

# EXTRAÇÃO DE DNA EM GENÓTIPOS DE ACEROLA NO DISTRITO DE IRRIGAÇÃO DO PIAUÍ-DITALPI.

*Antonia Cardoso Almeida (ICV/ UFPI); Francilene Leonel Campos(orientadora, Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas/ UFPI) .*

## **Introdução**

A acerola (*Malpighia emarginata* DC) é uma frutífera pertencente à família *Malpighiaceae*, típica de países de clima tropical e originária das Antilhas, que encontrou no Brasil condições favoráveis ao seu cultivo, adaptando-se melhor à região nordeste, por suas condições de solo e clima. O fruto tem suma importância econômica e social devido ao seu alto teor de ácido ascórbico (vitamina C). Apesar de sua importância social e do seu elevado potencial econômico, muito pouco tem sido feito para o conhecimento e uso dessa espécie, seja na área de coleta, conservação, seja no melhoramento genético (SALLA et al.,2002).

O melhoramento genético da acerola é um fator indispensável para o desenvolvimento de clones com características favoráveis, pois a inexistência de variedades definidas é um dos principais fatores que aliado ao plantio de mudas obtidas por sementes, leva a grande desuniformidade na produção anual de frutos por planta (SALLA et al., 2002). Um programa de melhoramento de plantas compreende a obtenção da variabilidade genética, a seleção de indivíduos superiores e a avaliação de materiais genéticos promissores para lançamento comercial. A ênfase nestas etapas é conseguida pelas técnicas de extração e amplificação de DNA (MILACH, 1998).

O método de extração de DNA mais utilizado para diferentes espécies vegetais é baseado no uso do detergente CTAB – Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide, um solubilizador de membranas celulares (ROMANO & BRASILEIRO, 1999).

Para o desenvolvimento de qualquer técnica de análise direta da molécula de ácido desoxirribonucléico, uma extração de DNA de boa qualidade é de suma importância, seja ela para sequenciamento, restrição de enzimas ou amplificação via PCR (DANTAS, 2011). E para isso é essencial a lise das células, a precipitação e eliminação das impurezas co-extraídas através da purificação das amostras (XAVIER et al 2004).

A análise de DNA por eletroforese é uma das técnicas fundamentais nos laboratórios de pesquisa. Para tanto são utilizados corantes fluorescentes, que permitem visualização do DNA quando submetido à luz U.V. Entretanto, dependendo do método utilizado para visualização a eletroforese pode ser desvantajosa, pois frequentemente se utiliza na coloração de géis de agarose, Brometo de Etídio, cuja capacidade de intercalação na molécula de DNA o torna um produto de grande periculosidade de caráter mutagênico (BARROS et al.2003). Em decorrência desses efeitos corantes fluorescentes como o GelRed<sup>TM</sup> vem se destacando, pois permite uma boa visualização, além de não-citotóxico, não mutagênico e não danoso (BIOTIUM, INC., 2012).

No Piauí, a produção de acerola vem ganhando espaço através do polo irrigado do Distrito Litorâneo do Piauí (DITALPI), situado ao norte do estado. O plantio ocupa atualmente uma área aproximada de 50 hectares. Sabendo da importância da acerola nesta região temos como objetivo fazer extrações de DNA dos clones utilizados em suas propriedades, visando posteriormente estabelecer um programa de melhoramento genético para a cultura aceroleira do polo, a fim de atender a demanda da região por variedades promissoras.

### **Metodologia**

**Coleta das amostras de acessos de acerola-** A coleta foi realizada na região do Distrito de Irrigação do Piauí-DITALPI com latitude de 2°55' S, 41°50' W e altitude de 40 m, no norte do estado do Piauí, município de Parnaíba. Foram coletadas 60 amostras de folhas jovens de aceroleira. Estas foram armazenadas em vidrarias devidamente identificadas contendo gel para coleta (CTAB) e acondicionadas em geladeira para posteriores extrações.

**Extração de DNA de acerola-** As extrações e visualizações foram realizadas no Laboratório de Células e Moléculas da Universidade Federal do Piauí, Campus de Parnaíba, Parnaíba PI. O DNA genômico das folhas foi extraído utilizando-se o método proposto por DOYLE e DOYLE, 1987, com modificações. Fez-se uso para a extração de DNA, 50 mg de folhas frescas de 60 acessos maceradas com 300 µl de CTAB 2x. O material macerado foi transferido para eppendorfs contendo 800µl de CTAB 2x + 4µl de β- mercaptoetanol e levado ao banho-maria por 20 minutos. Posteriormente, adicionou-se à solução 800µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após shaker de uma hora centrifugou-se as amostras e retirou-se o sobrenadante para um novo microtubo, no qual foi adicionado 500µl de isopropanol gelado e posterior acondicionamento em freezer. A solução deixada em overnight foi centrifugada por 10 min. à temperatura ambiente. Do centrifugado foi descartado a parte líquida deixando somente o pellet nos eppendorfs. Os pellets foram lavados com álcool etílico 70% por três vezes. Após a lavagem e secagem as amostras foram ressuspensas com TE-100.

