

## PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE RNA EM SEMENTES DE CAFÉ<sup>1</sup>

Tanismare Tatiana Almeida Silva<sup>2</sup>; Luciana Aparecida de Souza Abreu<sup>3</sup>; Vivian Elias do Nascimento<sup>4</sup>, Édila Resende Vilela Von Pinho<sup>5</sup>, Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa<sup>6</sup>; Lilian Padilha<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Trabalho financiado pela Embrapa Café / CNPq / INCT Café/CAPES

<sup>2</sup> Pesquisadora, D.Sc., UFLA/INCT, Lavras – MG, tanismaresilva@gmail.com

<sup>3</sup> Pesquisadora, D.Sc., Embrapa Café/UFLA, Lavras – MG, luapsouza2003@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Pesquisadora, D.Sc., Capes/UFLA, Lavras – MG, vivian\_nascimento@hotmail.com

<sup>5</sup> Professora, D.Sc., UFLA, Lavras – MG, edila@ufla.br

<sup>6</sup> Pesquisadora, Ph.D., Embrapa Café, Lavras – MG, sttelaveiga@ufla.com

<sup>7</sup> Pesquisadora, D.Sc., Embrapa Café/IAC, Campinas – SP, lilian@iac.sp.gov.br

**RESUMO:** As sementes são um importante meio de propagação de culturas do gênero *Coffea*, sendo de fundamental importância a obtenção de sementes com alta qualidade, para a produção de mudas. Estudos moleculares têm se mostrado úteis na obtenção de classes distintas de marcadores moleculares que auxiliam na elucidação dos fatores que afetam a qualidade das sementes. Para o estudo de genes expressos em sementes, há necessidade de se obter RNA de boa qualidade e em quantidades satisfatórias. Assim, nesse estudo, objetivou-se testar e aperfeiçoar metodologia para extração de RNA em sementes de café (*Coffea arabica* L.) para posterior utilização em técnicas de análise de expressão gênica. Para a quantificação de RNA foram utilizadas amostras de sementes inteiras e endosperma, secas e embebidos, com e sem liofilização. A extração do RNA total foi realizada conforme o protocolo Pury Link Plant RNA Reagent (Invitrogen™) e a qualidade e integridade do RNA extraído foram verificadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%. A utilização de sementes de café secas e sem liofilização foi eficiente na obtenção de RNA de melhor qualidade.

**Palavras-chaves:** *Coffea* sp., biologia molecular, qualidade de sementes.

## RNA EXTRACTION PROTOCOL IN COFFEE SEEDS

**ABSTRACT:** Seeds are an important dispersal strategy used by coffee plants. Obtaining high quality coffee seeds is essential for the production of plant seedlings. For the gene expression analysis in seeds, is necessary to obtain RNA with high quality and quantity. In this work, the objective was to investigate the better methodology of RNA extraction in coffee seeds (*Coffea arabica* L.) for posterior use in gene expression techniques analysis. For the RNA quantification intact seeds or endosperm, either dry or imbibed, with or without liofilization were used. The total RNA was extracted using Pure Link Plant RNA Reagent protocol (Invitrogen™). The quality and integrity of RNA extracted was checked by agarose gel electrophoresis. The use of dry coffee seeds without liofilization was efficient to obtain high quality RNA.

**Key-words:** *Coffea* sp., molecular biology, seed quality.

## INTRODUÇÃO

A pesquisa na área de biologia molecular associada ao controle de qualidade de sementes tem evoluído rapidamente e novas técnicas têm se mostrado úteis na obtenção de classes distintas de marcadores moleculares. Estes auxiliam na elucidação dos fatores que afetam a qualidade, a manipulação, a identificação e preservação do material genético, permitindo o monitoramento de todo o processo produtivo.

O isolamento de RNA de qualidade é um pré-requisito para estudos de expressão gênica incluindo transcriptase reversa (RT), PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), construção de bibliotecas de cDNA ou análises de microarray (Cardillo et al., 2006; Paula et al., 2009). Devido à presença de uma grande gama de metabólitos secundários, polissacarídeos e polifenóis, a extração de RNA em tecidos do cafeeiro torna-se uma etapa de difícil padronização entre os diferentes tecidos da semente e a obtenção de quantidade suficiente de RNA pode ser complicada pela suscetibilidade do RNA à degradação por RNAses.

