

**Metodologias de Extração e
Avaliação Semi Quantitativa da
Expressão de Genes de Metabolismo
Secundário do Milho (*Zea mays L.*)**



ISSN 1981-5980

Setembro, 2010

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Clima Temperado

Ministério da agricultura, Pecuária e abastecimento

versão

ON LINE

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 117

Metodologias de Extração e Avaliação Semi Quantitativa da Expressão de Genes de Meta- bolismo Secundário do Milho (*Zea mays* L.)

Rafael da Silva Messias

Vanessa Galli

Sérgio Delmar dos Anjos e Silva

Manoel Artigas Schirmer

Clenio Nailto Pillon

Pelotas, RS

2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado

Endereço: BR 392 Km 78

Caixa Postal 403, CEP 96001-970 - Pelotas, RS

Fone: (53) 3275-8199

Fax: (53) 3275-8219 - 3275-8221

Home page: www.cpact.embrapa.br

E-mail: sac@cpact.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Ariano Martins de Magalhães Júnior

Secretária-Executiva: Joseane Mary Lopes Garcia

Membros: Márcia Vizzotto, Ana Paula Schneid Afonso, Giovani Theisen, Luis Antônio Suita de Castro, Flávio Luiz Carpena Carvalho, Christiane Rodrigues Congro Bertoldi, Regina das Graças Vasconcelos dos Santos.

Suplentes: Isabel Helena Vernetti Azambuja, Beatriz Marti Emygdio

Supervisão editorial: Antônio Heberlê

Revisão de texto: Antônio Heberlê

Normalização bibliográfica: Graciela Olivella Oliveira

Editoração eletrônica e capa: Manuela Doerr (estagiária)

Foto da capa: Carlos Augusto Posser Silveira

1ª edição

1ª impressão (2010): 30 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Metodologias de extração e avaliação semi quantitativa da expressão de genes de metabolismo secundário do milho (*Zea mays* L.) / Rafael da Silva Messias... [et al.]. -- Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 25 - p. : il. ; 21 cm . -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Clima Temperado, ISSN 1981-5980 ; 117)

1. Milho. 2. Grão. 3. Gene. I. Messias, Rafael da Silva. II. Título. III. Série.

CDD 633.15

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	8
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	15
Conclusões	21
Referências	22

Metodologias de Extração e Avaliação Semi Quantitativa da Expressão de Genes de Metabolismo Secundário do Milho (*Zea mays* L.)

*Rafael da Silva Messias*¹

*Vanessa Galli*²

*Sérgio Delmar dos Anjos e Silva*³

*Manoel Artigas Schirmer*⁴

*Clenio Nailto Pillon*⁵

RESUMO

A importância do milho como uma das três maiores culturas agrícolas mundiais, juntamente com seus diversos compostos de interesse para alimentação, como os carotenóides luteína e zeaxantina, somados à divulgação do sequenciamento de seu genoma completo, aumenta os interesses em estudos de expressão gênica que possibilitem um maior entendimento dos locais e processos de síntese dos diversos compostos de interesse. O gene *psy1* codifica para a fitoenol sintase (PSY), primeira enzima na rota de síntese de carotenóides, sendo o gene *lut1* diretamente relacionado à enzima carotenóide ϵ -hidroxilase (CHYE), responsável pela síntese de luteína. O estudo da expressão destes genes em variedades crioulas de milho, as quais apresentam importantes fontes de variabilidade genética, podem contribuir no melhoramento da qualidade funcional desses grãos. Por isto, neste estudo foram comparados diferentes métodos de extração de RNA em grãos de milho para seleção do método mais adequado, sendo, subsequentemente, avaliada a expressão dos genes *psy1* e *lut1* por PCR. Os resultados obtidos indicam que o protocolo utilizando CTAB permite a obtenção de RNAs com melhor qualidade e em concentrações adequadas para estudos de expressão gênica. A análise transcriptômica mostrou que, para todas as sete variedades de milho estudadas, ocorre a expressão de ambos os genes, havendo, no entanto, uma predominância do *lut1*

¹ Eng. de Alimentos, Doutorando em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pesquisador visitante – Convênio da Petrobras SIX/Embrapa Clima Temperado/FAPEG, Pelotas, RS, rafael.embrapa@yahoo.com.br

² Bióloga, Mestranda em Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, UFPel, Pelotas, RS, vane.galli@bol.com.br

³ Engenheiro Agrônomo, Dr. em Melhoramento Vegetal, pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, sergio@cpact.embrapa.br

⁴ Químico, Dr. em Bioquímica, prof. adjunto da UFPel, Pelotas, RS, schirmer@ufpel.tche.br

⁵ Eng. Agrônomo, Dr. em Ciência do solo, pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, pillon@cpact.embrapa.br

e uma diferenciação na expressão deste diretamente correlacionada à maior coloração amarela apresentada pelos grãos.

Termos para indexação: *Zea mays*, extração de RNA, grãos de milho, expressão gênica, carotenóides.

Extraction RNA Methodologies and Semi Quantitative Gene Expression Evaluation of Maize Secondary Metabolism

ABSTRACT

The importance of maize as one of the three major world-wide agricultural crops, together with its diverse compounds of interest for human nutrition, like lutein and zeaxanthin carotenoids, added to the publication of its genome sequence, increases the interests in gene expression studies for a better understanding of the locations and processes of interest compounds syntheses. *Psy1* gene codifies for phytoene synthase (PSY), the first enzyme in the carotenoid synthesis pathway, and the *lut1* gene codifies for carotenoid ϵ -hydroxylase (CHYE), directly responsible for the lutein synthesis. The study of these genes in maize landrace varieties, which are important sources of genetic variability, can contribute to improve crop nutritional and functional quality. Because of this, in the present study RNA extraction methodologies were compared in corn grains of seven varieties to select the most adequate one, and subsequently the expression of genes from the carotenoid metabolic route by PCR were evaluated. The results indicate that the protocol based on CTAB allows extraction of better quality RNA and is adequate to studies of gene expression. Transcriptomics analysis showed that, for all seven maize varieties both genes are expressed, however, *lut1* predominates, and a differentiation in its expression is directly correlated to a yellow coloring of the grains.