**Visualização e análise do DNA de acerola-** Para a visualização do DNA total, extraído dos acessos de acerola usou-se de géis de agarose (0,8%). A cada poço dos géis foram adicionadas 1 µl de GelRed™, 2 µl de corante (azul de bromotimol) e 5 µl de DNA da amostra extraída. Os géis foram expostos à corrida em eletroforese, a 120 V, observados em transluminador e registrados em sistema de foto documentação.

### **Resultados e Discussão**

Das 60 amostras extraídas (tabela 1), foi visualizado DNA em todas, como mostra a figura (1). Porém podemos constatar que ainda existe contaminação por polissacarídeos, que de acordo com Romano e Brasileiro (1999), pode ser observada pela retenção de DNA no poço do gel de agarose.

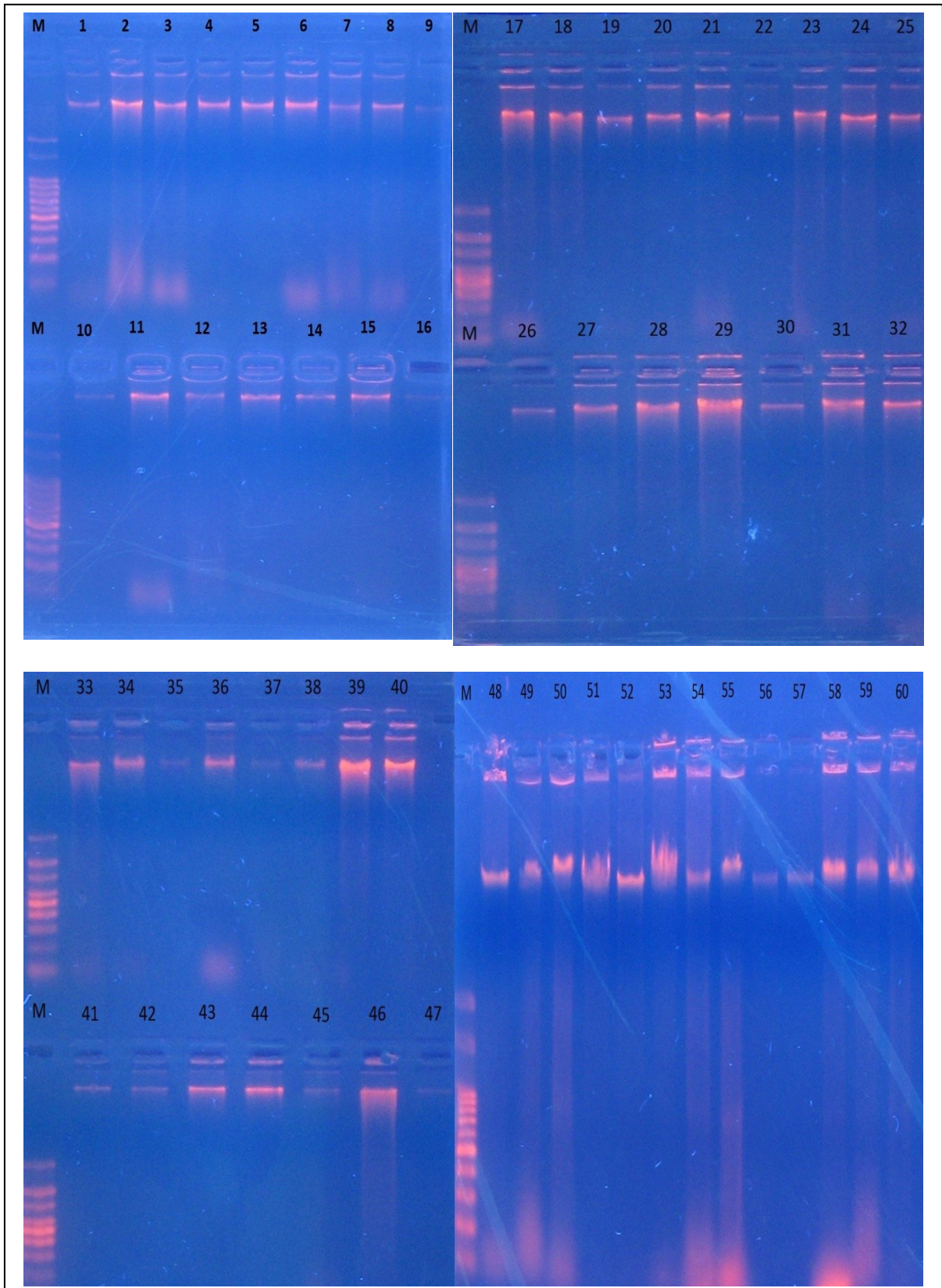
Observa-se também nos géis abaixo a formação de rastro de DNA degradado, que segundo Romano e Brasileiro (1999), pode ser efeito de degradação por DNases ou pela quebra mecânica durante a extração com clorofórmio.