Outra etapa essencial para a obtenção de boas amostras de RNA é a eliminação total do DNA após a extração, pois apenas uma única cópia de DNA é capaz de gerar um falso positivo em estudos de expressão gênica (Birtic & Kranner, 2006).

As dificuldades na extração de RNA em tecidos de plantas ricos em polissacarídeos têm sido reportadas em várias publicações, as quais demonstram as diferentes condições requeridas para o sucesso do isolamento do RNA em diferentes espécies (Gehrig et al., 2000). Em sementes de café, um dos principais problemas encontrados é a grande

quantidade de compostos fenólicos que são facilmente oxidados e, este fato interfere na preparação, resultando em RNA de baixa qualidade para as análises posteriores (Cordeiro et al., 2008).

Diversos estudos descrevem protocolos de extração diferentes para tecidos vegetais ricos em polifenóis ou polissacarídeos, que são os tecidos que impõe uma maior dificuldade para isolamento de boa quantidade de RNA e de alta qualidade. Entretanto esses estudos desenvolvem técnicas para tecidos vegetais específicos e de espécies específicas, já que a eficiência de cada método é altamente dependente da composição do tecido (Azevedo et al., 2003, Campos et al., 2010).

Assim, objetivou-se com o trabalho avaliar diferentes tecidos e pré-tratamentos em sementes de café para extração de RNA para posterior utilização em técnicas de análise de expressão de genes.

## MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras, utilizando sementes de *Coffea arabica* L. Para testar a metodologia de extração de RNA, foram utilizadas três repetições dos seguintes tratamentos: T1 - Sementes secas; T2 - Endosperma seco; T3 - Semente embebida em água; T4 - Endosperma embebido em água; T5 - Semente seca liofilizada; T6 - Endosperma seco liofilizado; T7 - Semente embebida em água e liofilizada; T8 - Endosperma embebido em água e liofilizado. Para a embebição, as sementes e endospermas foram imersos em água por período de 18 horas, em temperatura de 30 °C.

O material vegetal permaneceu armazenado a -80 °C até o momento da extração. Cerca de 100 mg de tecido foi macerado em nitrogênio líquido e colocado em eppendorf de 1,5 mL. Imediatamente foi adicionado 500 µL do reagente Pury Link Plant RNA Reagent™ (Invitrogen) e, as amostras foram levadas ao vórtex até completa homogeneização. Os tubos foram então deixados na posição horizontal em temperatura ambiente por 5 min. Após o tempo de incubação foram centrifugados por 2 minutos a 11400 RPM em temperatura ambiente e o sobrenadante resultante transferido para novos tubos. Foram adicionados 100 µL de NaCl 5m e os tubos levados ao vórtex por 5 segundos. Foram adicionados 300 µL de clorofórmio e misturado exaustivamente. Os tubos foram levados à centrifuga por 10 min a 11400 rpm e 4 °C e a fase superior resultante da centrifugação foi transferida para novos tubos e a ela adicionou-se 500µL de isopropanol, sendo a amostra novamente vortexizada por 5 segundos. Os tubos foram deixados em temperatura ambiente por 10 minutos e logo depois centrifugados por 10 minutos a 11400 RPM e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao tubo 1000 µL de etanol 75%. As amostras foram então levadas a centrifuga por 1 minuto a 11400 rpm e temperatura ambiente. Foi retirado totalmente o etanol 75% dos tubos e adicionados 20 µL de água Milli-Q autoclavada para ressuspender o RNA.

Todo o material utilizado para extração foi tratado com solução diethylpirocarbonato (DEPC) a 0,5% para a inativação de RNases. As soluções utilizadas foram preparadas com água destilada Milli-Q. A qualidade e integridade do RNA extraído foram verificadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e a quantidade mensurada através de espectrofotômetro NANOVEAU®, sendo a imagem captada pelo fotodocumentador EDAS 290 (Kodak®).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o sucesso do isolamento do RNA, é necessário impedir que polissacarídeos e polifenóis, encontrados em diferentes quantidades nos diferentes tecidos liguem-se aos ácidos nucleicos, contribuindo na determinação da quantidade, qualidade e integridade do RNA (Suzuki et al., 2003; Zamboni et al., 2008). Desta forma, esses parâmetros foram avaliados para determinar o método de extração de RNA mais eficiente para café.