Index terms: *Zea mays*, RNA extraction, maize grains, gene expression, carotenoids.

INTRODUÇÃO

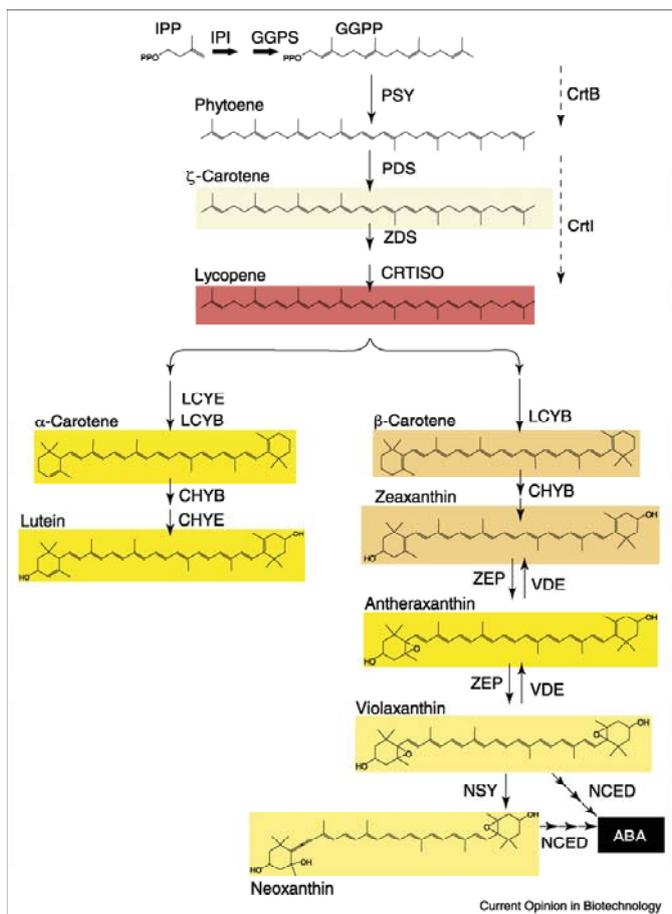
O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho sendo que a cultura ocupou, na safra 2008/2009, uma área de 14,2 milhões de hectares com uma produção de 51,9 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2009). Além do tradicional uso como ração animal, o milho é consumido em uma variedade de formas, servindo de insumo para produção de pelo menos uma centena de produtos (PAES, 2006).

Os carotenóides são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, no processo de fotossíntese, na proteção contra danos fotooxidativos e como precursores do ácido abscísico. Além disso, a presença de carotenóides no endosperma de grãos acrescenta valor funcional na dieta atuando como precursores de vitamina A e de compostos retinóicos essenciais (GALLAGHER et al., 2004). A luteína, em específico, é um dos carotenóides encontrados majoritariamente no milho (OLIVEIRA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2007), tendo ganhado destaque devido a sua essencialidade e associação com a saúde ocular (LOANE et al., 2008), atuando na proteção dos olhos contra os radicais livres e os comprimentos de luz azul do ultravioleta próximo (STAHL; SIES, 2005).

Porém, apesar das investigações em curso, e de novas descobertas que aumentam o entendimento sobre os processos metabólicos de síntese e acúmulo de carotenóides (LI et al., 2007), existem ainda muitas lacunas a respeito da expressão de enzimas relacionadas e dos locais em que estas atuam. Como resultado, os esforços para implantar melhorias no conteúdo ou composição de carotenóides, quer por cruzamento ou engenharia genética, tem apresentado limitações (GALLAGHER et al., 2004).

A rota metabólica simplificada da biossíntese de carotenóides (Figura

1) começa com a formação de uma cadeia de quarenta carbonos, um passo mediado pela phytoene syntase (PSY), a qual por ser a primeira enzima desta rota, é de vital importância na síntese de carotenóides. No milho são encontrados três diferentes cópias do gene que codifica para essa enzima, sendo que a carotenogênese no endosperma está relacionada predominantemente com o gene *Psy1* (GALLAGHER et al., 2004; PALLAISA et al., 2003). O gene da *lut1* codifica diretamente a enzima carotenóide β -hidroxilase (CHYE), responsável pela síntese da luteína, principal carotenóide encontrado em grãos de milho. Informações acerca da expressão destes genes em variedades crioulas de milho, as quais apresentam grandes diferenças genéticas que se relacionam diretamente aos seus compostos com capacidade antioxidante (ABDEL-AAL et al., 2006), podem contribuir no desenvolvimento de estratégias de melhoramento e no incremento da qualidade funcional da cultura.



Fonte: Tanaka e Ohmiya (2008).

