

Comparação de Protocolos para Extração de RNA de Tegumentos de Sementes de Soja

Agnes Izumi Nagashima¹, Liliane Marcia Mertz Henning², Adriana Maria Polizel Podanosqui², Rosângela Maria Pinto Moreira¹, Fernando Augusto Henning²

¹Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Biologia Geral
Caixa Postal 10011 – CEP 86057-970 Londrina – PR - E-mail: agnesnagashima@yahoo.com.br

²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Soja
Caixa Postal 231 – 86001-970 Londrina-PR

RESUMO

O uso de semente de soja de alta qualidade é essencial para alcançar melhor produtividade, sendo o dano mecânico e o dano por deterioração por umidade os principais fatores limitantes para detenção de sementes de qualidade. Pesquisas de melhoramento genético relacionam proporcionalmente o conteúdo de lignina no tegumento das cultivares com a qualidade da semente e resistência a ocorrência de danos. Dessa forma, este trabalho apresentou como objetivo avaliar quatro protocolos utilizando diferentes reagentes (trizol® e Pure Link Plant RNA Reagent®) e quantidades iniciais de amostra para extração de RNA do tegumento de genótipos de soja contrastantes para teor de lignina (Doko e FT-2, de alto teor de lignina e Savana e Davis, de baixo teor). O protocolo utilizando o reagente Pure Link Plant RNA Reagent foi o mais eficiente para extração de RNA de tegumento de genótipos de soja com diferentes teores de lignina.

Palavras-chave: *Glycine max*, Trizol, Pure Link.

INTRODUÇÃO

Dentro do agronegócio mundial, a produção de soja está entre as atividades econômicas que, nas últimas décadas, apresentaram crescimentos mais expressivos. A utilização de semente de soja de alta qualidade associada a boas práticas de semeadura contribui para que máximas produtividades sejam alcançadas. Um dos principais fatores limitantes para a produção de alta qualidade é o dano mecânico, além de deterioração por umidade^{1,2,3}.

A presença de lignina no tegumento (cobertura, envoltório ou casca, responsável pela proteção do embrião) é fundamental por proporcionar maior resistência a dano mecânico e proteger as paredes celulares contra a invasão de microrganismos. A introdução de caracteres de maior resistência do tegumento da semente de soja está relacionada à característica da permeabilidade do tegumento, que é uma característica avaliada na soja visando qualidade das sementes com direcionamento das práticas de manejo ou de ações via melhoramento genético^{4,5}.

Dessa forma, para pesquisas de melhoramento genético relacionando o conteúdo de lignina e a qualidade de sementes de soja, é fundamental o conhecimento de genes envolvidos nas vias de biossíntese de lignina. Para o estudo da expressão de genes, é fundamental a extração de RNA e síntese de cDNA. Diferentes métodos têm sido descritos para o isolamento do RNA, uma vez que cada tecido vegetal apresenta diferentes composições de substâncias interferentes, sendo essencial o estabelecimento de protocolos para esse objetivo^{6,7}. Assim, o

objetivo deste trabalho foi avaliar protocolos para extração de RNA do tegumento de genótipos de soja contrastantes para teor de lignina.

MATERIAL E MÉTODOS

As cultivares de soja eram contrastantes para conteúdo de lignina no tegumento, sendo Doko e FT-2 com alto teor de lignina no tegumento e Savana e Davis, com baixo teor. Foi retirado o tegumento de cada semente com auxílio de lâminas esterilizadas, sendo as amostras acondicionadas em microtubos e armazenadas em ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

As amostras do tegumento em pó foram obtidas com a maceração dos tegumentos com nitrogênio líquido em cadinho com auxílio de pistilo. Para extração do RNA total dos tegumentos das sementes de soja foram testados quatro protocolos utilizando: 1 – o reagente Trizol (Invitrogen®) modificado 1; 2 – o reagente Trizol (Invitrogen®) modificado 2; 3 – o reagente Trizol (Invitrogen®) modificado 3; 4 – o reagente Pure Link Plant RNA Reagent (Invitrogen®) modificado.