Ainda em relação à figura (1) nota-se que o GelRed™ usado como corante fluorescente na visualização do DNA de *Malphigia emarginata* D.C é eficiente e satisfatório para análise do gel de agarose, além de não possuir características nocivas a saúde humana.

**Tabela 1.** Amostras utilizadas para extração de DNA

Amostra	*Acesso	Amostra	Acesso	Amostra	Acesso
1	69 A1	21	13/2 A2	41	OK CH1
2	69 A2	22	13/2 A3	42	OK CH2
3	69 A3	23	13/2 A4	43	OK CH3
4	69 A4	24	13/2 A5	44	OK CH4
5	69 A5	25	13/2 CH1	45	OK CH5
6	69 CH1	26	13/2 CH2	46	OK E1
7	69 CH2	27	13/2 CH3	47	OK E2
8	69 CH3	28	13/2 CH4	48	OK E3
9	69 CH4	29	13/2 CH5	49	OK E4
10	69 CH5	30	13/2 E1	50	OK E5
11	69 E1	31	13/2 E2	51	OK J1
12	69 E2	32	13/2 E3	52	OK J2
13	69 E3	33	69 E3	53	OK J3
14	69 E5	34	13/2 E4	54	OK J4
15	69 J1	35	13/2 E5	55	OK J5
16	69 J2	36	13/2 J1	56	71 J1
17	69 J3	37	13/2 J2	57	71 J2
18	69 J4	38	13/2 J3	58	71 J3
19	69 J5	39	13/2 J4	59	71 J4
20	13/2 A1	40	13/2 J5	60	71 J5

\*Os acessos são representados respectivamente por números (nome do clone ou variedade), letras (iniciais do nome do produtor) e números (sequência de coleta de um mesmo clone em determinado lote).



**Figura 1:** Padrão eletroforético em géis de agarose 0,8% corados com GelRed™ das amostras extraídas dos acessos de acerola (tabela 1);(M- marcador de peso molecular, ladder 100 pares de base; numeração de 1a 60 amostras representadas na tabela (1)).

## Conclusão

Os resultados obtidos demonstram que a metodologia empregada nas extrações e visualizações do DNA de *Malpighia emarginata* D.C foi bem sucedida. Assim promovendo suporte a futuras análises de divergência em aceroleiras conferidas por posteriores ampliações via PCR, utilizando marcadores moleculares.

**Apoio:** Universidade Federal do Piauí- UFPI.

## Referências

BARROS, I. C.; SILVA, A.C.; FRAZÃO, H. S.; CASTRO, C. S. P. **Recomendações referentes à segurança nos laboratórios da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. Documentos 101. Brasília – DF. 36 p. 2003.

BIOTIUM, INC. GelRed™. **Simply the best nucleic acid gel stain**. Disponível em: [www.uniciencia.Com.br/corantes-de-acidos-nucleicos-e-produto-para-genomica/gelred-concentrado](http://www.uniciencia.Com.br/corantes-de-acidos-nucleicos-e-produto-para-genomica/gelred-concentrado). Acesso em: 20.06.2012.

DANTAS, A. C. M. **Extração e análise de DNA vegetal**. Disponível em: <http://www.lfdgv.ufsc.br/Pratica>. pdf. Acesso em: 17.05.2011.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA: Aplicações no melhoramento de plantas. **Revista de Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 5, n. 1, p. 14-17, 1998.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. **Extração de DNA de plantas: Soluções para problemas comumente encontrados**. Biotecnologia Ciência e desenvolvimento, Brasília, n. 9, p. 40-43, 1999.

SALLA, M. F. S.; RUAS, C. de F.; RUAS, P. M.; CARPENTIERI-PIPOLO, V. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.), **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 15-22, 2002.

XAVIER, G. R.; SILVA, F. V.; ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G. **Adaptação de método para extração de DNA de microrganismos associados a raízes de plantas**. Embrapa Agrobiologia. Documentos 171. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 24 p. 2004.

**Palavras-chave:** *Malpighia emarginata* D.C;ácido desoxirriboucleico; GelRed™.