Figura 1. Rota metabólica de biossíntese de carotenóides. As enzimas foram abreviadas como segue: CrtB, phytoeno sintase bacteriana; CrtI, phytoeno desnaturase bacteriana; DXPS, 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase; DXR, 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato redutoisomerase; IPI, isopentenil pirofosfato isomerase; GGDP, geranylgeranyl difosfato sintase; PSY, phytoeno sintase; PDS, phytoeno desnaturase; ZDS, ζ -caroteno desnaturase; LCYB, licopeno b-ciclase; LCYE, licopeno ϵ -ciclase; CHYB, β -anel hidroxilase; CHYE, ϵ -anel hidroxilase; ZEP, zeaxantina epoxidase; VDE, violaxantina de-epoxidase; CRTISO, carotenóide isomerase; NSY, neoxantina sintase; NCED, 9-cis-epoxicarotenóide dioxigenase. As setas em vermelho indicam as enzimas cujos genes foram utilizados na análise da expressão.

Áreas de pesquisa envolvendo a bioquímica e a biologia molecular possibilitam investigar como o metabolismo de plantas como o milho, com conteúdos complexos e diversificados de compostos bioativos, são afetadas por estes compostos através da expressão/repressão de genes (FARDET et al., 2008; REZZI et al., 2007), o que irá fornecer novas informações sobre os benefícios à saúde proporcionados pelo consumo deste cereal.

Para tanto, a quantidade e a qualidade do RNA extraído são características fundamentais para a avaliação de estudos de expressão gênica, uma vez que a utilização de RNA de baixa qualidade pode comprometer a confiabilidade dos resultados, os quais são dispendiosos, laboriosos e de alto custo (BUSTIN et al., 2005; FLEIGE; PFAFFL, 2006; MADABUSI et al., 2006). Devido a estes motivos, precauções metodológicas estritas, para o tecido do qual o RNA é extraído, são necessárias para obtenção de RNA de alta qualidade (WANG, 2004).

A extração de RNA do grão integral é notoriamente dificultosa devido à relação deste com a matriz amilo-protéica do endosperma e da alta concentração de fibras na fração de aleurona, o que além de comprometer a separação (ZENG; YANG, 2002), pode ocasionar a co-precipitação de polissacarídeos, proteínas e algumas vezes polifenóis, os quais se encontram em grande quantidade nestes tecidos (BELEFANT-MILLER et al., 2008; DAOHONG et al., 2004; TAI et al., 2004).

Desta forma, objetivou-se neste trabalho comparar diferentes métodos de extração de RNA total em grãos de milho, bem como avaliar a expressão de genes relacionados ao metabolismo secundário da planta.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo das variedades de milho

As sete variedades crioulas avaliadas foram dispostas a campo em parcelas de 10 m e 4 linhas com três repetições cada, e polinizadas artificialmente, sendo estas: Amarelão, Argentino, Cabo roxo, Dente de ouro, Dente de ouro roxo, Farináceo amarelo e Sertanejo. A cultivar de milho híbrido 30F53 (Pionner®) foi utilizada para avaliação das metodologias de extração de RNA.

Coleta e armazenamento das amostras

Após 24 dias da polinização, com os grãos plenamente formados e com umidade entre 72 e 80%, foram coletadas cinco espigas de milho de cada variedade das linhas centrais de cada bloco. Os grãos debulhados e homogeneizados de cada variedade para as três repetições foram macerados utilizando gral e pistilo com auxílio de nitrogênio líquido e imediatamente armazenados a -70°C até o momento das análises.

Protocolos de extração de RNA avaliados

Diferentes protocolos de extração de RNA foram avaliados utilizando, para cada um, as triplicatas amostrais da cultivar Pionner™ 30F53 visando a seleção e otimização de um protocolo adequado para extração de RNA das cultivares crioulas avaliadas neste estudo. Todos os materiais foram previamente tratados com inibidor de RNase (RNase Away – Invitrogen™).

CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide)

O protocolo de extração de RNA total de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) proposto por Jaakola et al. (2001) foi adaptado para amostras de grãos de milho. Foram adicionados 1,25mL de solução de extração (2% CTAB - hexadecyltrimethylammonium bromide, 2%PVP - polyvinylpyrrolidone, 2M NaCl, 100mM Tris-HCl pH8,0, 25mM EDTA.e 3,3% β -mercaptoetanol), pré-aquecida a 65°C , em tubos de microcentrifuga contendo 100mg de amostra moída, seguido de uma incubação a 65°C

por 3min. Posteriormente, foram realizadas duas extrações subseqüentes com 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), homogeneizado por inversão durante 5min e separadas as fases por centrifugação a $7300 \times g$ por 20min. O sobrenadante foi coletado e precipitado com a adição de $\frac{1}{4}$ de 10M LiCl, overnight a -20°C . Após este período as amostras foram centrifugadas a $18000 \times g$ por 30min a 4°C . O pellet foi dissolvido a 65°C com $70\mu\text{L}$ de tampão SSTE (1M NaCl, 0,5% SDS, 10mM Tris-HCl pH8,0, 1mM EDTA pH8,0), sendo posteriormente extraído duas vezes, em seqüência, com 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O sobrenadante foi então precipitado com $364\mu\text{L}$ de etanol absoluto e $18\mu\text{L}$ de acetato de sódio 3M pH 5,5, durante 1h a -70°C , seguido de centrifugação a $18000 \times g$ por 20min a 4°C . O pellet foi lavado duas vezes com etanol 70% e ressuspendido em água tratada com DEPC e acrescida de 0,1mM de EDTA.

Protocolos utilizando reagentes comerciais

Dois protocolos utilizando reagentes de extração comerciais foram testados, sendo utilizados $500\mu\text{L}$ do tampão de extração para o protocolo PureLink™ Plant RNA Reagent® (Invitrogen™) e 1mL para o protocolo TRIzol Reagent® (Invitrogen™), para cada 100mg de amostra, conforme instruções do fabricante.

