



Realização:



Apoio:

**XVII CIC
X ENPOS**Conhecimento sem fronteiras
XVII Congresso de Iniciação Científica
X Encontro de Pós-Graduação
11, 12, 13 e 14 de novembro de 2008

OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE RT-PCR PARA FRUTOS DE GUABIROBA

Autor(es): DOS SANTOS, Railson Schreinert; SEVERO, Joseana; HAAS, Lírío Inácio Reckziegel; SILVA, Jorge Adolfo; ROMBALDI, Cesar Valmor

Apresentador: Railson Schreinert dos Santos

Orientador: Cesar Valmor Rombaldi

Revisor 1: Luciano Lucchetta

Revisor 2: Miriane Lucas Azevedo

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Resumo:

A guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg. var. *xanthocarpa*) é uma frutífera nativa da América do Sul, com predominância na Região Sul do Brasil. Os frutos são ricos em polissacarídeos e compostos fenólicos, o que, em geral, dificulta a extração de RNAs e a obtenção de bons produtos de amplificação com reprodutibilidade. Para a realização de ensaios moleculares, como RT-PCR ou Real-Time PCR, esse pressuposto é obrigatório. Para isso, utilizou-se o gene ribossomal 18S, que tem expressão constitutiva em eucariotos, e que pode ser utilizado como controle positivo na amplificação de outros genes. Este trabalho objetivou otimizar a extração e a amplificação do gene 18S para a realização da técnica de RT-PCR em frutos de guabiroba. Os frutos foram colhidos em estágio de maturação comercial, em novembro de 2007, no município de Pelotas, e mantidos a -80°C até o momento das avaliações. As extrações de RNAs foram realizadas utilizando o reagente Pure Link™ Plant RNA Reagent (Invitrogen™) indicado para tecidos vegetais. Os produtos das extrações foram analisados por espectrofotometria (Ultrospect™ 2000 Pharmacia) – absorvância a 260nm e 280nm - e em gel de agarose a 1% (corado com brometo de etídio) visualizado em transluminador-UV. Os extratos de RNAs obtidos apresentaram relação A260/A280, entre 1,9 e 2,1 e concentração que variou de 2,5 a 4,6 $\mu\text{g/mL}$. Verificou-se, no gel, a presença de bandas de RNAs. Os RNAs passaram por digestão com DNase e foram submetidos à síntese de cDNA, utilizando-se o Kit Superscript First Strand Synthesis™ (Invitrogen™), seguida de PCR com primers do gene 18S, forward: 5'TGACGGAGAATT3' e reverse: 3'AGGGTTCG5' ao longo de 35 ciclos: desnaturação inicial $95^{\circ}\text{C}/1:50\text{min.}$ e 35 ciclos [$95^{\circ}\text{C}/1:10\text{min.}; 53^{\circ}\text{C}/1\text{min.}; 72^{\circ}\text{C}/1:45\text{min.}$] extensão final a $72^{\circ}\text{C}/10\text{min.}$ Ao se analisar o gel, verificou-se amplificação de fragmentos do gene 18S com aproximadamente 400pb, com excelente reprodutibilidade. Este resultado permite concluir que o RNA obtido pelo método Pure Link™, submetido à RT-PCR, nas condições estabelecidas de amplificação, é potencialmente adequado para estudos de expressão transcricional em *C. xanthocarpa* var. *Xanthocarpa*. No entanto, há necessidade de validá-lo para outros genes de interesse. Apoio financeiro e bolsas: CNPq e CAPES.