

EXTRAÇÃO DE RNA DE FRUTOS DE MORANGO EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO COM BROMETO DE CETILTRIMETILAMÔNIO (CTAB)

MÉLANY ANDRADE THIELO¹; SELENE HENSE LILGE²; GABRIELA BEHREND NEITZKE³; GUSTAVO CAMOZZATO⁴; PEDRO REISSER⁵; VANESSA GALLI⁶

¹Departamento de Biotecnologia - CDTec, UFPEL, Pelotas/RS – melanythielo@gmail.com

²Departamento de Biotecnologia - CDTec, UFPEL, Pelotas/RS – selenelilge04@gmail.com

³Departamento de Biotecnologia - CDTec, UFPEL, Pelotas/RS – gustavocamozatto@gmail.com

⁴Departamento de Biotecnologia - CDTec, UFPEL, Pelotas/RS – reisser.pedro@gmail.com

⁵Departamento de Biotecnologia - CDTec, UFPEL, Pelotas/RS – vane.galli@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A maturação de frutos envolve processos de alterações metabólicas e fisiológicas, influenciados por fatores ambientais e regulações internas, que refletem diretamente na mudança da cor, aroma, sabor, textura e outras características que definem a qualidade final dos frutos. A regulação desses processos envolve principalmente o etileno e o ácido abscísico (ABA), e é de acordo com essa regulação que os frutos podem ser divididos entre climatéricos e não climatéricos (JIA et al., 2011; KOU et al., 2021; KOU; WU, 2018).

O morango (*Fragaria x Ananassa*) tem sido amplamente utilizado como modelo para os estudos sobre o mecanismo de desenvolvimento de frutos não climatéricos, com uma crescente identificação de genes relacionados a esse processo (CHEN; QIN; TIAN, 2020; CRIZEL et al., 2020). Os mecanismos moleculares que resultam nas mudanças do desenvolvimento são dependentes da expressão gênica, a qual varia dentre os órgãos da planta (LIU et al., 2014).

Estudos transcriptômicos em plantas enfatizaram o papel fundamental da regulação transcricional em processos complexos de metabolismo, sendo estes essenciais para identificar a função dos genes e o seu envolvimento com as redes regulatórias (GALLI et al., 2019; HU et al., 2018). Para realizar as análises de RNAseq ou de RT-qPCR é fundamental obter uma extração de RNA de qualidade, que mantenha a pureza e a integridade das moléculas, o que é desafiador se tratando do morango, que possui órgãos ricos em metabólitos secundários ativos, como os compostos fenólicos (HAUGENEDER et al., 2018).

O estágio totalmente maduro está entre os órgãos mais difíceis para se obter um RNA de boa qualidade, devido a elevada abundância de pectinas da parede celular acumuladas durante o processo de maturação, juntamente com a elevada concentração de pigmentos fenólicos (PANDIT et al., 2007). Os protocolos comerciais já desenvolvidos para extração são caros ou demorados para uma grande quantidade de amostras. Visto isso, a utilização do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), um detergente não iônico, tem se mostrado uma alternativa simples e econômica para o isolamento de RNA de tecidos com grande quantidade de metabólitos secundários como os presentes no morango (HAZMAN et al., 2020; YU et al., 2012).

Devido a variação da expressão gênica e compostos secundários em diferentes tecidos e em diferentes estádios de desenvolvimento, o objetivo do presente trabalho foi otimizar o protocolo utilizado por MESSIAS et al. (2014), para alcançar uma extração de RNA com maior grau de pureza e integridade em amostras dos estádios verde pequeno e vermelho total, 7 e 28 dias após a antese,

respectivamente, do morango (*Fragaria x Ananassa*), de acordo com a divisão de JIA et al. (2011).

2. METODOLOGIA

Os morangos (*Fragaria x ananassa*) foram obtidos no município do Capão do Leão, RS.

As amostras foram maceradas em moinho de bolas com auxílio de nitrogênio líquido, e armazenadas a -80°C . Posteriormente, 150 mg de tecido macerado de três réplicas biológicas de cada estágio foram transferidos para tubos de 2 mL.