Protocolos utilizando kits comerciais

Três kits comerciais de extração de RNA foram avaliados: NucleoSpin® RNA Clean-up (Macherey-Nagel™), o qual é recomendado para extração de RNA de células em cultura; Total RNA purification from plant (Macherey-Nagel™) e Total RNA Extraction Kit [Mini] – Plant Tissues (Real Genomics™), os quais são específicos para uso com tecidos de plantas, conforme manual dos fabricantes.

Avaliação da quantidade e qualidade de RNA extraído

A qualidade e a pureza do RNA extraído foram mensuradas por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm, bem como por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de

etídeo, com aplicação de $6\mu\text{L}$ de amostra. A leitura espectrofotométrica é usualmente utilizada para verificação da pureza de amostras de RNA, onde a razão $260\text{nm}/280\text{nm} > 1,8$ e $< 2,2$ é considerada a ideal. A concentração foi calculada utilizando a fórmula: $[\text{RNA}] = 40\text{ug/mL} \times \text{fator de diluição} \times A_{260}$ (SAMBROOK et al., 1989).

Desenho dos iniciadores

Os iniciadores para a sequência do gene da actina, utilizado para normalizar a expressão dos genes estudados frente a um gene endógeno, foram desenhados a partir da sequência deste gene de milho obtida no GenBank (J01238.1). O iniciador forward utilizado foi: 5'-CATGGAGA-ACTGGCATCACACCTT-3' e o reverse: 5'-CTGCGTCATTTTCTCTC-TGTTGGC-3', gerando um amplicon de 120 pb. Os demais iniciadores foram selecionados a partir da rota de biossíntese de carotenóides (Figura 1) e visam à amplificação dos genes que codificam para a enzima phytoeno synthase (*psy1*) e carotenóide ϵ -hidroxilase (*lut1*). Os iniciadores da *psy1*, desenhados a partir do acesso NM_001065182, foram: forward 5'-TGAACCTTG CAGAGGCAGGG-3' e reverse 5'-ACAACGC-CATTGAAGATGTCC-3', gerando um amplicon de 81 pb. Os iniciadores da *lut1*, desenhados a partir do acesso AK065689.1, foram: forward 5'-TCTCGGTGATGGTTGACAGAGT-3' e reverse 5'-TGCCACTTAA-AGCAGATGTCTCA-3', gerando um amplicon de 51 pb. Todos foram desenhados com auxílio do programa Vector NTI 11 (Figura 2).

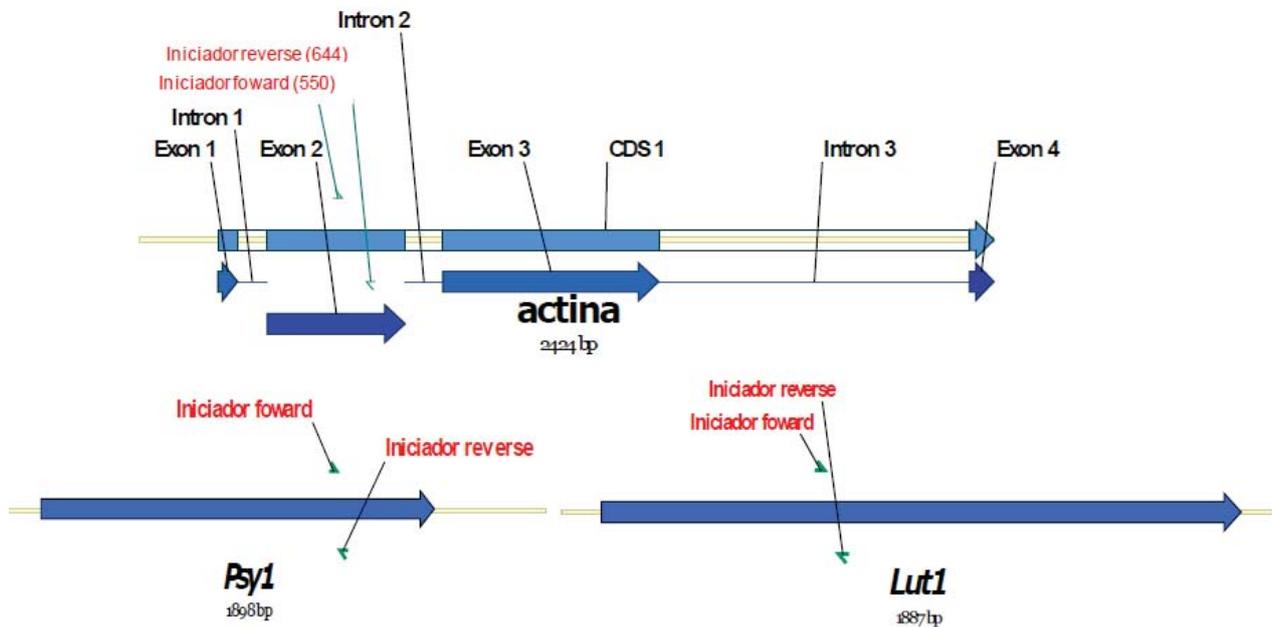


Figura 2. Esquema representativo do desenho dos iniciadores forward e reverse dos genes actina, lut1 e psy1.

Digestão com DNase

Em todas as metodologias avaliadas, 75ng de RNA total de cada amostra gerada foram digeridas com 1U DNase e 1 μ L 10 \times DNase I Reaction Buffer. Após 15min de incubação a 25 $^{\circ}$ C, 1 μ L de EDTA 25mM foi adicionado à reação e incubado por 5min a 65 $^{\circ}$ C.

