplificações do gene HSP resultaram em um valor de Cq mais elevado (Cq = 33,61), devido a um menor número de transcritos aptos a ser amplificados, entretanto houve boa reprodutibilidade ($\sigma \leq 0,3$). A especificidade dos *amplicons* foi confirmada pela Curva de *Melting*. O RNA extraído pelo método V é adequado a estudos de expressão gênica por RT-qPCR, bem como a outras aplicações moleculares, em jurema-preta.

Palavras-chaves: DNA complementar; *Mimosa tenuiflora*; transcrição.

Agradecimentos: Embrapa Meio-Norte, FAPEPI e CAPES.