No protocolo utilizando Trizol modificado 1, acrescentou-se 1 mL de Trizol em um microtubo com aproximadamente 100 mg de tegumento em pó e agitou-se em *mixer* por dez minutos. Em seguida, centrifugou-se a 14000 rpm por 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi retirado em outro microtubo e neste adicionou-se 400 μL de clorofórmio e agitou-se no mixer por cinco minutos. Procedeu-se a centrifugação a 12000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por dez minutos. Transferiu-se o sobrenadante e adicionou-se novamente 400 μL de clorofórmio, agitou-se por cinco minutos e centrifugou-se nas condições anteriores. Transferiu-se o sobrenadante em um novo microtubo e adicionou-se 210 μL de *high salt buffer* (0,8 M citrato de sódio/ 1,2 M de cloreto de sódio) e 250 μL de isopropanol e agitou-se por dez minutos. Centrifugou-se novamente nas mesmas condições. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se no mesmo microtubo 100 μL de água DEPC (água ultrapura livre de DNA e RNA com 0,01 % de dietilpirocarbonato), 10 μL de acetato de sódio e 250 μL de etanol e agitou-se por cinco minutos e centrifugou-se a 12000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. Descartou-se sobrenadante e adicionou-se 400 μL de etanol, centrifugando-se a 14000 rpm por 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foi descartado o sobrenadante, e após evaporar o etanol, o RNA foi dissolvido em 30 μL de água com DEPC para em seguida quantificar o RNA em espectrofotômetro.

No protocolo utilizando Trizol modificado 2, utilizou-se o mesmo procedimento do protocolo anterior, porém utilizando aproximadamente 300 mg de tegumento em pó.

No protocolo utilizando Trizol modificado 3, realizou-se o protocolo 2 com alteração na primeira centrifugação, utilizando-se 200 μL de clorofórmio mais 200 μL de fenol ao invés de utilizar 400 μL de clorofórmio.

No protocolo utilizando o reagente Pure Link Plant RNA Reagent (Invitrogen®), adicionou-se 1,0 mL do reagente gelado ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) em microtubo com aproximadamente 300 mg de tegumento em pó. A amostra foi agitada em mixer, incubando-se por cinco minutos a temperatura ambiente. Centrifugou-se a amostra por 15 minutos a 12000 g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo, adicionando-se 0,1 mL de NaCl (5 M). Em seguida, acrescentou-se 0,3 mL de clorofórmio, centrifugando as amostras a 12000 g, por dez minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A parte aquosa foi transferida para outro microtubo e adicionou-se igual volume de isopropanol. Manteve-se a mistura em repouso por dez minutos a temperatura ambiente. Procedeu-se a uma nova centrifugação nas condições anteriormente descritas. Removeu-se o sobrenadante, sem perder o *pellet*, e adicionou-se 1,0 mL de etanol 75 %.

Centrifugou-se a temperatura ambiente (12000g por um minuto) e retirou-se o líquido, com uma breve centrifugação para se retirar o líquido residual com auxílio da micropipeta. O RNA extraído foi ressuspensionado em 20 μL de água DEPC e estocado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A quantidade do RNA total extraído nos protocolos foi mensurada no equipamento espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 por meio de análise de absorbância (260/280nm) e a qualidade (integridade) foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v) contendo tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1x corad com solução de brometo de etídeo. Foi aplicado no gel 1,5 μL do RNA extraído com 4 μL de H₂O DEPC e 1,5 μL de azul de bromofenol. A corrida em gel de eletroforese, para migração do RNA, ocorreu sob tensão de 100 V durante 30 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os protocolos testados para extração de RNA total, observou-se que no primeiro protocolo, foi baixa a quantidade extraída de RNA dos genótipos testados, com média de 30,1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, sendo que a concentração mínima considerada ideal é de 500 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, não sendo realizado, portanto, verificação do RNA total em gel de agarose 1,5 %. A quantidade baixa de RNA obtida por esse método, pode ser explicado por esse protocolo ser utilizado principalmente para extrações em tecidos foliares.

Na tabela 1, são apresentados os resultados da concentração de RNA e o grau de pureza obtidos nos protocolos 2 a 4 e a qualidade do RNA obtido pode ser visualizado na figura 1.

Pelos resultados obtidos com o segundo protocolo observou-se que apenas as cultivares Savana (665,22 $\text{ng}/\mu\text{L}$) e Davis (793,12 $\text{ng}/\mu\text{L}$) obtiveram quantidade superior a mínima ideal. Pode-se observar também pelo RNA total em gel de agarose 1,5 %, a presença do RNA ribossomal 28 S e 18 S, utilizado para verificar a integridade do material.