RT-PCR

O RNA digerido com DNase foi utilizado para transcrição reversa utilizando a enzima M-MLV (conforme fabricante InvitrogenTM). Os cDNAs obtidos foram amplificados em PCR semiquantitativa (termociclador Gene Amp 9700, Applied BiosystemsTM) conforme segue: volume final de 25 μ L contendo 1 μ L cDNA, 0,2 mM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 10 pmol de cada iniciador, 2U de Taq DNA polimerase e 1 \times tampão da enzima, nas condições de 2min a 95 $^{\circ}$ C seguido por 35 ciclos de 60seg a 95 $^{\circ}$ C, 6seg a 60 $^{\circ}$ C e 60seg a 72 $^{\circ}$ C e a extensão final de 7min a 72 $^{\circ}$ C. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 3%, corado em brometo de etídeo e visualizado em transluminador UV (Vilber Lourmat).

Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Empregaram-se o teste F na análise de variância e o teste de Tukey na comparação de médias de tratamento, ambos ao nível de 5% de significância. Os cálculos foram realizado com auxílio do software SAS 9.1.3 system for windows (SAS Institute Inc., USA) .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A divulgação de inúmeros estudos mostrando os efeitos benéficos à saúde proporcionados pela ingestão de compostos funcionais, entre os quais a luteína, presente majoritariamente nos grãos de milho, tem estimulado cada vez mais a avaliação das diferenças de expressão gênica em diversas culturas e situações, visando alcançar novos níveis de entendimento acerca de mecanismos regulatórios e rotas bioquímicas, permitindo assim a obtenção de alimentos com maior qualidade nutricional com foco na manutenção da saúde (LI et al., 2008a; VALLABHANEN; WURTZEL, 2009).

A otimização da extração de RNA é condição fundamental para geração de resultados confiáveis em estudos de expressão gênica. Devido à instabilidade inerente do RNA e à ubiquidade de ribonucleases, precauções metodológicas estritas foram necessárias durante a extração, tais como manutenção da amostra a temperaturas baixas e utilização de inibidor de RNase em todos materiais manipulados durante o processo de extração. Além disso, carboidratos e proteínas presentes em grandes quantidades nestes grãos podem co-precipitar com o RNA devido as suas propriedades físico-químicas similares, afetando a quantidade e a qualidade das amostras (FLEIGE; PFAFFL, 2006; MADABUSI et al., 2006). Por este motivo, diferentes metodologias de extração de RNA foram comparadas previamente às avaliações de expressão gênica.

O extrator comercial TRIzol® Reagent apresentou desvio padrão bastan-

te alto para as concentrações obtidas, com um coeficiente de variação de 35,25%, possivelmente devido à presença de carboidratos que resultaram em um pellet insolúvel em água, dificultando a homogeneização das amostras, e de pigmentos os quais possivelmente alteraram a leitura espectrofotométrica. Além disso, a qualidade obtida com esta metodologia foi considerada baixa (Tabela 1).

O PureLink Plant RNA, apesar de possibilitar a obtenção de rendimento de RNA extraído significativamente superior às demais metodologias, com coeficiente de variação de 8,13%, o mesmo apresenta qualidade limitada (razão DO260/280 inferior a 1,8), indicando possíveis contaminações com proteínas (Tabela 1).

Tabela 1. Pureza e rendimento do RNA extraído com as diferentes metodologias testadas. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2009.

Metodologia de extração de RNA	Pureza do RNA	RNA
	(Abs ₂₆₀ /Abs ₂₈₀)	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ matéria fresca)
PureLink Plant RNA	1,54 \pm 0,13	803,04 \pm 65,33 a
TRIzol [®] Reagent	1,3 \pm 0,2	213,00 \pm 7,51 d
Total RNA purification from plant	1,32 \pm 0,01	90,00 \pm 1,41 e
NucleoSpin [®] RNA Clean-up	N.E.	N.E.
Total RNA Extraction Kit [Mini] – Plant Tissues	N.E.	N.E.
Método CTAB	1,85 \pm 0,03	203,40 \pm 1,44 cd

Letras diferentes para concentração do RNA indicam diferença significativa ($p < 0,05$). N.E. – RNA não passível de extração. A pureza e a concentração de RNA estão expressas em média \pm desvio padrão.

Dos kits para extração de RNA testados, apenas Total RNA purification from plant possibilitou a obtenção de RNA, uma vez que as demais não possibilitaram a visualização em gel de agarose (dado não publicado) e a quantificação por espectrofotometria. Porém, o rendimento e a qualidade do RNA extraído com este kit foram baixos (Tabela 1), sendo que este último parâmetro está relacionado com interferências negativamen-

te nas análises posteriores de expressão gênica (ROSSEN et al., 1992).

O método com CTAB proposto por Jaakola et al. (2001) permite a separação dos açúcares presentes nas amostras utilizando precipitação com cloreto de lítio, seguido de centrifugação. Além da correta identificação da proporção das bandas correspondentes ao 18S e 28S rRNA na corrida eletroforética (razão 28S:18S aproximadamente 2:1) (dados não publicados), observada no RNA extraído com este método, com algumas alterações, apesar de ter resultado em um rendimento inferior a algumas das metodologias, apresentou coeficiente de variação de 7,08% e possibilitou a obtenção de RNA com alta qualidade (Tabela 1). Estas alterações incluíram, principalmente, a redução no volume inicial de amostra necessária para obtenção de um rendimento adequado para análises de expressão gênica e o uso de acetato de sódio, o qual, adicionado juntamente ao etanol, permitiu uma melhor precipitação final do RNA, pelo aumento na concentração de sal. De forma complementar, a redução de etapas de centrifugação, lavagens e soluções utilizadas, tornou o método menos laborioso. Desta forma, baseado especialmente nos resultados de qualidade obtidos, esta metodologia foi utilizada para extração de RNA das variedades crioulas de milho, tendo permitido a obtenção, em todas as amostras, de RNA de alta qualidade, com razão (Abs260/Abs280nm) entre 1,8 e 2,2 (Figura 3), e em quantidades suficientes para análise da expressão gênica ($1,91 \pm 0,11 \mu\text{g/g}$ de amostra - expressos em média \pm desvio padrão).

