

ANÁLISE DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO EM *Allium sativum* L.

Marcones Ferreira Costa (Bolsista PIBIC/CNPq), Ângela Celis de Almeida Lopes (Orientadora, Departamento Biologia/UFPI), Regina Lucia Ferreira Gomes (Co-orientadora, UFPI), Sérgio Emílio dos Santos Valente (Co-orientador, UFPI)

Introdução

O alho (*Allium sativum* L.) é uma das mais antigas hortaliças cultivadas no mundo e apresenta uma ampla variação morfológica. A atividade humana, o crescente desenvolvimento tecnológico ou a agropecuária irracional, são apontados como a causa da gradual perda da variabilidade genética desta hortaliça. O presente trabalho tem como objetivo avaliar diferentes protocolos de extração de DNA genômico total em *Allium sativum* L, para oferecer subsídios para a caracterização molecular da amostra e para a quantificação da diversidade genética existente no germoplasma do gênero *Allium*.

Metodologia

Foram coletados subamostras de alho, junto aos agricultores, em área de cultivo, feiras e mercados populares da Microrregião de Picos. Em seguida o material foi armazenado separadamente em freezer a -20°C . A extração do DNA foi realizada no Laboratório de Micologia do Departamento de Biologia no Centro de Ciências da Natureza (CCN) da Universidade Federal do Piauí, e a quantificação das amostras obtidas foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa- Meio Norte), em Teresina-Piauí.

Foram avaliados cinco protocolos descritos por Romano & Brasileiro (1998), Doyle & Doyle (1987), Grattapaglia et al. (1995), Clarke et al. (1989) e Dellaporta et al. (1983), de forma que os quatro primeiros protocolos citados acima foram baseados no método CTAB, com modificações relativas à quantidade de tecido do bulbo que foi submetido à extração, seguida das devidas alterações proporcionais na quantidade de reagentes de acordo com a quantidade de tecido do bulbo previamente estabelecida.

A quantificação foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da EMBRAPA Meio Norte, na cidade de Teresina-Piauí, por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, submetida a 80V durante 1hora, utilizando o agente intercalante GelRED® e o Azul de Bromofenol. Os padrões de bandas foram visualizados por luz ultravioleta (UV), utilizando o marcador de DNA de fago λ com concentração conhecida de 100 ng/ μL . Esses padrões foram fotografados com equipamento MiniBISPro®.

Resultados e Discussão

Foram detectadas diferenças nos cinco protocolos utilizados (Figura 1). Os protocolos de Romano & Brasileiro (1998) e Doyle & Doyle (1987) resultaram em boa quantidade de DNA, mas com altos índices de contaminação por polissacarídeos. Os métodos propostos por Grattapaglia e Sederoff (1995) e Dellaporta et al. (1983), obtiveram baixas concentrações de DNA. Por meio do protocolo de Clarke et al. (1989) obteve-se amostras com as melhores relações de pureza e com boa

quantidade de DNA em comparação aos demais, uma vez que o método descrito por Clarke et al. (1989) utiliza a maior concentração de detergente CTAB na solução tampão e maior quantidade de solução salina de NaCl que os outros protocolos analisados.

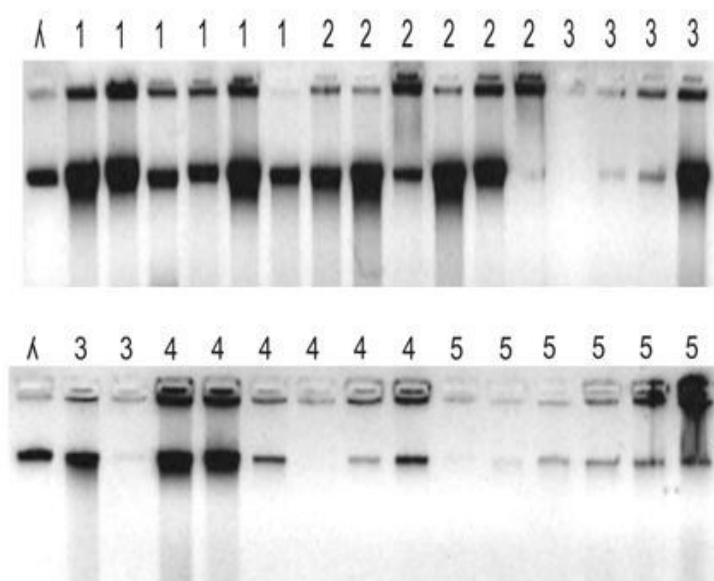


Figura 1- Análise eletroforética do DNA genômico total de *Allium sativum* L, em gel de agarose a 0,8%, com a presença do marcador de DNA de fago λ. Utilizando os protocolos de extração 1- Romano & Brasileiro (1998); 2- Doyle & Doyle (1987); 3- Grattapaglia et al. (1995); 4- Clarke et al. (1989) e 5- Dellaporta et al. (1983). Fonte: COSTA, M.F, 2012.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos e nas condições em que se realizou o presente estudo, conclui-se que os métodos descritos por Romano & Brasileiro (1998) e Doyle & Doyle (1987), apresentaram DNA de quantidade adequada para experimentação. No entanto, sugere-se preferencialmente o uso da técnica de Clarke et al. (1989) para a extração de DNA de bulbos do alho (*Allium sativum* L.), já que foi o protocolo que apresentou a melhor resolução no perfil eletroforético na quantificação em gel de agarose. Indicando quantidade e grau de pureza adequada para futuros estudos moleculares.

Apoio: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Referências

AGRIANUAL. 2004. **Anuário da Agricultura Brasileira**. FNP Consultoria e Comércio: São Paulo.

536p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998.220p.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O.; REIS, M. S. & ORTH, A. I. **A diversidade dos recursos genéticos**

vegetais e a nova pesquisa agrícola. Ciência Rural, Santa Maria, v. 28, n. 3, 1998.

KHANUJA, S. P. S.; SHASANY, A. K.; DAROKAR, M. P.; KUMAR, S. **Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils.** Plant Molecular Biology Reporter, V.17, p. 1 - 7, 1999.

MOTA JH. 2003. **Diversidade genética e características morfológicas, físico-químicas e produtivas de cultivares de alho (*Allium sativum* L.).** Lavras: UFLA. 122p. (Tese doutorado).

ROMANO, E; BRASILEIRO, A. C. **Extração de DNA de tecidos vegetais.** In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas.** Brasília. EMBRAPASPI/ EMBRAPA- CENARGEN, 1998.

SIMON, P. W.; JENDEREK, M. M. **Flowering, seed production and the genesis of garlic breeding.** In: JANICK, J. (ed.). Plant Breeding Reviews, Volume 23, 2003. p.211-244.

VIANA, J. P. G. **Análise de oito métodos de extração de DNA em *Orbignya phalerata* MART (*Arecaceae*).** 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Piauí.

Palavras-chave: alho. caracterização molecular. diversidade genética.