Para a avaliação da pureza, são observados valores de absorvância a 280 nm, 260 nm e 230 nm. A relação entre a absorvância A260/A230 indica a contaminação por polissacarídeos ou polifenóis, e o valor da relação A260/A280, indica a contaminação por proteínas (Manning, 1991; Logemann et al., 1997). Dessa maneira, quando esses valores estiverem entre 1,8 e 2,1, respectivamente, indicam a descontaminação das amostras. Com relação à quantidade o ideal seria uma concentração de no mínimo 500 ng/µL (Asif et al., 2006).

Na tabela 1, encontram-se descritas as relações de pureza e as concentrações dos RNAs provenientes de todos os tratamentos testados.

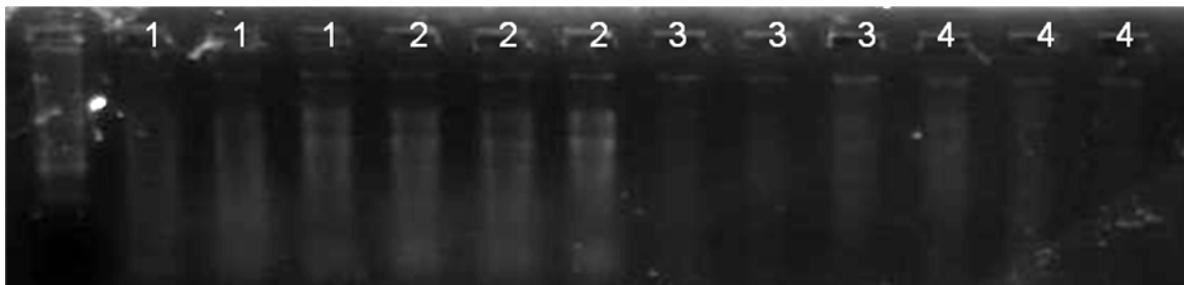
**Tabela 1** – Parâmetros da extração de RNAs isolados de sementes e endospermas de café (*Coffea arabica* L.).

Tratamentos	Pury Link Plant RNA Reagent™ (Invitrogen)		
	Quantidade RNA (ng/μL)	Pureza A260/A280	Pureza A260/A230
T1	349,3	1,8	0,2
T2	146,3	1,7	0,1
T3	109,7	1,8	0,1
T4	84,7	1,5	0,2
T5	143,5	2,7	0,1
T6	226,2	2,2	0,1
T7	116,0	1,7	0,1
T8	36,6	1,2	0,1

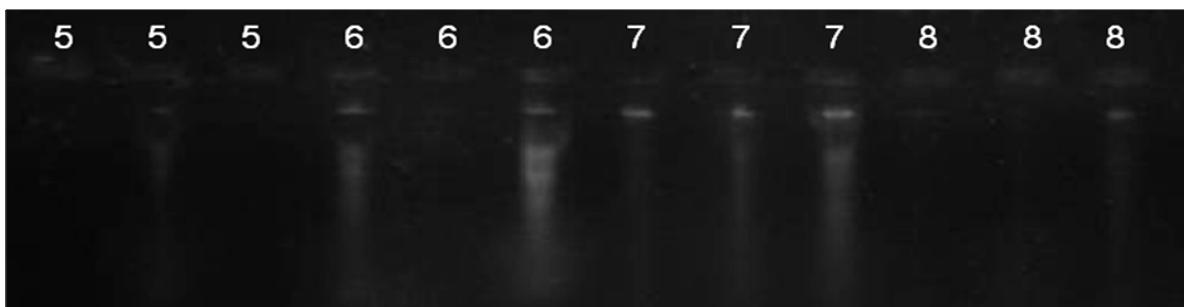
Em geral, a utilização de sementes secas para a extração de RNA apresentou melhor qualidade das amostras com as relações de absorbância ideais, determinando amostras com pouca ou nenhuma contaminação com proteínas e polissacarídeos. Amostras provenientes de endosperma embebido com e sem liofilização obtiveram baixo rendimento e contaminação, possivelmente por compostos fenólicos e proteínas. Esses polissacarídeos formam uma estrutura gelatinosa que precipita durante a extração, afetando tanto a quantidade quanto a qualidade do RNA (Paula et al., 2009).