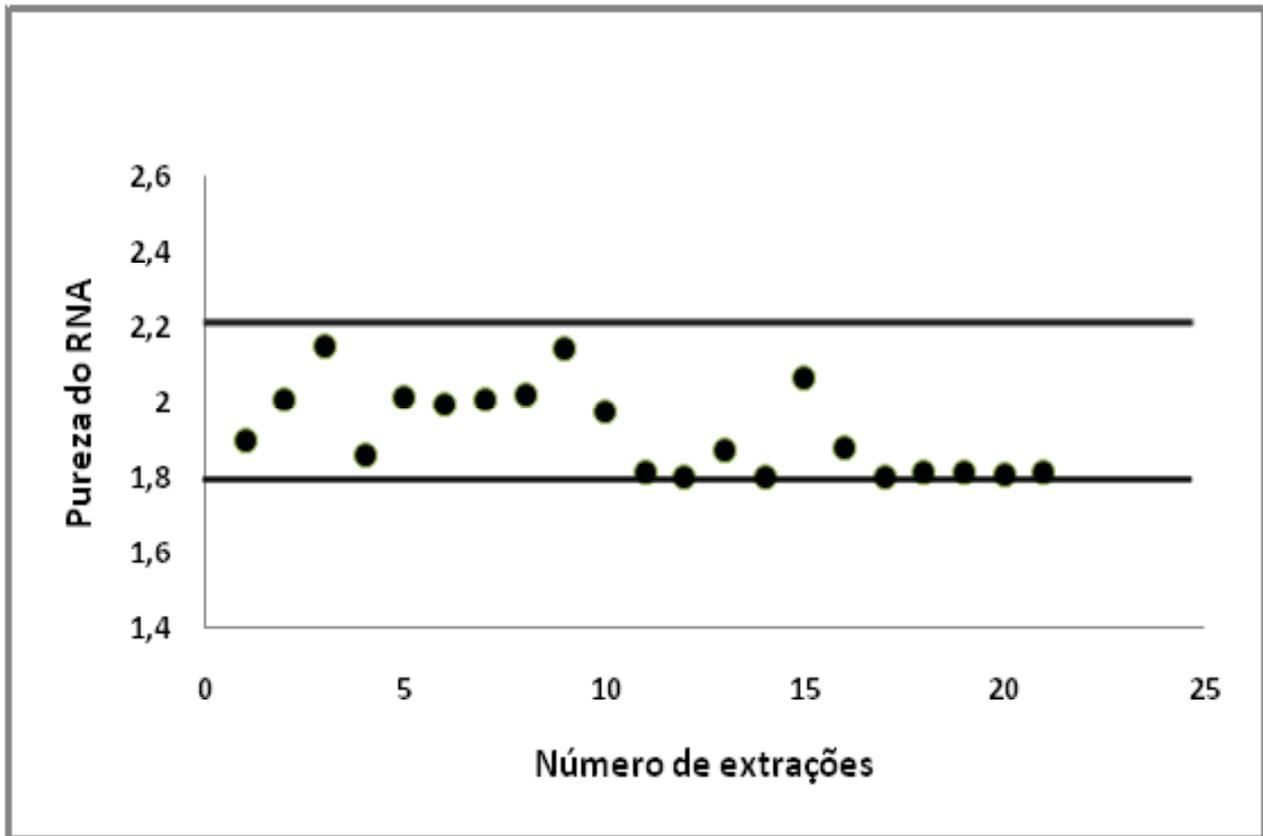


Figura 3. Razão Abs260/Abs280nm para 21 extrações de RNA total obtida a partir de diferentes amostras de grãos de milho pelo método CTAB modificado.

Após otimização das condições de extração de RNA, os mesmos foram utilizados para síntese de cDNA e avaliação da expressão dos genes em estudo através da técnica de RT-PCR semi-quantitativa. A reprodutibilidade da expressão do gene da actina entre as amostras foi confirmada (Figura 4a), permitindo sua utilização como gene endógeno e viabilizando a utilização destas amostras para avaliação dos transcritos dos genes *psy1* e *lut1*. A utilização dos conjuntos de iniciadores desenhados para este estudo, nas condições de temperatura de anelamento e concentração dos iniciadores avaliadas, propiciou o aparecimento de apenas uma banda específica de aproximadamente 80 pb para o gene *lut1* e de 50 pb para o gene *psy1* (Figura 4b e 4c, respectivamente).

Descobertas recentes mostram que o gene *psy1* apresenta-se polimórfico em diferentes variedades de milho (PALAISA et al., 2003). Porém, esta diferença não necessariamente se reflete no nível de expressão