Foi adicionado aos tubos 700 μL de tampão CTAB (2% CTAB, 2% PVP, 2 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA pH 8) com 3% de β -mercaptoetanol e realizada incubação à 65°C por 10 minutos, homogeneizando com vortex ocasionalmente. Foram acrescidos 500 μL de clorofórmio com álcool isoamílico (24:1 v/v), etapa repetida duas vezes, com centrifugação por 20 minutos a $7300 \times g$. Em seguida foi adicionado cloreto de lítio 10 M e feita a precipitação a 4°C por 1. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a $13000 \times g$ a 4°C , e o precipitado foi ressuspensionado com tampão SSTE (1 M NaCl, 0,5% dodecil sulfato sódico, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0) a 65°C . Foram adicionados 200 μL de clorofórmio com álcool isoamílico (24:1 v/v) e centrifugado por 10 minutos a $10000 \times g$, e repetido novamente. Foi adicionado acetato de sódio 3 M, pH 5,5 e etanol absoluto com 1 hora de precipitação a -70°C seguida de centrifugação por 30 minutos a $18000 \times g$. Posteriormente, o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70% com centrifugação por 2 minutos a $18000 \times g$. O precipitado foi ressuspensionado com água Milli-Q autoclavada.

A avaliação dos resultados foi realizada por eletroforese, com gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta (UV), e por espectrofotometria, com o sistema NanoVue, nas absorvâncias A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adaptação do protocolo consistiu em reduzir a quantidade de tampão CTAB na etapa de lise com o objetivo de evitar a duplicação dos tubos, diminuindo as chances de erros de pipetagem e permitindo o uso simultâneo de uma maior quantidade de amostras durante o processo. O resultado obtido através da eletroforese, representado na Figura 1, permitiu a visualização da integridade dos RNAs, indicando que não houve degradação.

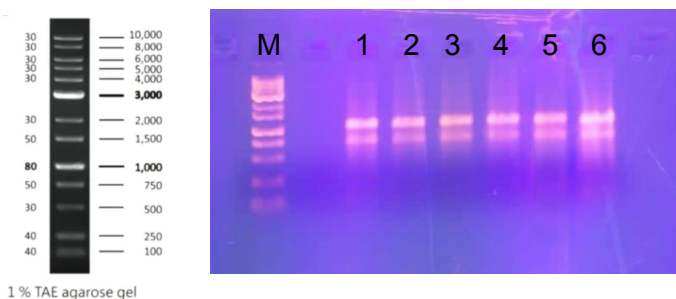


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1%. M- marcador de peso molecular; 1 a 3 - amostras de RNA extraído do estágio verde pequeno; 4 a 5 - amostras de RNA extraído do estágio vermelho total de morango (*Fragaria x ananassa*).

Todas as amostras de RNA apresentaram uma banda mais intensa correspondente a subunidade 28S dos RNAs ribossomais por serem mais

abundantes, seguido de uma banda correspondente à subunidade 18S, o que está de acordo com o esperado.

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que as amostras dos estádios verde pequeno (1, 2, 3) e vermelho total (4, 5, 6) obtiveram valores de absorvância nas razões 260/280 e 260/230 entre 1,9-2,0 e 1,9-2,2, respectivamente, o que indica que não houve contaminação com proteínas ou compostos fenólicos, visto que os valores considerados ideais variam entre 1,8 e 2,2. Portanto, os valores obtidos são adequados para realizar análises posteriores. Além disso, a proposta de adaptação de protocolo para extração de RNA de morango se mostra efetiva.

O CTAB é um detergente não iônico que realiza a lise da célula, liberando os ácidos nucleicos e se complexando a eles, o que possibilita a precipitação dos mesmos (SAMBROOK et al., 2001). Diversos estudos descrevem a sua utilização como método efetivo. O CTAB foi utilizado na extração de ácidos nucleicos de feijão (LOPES et al., 2021), milho (MESSIAS et al., 2014), mirtilo (JAAKOLA et al., 2001) e maçã (ASIF et al., 2006), onde ambos os estudos apresentaram pureza satisfatória nas análises de espectrofotometria.