Segundo Campos et al., (2010) ao utilizar os protocolos que utilizam o reagente Pury Link Plant RNA (Invitrogen), foi verificado níveis aceitáveis de pureza. Porém a quantidade de RNA em cada extração não foi suficiente para estudos posteriores que exigem alta sensibilidade corroborando com os resultados obtidos nessa pesquisa.

Verifica-se nas Figuras 1 e 2, os resultados de integridade e a qualidade, determinando que nos tratamentos que obtiveram uma qualidade satisfatória, tendo, também, apresentaram integridade das bandas 28S e 18S característica do rRNA. Foi possível observar um perfil de expressão nas amostras extraídas de sementes secas e endosperma seco no gel de agarose (Figura 1).



**Figura 1** - Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Tratamentos testados: 1 - Sementes secas; 2 - Endosperma seco; 3 - Semente embebida em água; 4 - Endosperma embebido em água.



**Figura 2** - Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Tratamentos testados: 4 - Endosperma embebido em água; 5 - Semente seca liofilizada; 6 - Endosperma seco liofilizado; 7 - Semente embebida liofilizada; 8 - Endosperma embebido liofilizado.

## CONCLUSÕES

O protocolo testado, utilizando-se sementes de café e endospermas secos e sem liofilização, foi eficiente na obtenção de RNA, em quantidade e com qualidade apropriadas.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FAPEMIG, CAPES e a EMBRAPA pelo apoio financeiro para realização da pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASIF, M.; TRIVEDI, P.; SOLOMOS, T.; TUCKER, M. Isolation of high-quality RNA from apple (*Malus domestica*) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.54, n.15, p.5227-5229, June 2006.
- AZEVEDO, H.; LINO-NETO, T.; TAVARES, R. M. An improved method for high quality RNA isolation from needles of adult maritime pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.21, n.4, p.333-338, 2003.
- BIRTIC, S.; KRANNER, I. Isolation of high-quality from polyphenol- polysaccharide and lipid-rich seeds. **Phytochemical Analysis**, Kew, v.17, n.3, p.144-148, 2006.
- CAMPOS, N. A.; ALVES, J. D.; PORTO, B. N.; SOUZA, K. R. D.; SANTOS, M. O.; SILVEIRA, H. R. O.; MAGALHÃES, M. M. Otimização de protocolos de extração de RNA de raiz de milho (*Zea mays*) visando estudos moleculares de alta sensibilidade. **XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, 2010, Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. CD-Rom.
- CARDILLO, A. B.; GIULIETTI, A. M.; MARCONI, P. L. Analysis and sequencing of h6hmRNA, last enzyme in the tropane alkaloids pathway from anthers and hairy root cultures of *Brugmansia candida* (Solanaceae). **Electronic Journal of Biotechnology**, Cambridge, v.9, n.3, p.196-198, June 2006.
- CORDEIRO, M. C. R.; OLIVEIRA-FILHO, E. C.; MIRANDA, Z. G.; AQUINO, F. G.; SILVA, M. S.; FRAGOSO, R. R.; BARROS, L. M. G.; ALMEIDA, J.; ANDRADE, L. R. M. Estabelecimento de protocolo para extração de RNA de plantas nativas do Brasil. 54º Congresso Brasileiro de Genética. **Resumos...** 2008.
- LOGEMANN, J.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. Improved method for isolation of RNA from plant tissue. **Analytical Biochemistry**, New York, v.163, n.1, p.16-20, May 1987.
- MANNING, K. Isolation of nucleic acid from plants by differential solvent precipitation. **Analytical Biochemistry**, New York, v.195, n.1, p.45-50, May 1991.
- PAULA, M. F. B.; CHAUFON JÚNIOR, A.; PAIVA, L. V.; SÁGIO, S. A.; BARRETO, H. G. Eficiência de protocolos de extração de RNA em diferentes tecidos do cafeeiro. XVIII Congresso de Pós-graduação da UFLA. **Anais...**2009.
- SUZUKI, M.; KETTERLING, M. G.; MCCARTY, D. R. Quantitative statistical analysis of cisregulatory sequences in ABA/VP1- and CBF/DREB1-regulated genes of arabidopsis. **Plant Physiology Review**, Washington, v.139, n.1, p.437-447, Aug. 2005.
- ZAMBONI, A.; PIERANTONI, L.; FRANCESCHI, P. de. Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other woody-plants. **Journal of Biogeosciences and Forestry**, Bologna, v.1, n.1, p.122-125, Aug. 2008.