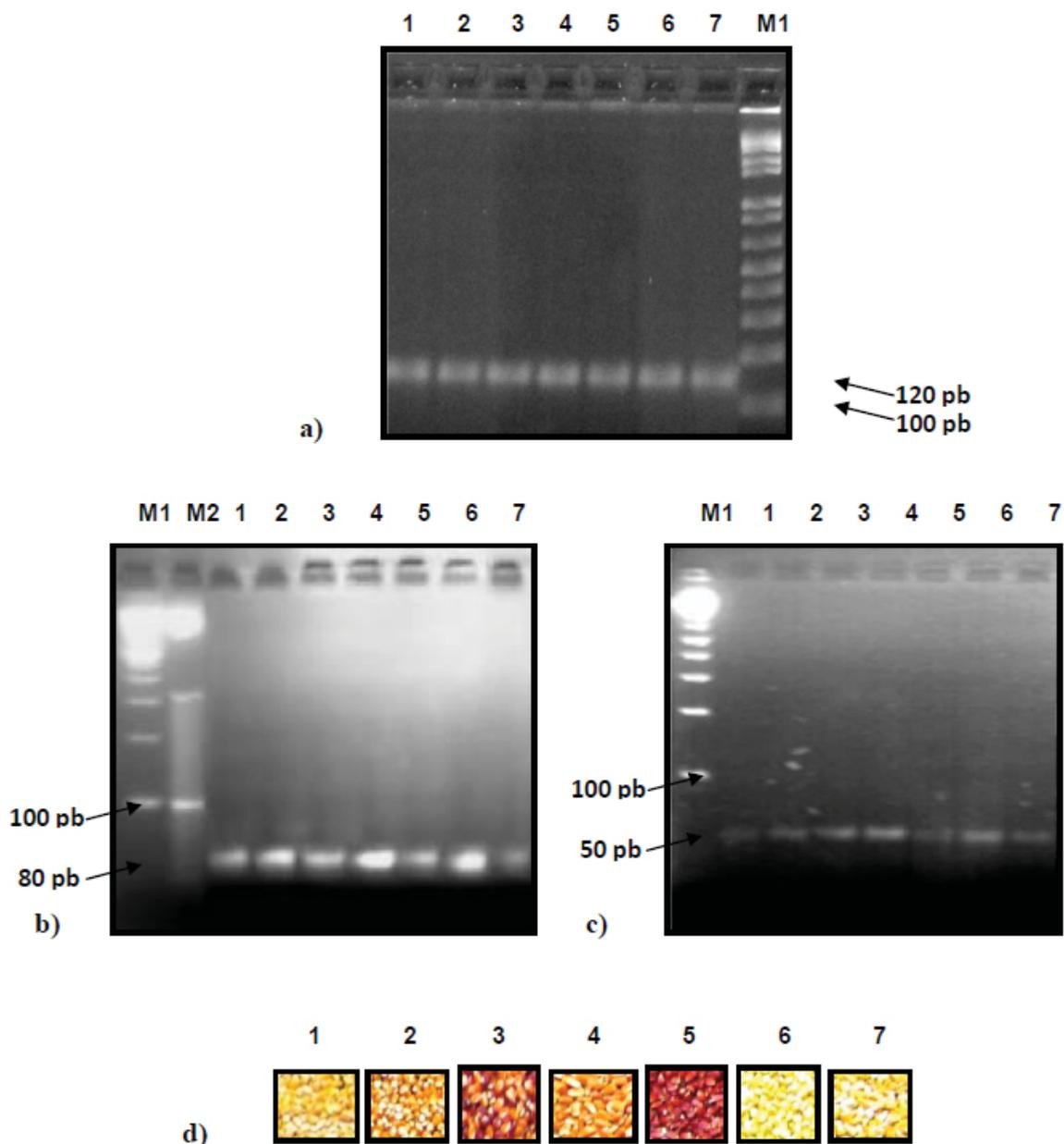
gênica. Como exemplo, o arroz apresenta este mesmo gene em seu genoma, porém sem expressá-lo, não havendo, portanto, acúmulo de carotenóides em seu endosperma (GALLAGHER et al., 2004). Da mesma forma, observou-se que este gene encontra-se reprimido em variedades brancas de milho devido à presença nestas de um alelo *psy1* com perda de função (ALURU et al., 2008).

Neste trabalho, foi possível observar um nível basal da expressão do gene *psy1* em todas as variedades avaliadas, fato esperado devido a PSY ser precursora do ácido abscísico, o qual é necessário para a dormência embriológica das sementes, regulando o desenvolvimento da planta, do embrião e a resposta ao estresse (LI et al., 2008b). Esta expressão foi levemente maior nas variedades amarelão e farináceo amarelo, seguido da variedade cabo roxo (Figura 4) a qual apresenta uma mescla de grãos roxos e amarelos, possivelmente com expressão de licopeno e/ou antocianinas, corroborando os dados apresentados por Aluru et al. (2008), os quais comentam o fato de as maiores expressões deste gene estarem relacionadas à intensidade da coloração amarela.

Apesar da rota metabólica se dividir em dois ramos a partir da síntese de licopeno, decorrente da atuação da PSY, e estando a luteína em apenas um destes (Figura 1), os resultados de ambos os genes mostraram correlacionar-se: expressão maior da PSY nas variedades cabo roxo, amarelão e farináceo amarelo, acarreta em uma expressão maior da LUT nestas cultivares. Porém, na variedade Argentino, também foi observada uma maior expressão da *lut1*, apesar de não ter se destacado quanto à expressão do gene *psy1*, mostrando, possivelmente, neste caso, um maior direcionamento do licopeno para a síntese de luteína (Figura 4).

Observou-se, também, que a utilização de grãos coletados aos 24 dias após a polinização, acarretou maiores expressões do gene *lut1* em

relação ao *psy1* (Figura 4), permitindo inferir que, nesta etapa final de formação do grão, a maior expressão gênica encontra-se relacionada ao acúmulo de carotenóides de final de rota metabólica, os quais têm a função de proteger as membranas da peroxidação lipídica (LI et al., 2009).