Tabela 1. Quantificação da extração de RNA total dos estádios verde pequeno e vermelho total do morango (*Fragaria x ananassa*).

Amostra	ng/μL	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1	193	2,053	2,169
2	199	1,980	2,274
3	140	1,993	2,248
4	115	2,018	2,170
5	53	1,927	2,180
6	88	2,000	1,978

4. CONCLUSÕES

A utilização do protocolo de extração com CTAB em volume reduzido se mostrou eficiente na extração de RNA do morango (*Fragaria x ananassa*) nos seus estádios de desenvolvimento verde pequeno e vermelho total, alcançando integridade, quantidade e qualidade satisfatórias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASIF, M. et al. Isolation of High-Quality RNA from Apple (*Malus domestica*) Fruit. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, n. 15, p. 5227–5229, jul. 2006.

CHEN, T.; QIN, G.; TIAN, S. Regulatory network of fruit ripening: current understanding and future challenges. **New Phytologist**, v. 228, n. 4, p. 1219–1226, nov. 2020.

CRIZEL, R. L. et al. Genome-wide identification, and characterization of the CDPK

gene family reveal their involvement in abiotic stress response in *Fragaria x ananassa*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 11040, 6 jul. 2020.

GALLI, V. et al. Transcriptome analysis of strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits under osmotic stresses and identification of genes related to ascorbic acid pathway. **Physiologia Plantarum**, v. 166, n. 4, p. 979–995, ago. 2019.

HAUGENEDER, A. et al. Answering biological questions by analysis of the strawberry metabolome. **Metabolomics**, v. 14, n. 11, p. 145, nov. 2018.

HAZMAN, M. et al. Double lysis: an integrative time-saving method yielding high-quality RNA from strawberry. **J Genet Eng Biotechnol**, v. 18, n. 1, p. 22, dez. 2020.

HU, P. et al. Transcriptome profiling by RNA-Seq reveals differentially expressed genes related to fruit development and ripening characteristics in strawberries (*Fragaria x ananassa*). **PeerJ**, v. 6, p. e4976, 27 jun. 2018.

JAAKOLA, L. et al. Isolation of High Quality RNA from Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Fruit. **MB**, v. 19, n. 2, p. 201–204, 2001.

JIA, H.-F. et al. Absciscic Acid Plays an Important Role in the Regulation of Strawberry Fruit Ripening. **Plant Physiology**, v. 157, n. 1, p. 188–199, 3 set. 2011.

KOU, X. et al. Different regulatory mechanisms of plant hormones in the ripening of climacteric and non-climacteric fruits: a review. **Plant Molecular Biology**, v. 107, n. 6, p. 477–497, dez. 2021.

KOU, X.; WU, M. Characterization of Climacteric and Non-Climacteric Fruit Ripening. Em: GUO, Y. (Ed.). **Plant Senescence**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2018. v. 1744p. 89–102.

LIU, Y. et al. Genome-wide comparison of microRNAs and their targeted transcripts among leaf, flower and fruit of sweet orange. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 695, dez. 2014.

LOPES, J. R. D. S. et al. Comparação de protocolos de extração de DNA em Feijão-Fava (*Phaseolus lunatus* L.)/ Comparison Of DNA Extraction Protocols In Fava-Beans (*Phaseolus lunatus* L.). **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 8, p. 77786–77806, 7 ago. 2021.

MESSIAS, R. D. S. et al. Isolation of high-quality RNA from grains os different maize varieties. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 7, p. 697–707, out. 2014.

PANDIT, S. S. et al. A quick method for isolating rna from raw and ripe fleshy fruits as well as for co-isolating DNA and RNA from polysaccharide and polyphenol-rich leaf tissues. **Journal of Plant Biology**, v. 50, n. 1, p. 60–64, fev. 2007.

SAMBROOK, J. et al. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

YU, D. et al. Comparison and Improvement of Different Methods of RNA Isolation from Strawberry (*Fragria x ananassa*). **JAS**, v. 4, n. 7, p. p51, maio 2012.