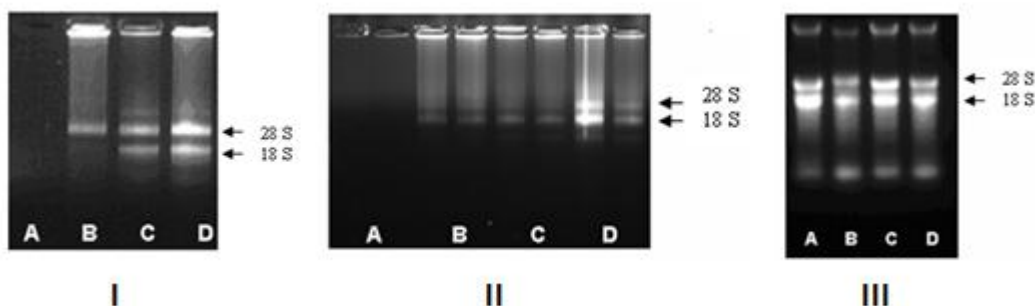
No protocolo 3, além de maior quantidade de material inicial, na primeira etapa da centrifugação com clorofórmio, adicionou-se também fenol. Esses reagentes são utilizados para separar o RNA das proteínas. Verificou-se que para os genótipos Savana (679,96 $\text{ng}/\mu\text{L}$), FT-2 (651,84 $\text{ng}/\mu\text{L}$) e Davis (665,48 $\text{ng}/\mu\text{L}$) obteve-se quantidades ideais (acima de 500 $\text{ng}/\mu\text{L}$) de RNA, e com qualidade medida com a relação 260/280 em torno de 2. Apenas para Doko (124,84 $\text{ng}/\mu\text{L}$), foi obtida quantidade inferior da ideal.

Tabela 1 Concentração de RNA ($\text{ng}/\mu\text{L}$) e grau de pureza em espectrofotômetro (relação 260/280 nm) de amostras de RNA total extraído de tegumentos de sementes de soja dos genótipos Doko (D), Savana (S), FT-2 (F) e Davis (DA) utilizando o protocolo 2 (I), 3 (II) e 4 (III)

Genótipo	Concentração	Relação	Concentração	Relação	Concentração	Relação
	RNA ($\text{ng}/\mu\text{L}$) I	260/280 I	RNA ($\text{ng}/\mu\text{L}$) II	260/280 II	RNA ($\text{ng}/\mu\text{L}$) III	260/280 III
D	55,4	1,90	124,84	1,95	3247,02	1,94
S	665,22	2,02	679,96	2,10	2228,16	1,95
F	358,69	2,00	651,84	2,04	3007,40	1,97
DA	793,12	2,08	665,48	2,17	2762,17	2,04

Verificou-se pela tabela 1, quantidades superiores e acima das ideais de RNA total para todos os genótipos para o protocolo 4, diferentemente dos protocolos anteriores, além de apresentarem qualidade, uma vez que a relação 260/280 está em torno de 2. Mertz et al. (2009) também consideraram como extremamente eficiente a metodologia utilizando o reagente *Pure Link Plant RNA Reagent*, uma vez que esse reagente é recomendado para isolamento de RNA total de alta qualidade, especialmente de tecidos que apresentam alto conteúdo de polifenóis⁸.

Figura 1 RNA total em gel de agarose 1,5 %, isolado de tegumentos das quatro cultivares (A- Doko; B- Savana; C- FT-2; D- Davis) dos protocolos 2 (I), 3 (II) e 4 (III).



CONCLUSÕES

O método utilizando o reagente *Pure Link Plant RNA Reagent* foi o mais eficiente para extração de RNA total de tegumento de genótipos de soja com diferentes teores de lignina.

REFERÊNCIAS

- (1) KRZYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA NETO, J. de B.; COSTA, N. P. Teste do hipoclorito de sódio para semente de soja. Londrina: Embrapa Soja. 2004. 4p.(Embrapa Soja, Circular Técnica 37)
- (2) KRZYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA NETO, J. de B.; HENNING, A.A.; COSTA, N. P. O controle de qualidade agregando valor à semente de soja – série sementes. Londrina: Embrapa Soja. 2008a. 12p.(Embrapa Soja, Circular Técnica 54)
- (3) HIRAKURI, M.H.; LAZZAROTTO, J.J. Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial e brasileiro. Londrina: Embrapa Soja. 2011.67p. (Embrapa Soja, Documento 319)
- (4) CAPELETI, I.; BONINI, E.A.; FERRARESE, M.L.L.; TEIXEIRA, A.C.N.; KRZYZANOWSKI, F.C.; FERRARESE-FILHO, O. Lignin content and peroxidase activity in soybean seed coat susceptible and resistant to mechanical damage. **Acta Physiologiae Plantarum** v. 27 n. 1, p. 103-108, 2005
- (5) MARCOS FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: Fealq, 2005
- (6) LONGEMANN, J.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. **Analytical Biochemistry** v. 163, p. 16-20, 1987
- (7) SHARMA, A.D.; GILL, P.K.; SINGH, P. RNA isolation from plant tissues rich in polysaccharides **Analytical Biochemistry**, v. 314, p. 319-321, 2002
- (8) MERTZ, L.M.; HENNING, F.A.; ZIMMER, P.D. cDNA-AFLP na identificação de genes relacionados a qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 31, no. 2, p.48-53, 2009