Fotos: Rafael da Silva Messias

Figura 4. Gel de agarose 2% apresentando a expressão dos genes *act* (a), *lut1* (b) e *psy1* (c), através de RT-PCR semi-quantitativa, em grãos de diferentes cultivares de milho crioulo (d). 1- Dente de ouro, 2- Argentino, 3- Cabo roxo, 4- Amarelão, 5- Dente de ouro roxo, 6- Farináceo amarelo, 7- Sertanejo, M1- marcador 1kb plus, M2- marcador 100pb.

Conclusões

Os resultados obtidos indicam que o protocolo utilizando CTAB permite a obtenção de RNAs com melhor qualidade e com concentrações adequadas para estudos de expressão gênica.

A análise transcriptômica mostrou que para todas as variedades de milho estudadas ocorre expressão dos genes *psy1* e *lut1* no final do ciclo de formação do grão, havendo uma predominância da *lut1* e uma diferenciação na expressão desta, diretamente relacionada à maior coloração amarela apresentada pelos grãos.

Referências

ABDEL-AAL, E. M.; YOUNG J. C.; RABALSKI, I. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 13, p. 4696-4704, June 2006.

ALURU, M.; XU, Y.; GUO, R.; WANG, Z.; LI, S.; WHITE, W.; WANG, K.; RODERMEL, S. Generation of transgenic maize enhanced provitamin A content. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 59, n. 13, p. 3551-3562, Oct. 2008.

BELEFANT-MILLER, H.; LEDBETTER, C.; BENNETT, S. Using a commercial DNA extraction kit to obtain RNA for RT-PCR from starchy rice endosperm. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 3, n. 3, p. 360-363, Mar. 2008.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, Milan, v. 34, n. 3, p. 597–601, June 2005.

CONAB. **Milho**. Brasília, DF, 2009. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/sureg/PR/Milho%20Abril%202009.pdf>>. Acesso em: 12 ago. 2009.

FARDET, A.; ROCK, E.; RÉMÉSY, C. Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo? **Journal of Cereal Science**, London, v. 48, n. 2, p. 258-276, 2008.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, Boston, v. 27, n. 2-3, p. 126–139, Apr./June 2006.

GALLAGHER, C. E.; MATTHEWS, P. D.; FAQIANG, L.; WURTZEL, E. T. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 135, n. 3, p. 1776–1783, July 2004.

JAAKOLA, L.; PIRTTILÄ, A. M.; HALONEN, M.; HOTTOLA, A. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 19, n. 2, p. 201-203, Oct. 2001.

LI, F.; TSFADIA, O.; WURTZEL, T. The phytoene synthase gene family in the grasses. **Plant Signaling and Behavior**, Austin, v. 4, n. 3, p. 208-211, Mar. 2009.

LI, F.; VALLABHANENI, R.; WURTZEL, E. T. PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 146, n. 3, p. 1333–1345, 2008a.

LI, F.; VALLABHANENI, R.; YU, J.; ROCHEFORD, T.; WURTZEL, E. T. The maize phytoene synthase gene family: overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 147, n. 3, p. 1334-1346, 2008b.

LI, W. D.; WEI, C. L.; WHITE, P. J.; BETA, T. High-amylose corn exhibits better antioxidant activity than typical and waxy genotypes. **Journal**

of **Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 2, p. 291-298, Jan. 2007.

LOANE, E.; NOLAN, J. M.; O'DONOVAN, O.; BHOSALE, P.; BERNSTEIN, P. S.; BEATTY, S. Transport and retinal capture of lutein and zeaxanthin with reference to age-related macular degeneration. **Survey of Ophthalmology**, Plymouth, v. 53, n. 1, p. 68-81, Jan./Feb. 2008.

MADABUSI, L. V.; LATHAM, G. J.; ANDRUSS, B. F. RNA extraction for arrays. **Methods in Enzymology**, New York, v. 411, p. 1-14, 2006.

OLIVEIRA, G. P. R. de; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Processed and prepared corn products as sources of lutein and zeaxanthin: compositional variation in the food chain. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n. 1, p. 79, Jan./Feb. 2007.

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 6 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 75).

PALAISSA, K. A.; MORGANTE, M.; WILLIAMS, M.; RAFALSKI, A. Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 8, p. 1795–1806, Aug. 2003.

REZZI, S.; RAMADAN, Z.; FAY, L. B.; KOCHHAR, S. Nutritional metabolomics: applications and perspectives. **Journal of Proteome Research**, Boston, v. 6, n. 2, p. 13-525, Jan. 2007.

ROSSEN, L.; NORSKOV, P. L.; HOLMSTROM, K.; RASMUSSEN, F. O. Inhibition of PCR by components of food sample, microbial diagnostic assay and DNA-extraction solutions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 17, n. 1, p. 37–45, Sept. 1992.

SAMBROOK, T.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd. ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. 3 v.

STAHL, W. E.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1740, n. 2, p. 101–107, 2005.

TANAKA, Y.; OHMIYA, A. Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. **Current Opinion in Biotechnology**, Madri, v. 19, n. 2, p. 190-197, 2008.

TAI, H. H.; PELLETIER, C.; BEARDMORE, T. Total RNA isolation from *Picea mariana* dry seed. **Plant Molecular Biology Reporter**, Georgia, v. 22 p. 93a–93e, Mar. 2004.

VALLABHANENE, R.; WURTZEL, E. Timing and biosynthetic potential for carotenoid accumulation in genetically diverse germplasm of maize. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 150, n. 2, p. 562-572, 2009.

WANG, D. H.; WANG, B. C.; LI, B.; DUAN, C. R.; ZHANG, J. Extraction of total RNA from *Chrysanthemum* containing high levels of phenolic and carbohydrates. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 36, n. 2, p. 111–114, July 2004.

ZENG, Y.; YANG, T. RNA Isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, Georgia, v. 20, n. 2, p. 417a–417e, May 2002.

