



## **INFLUÊNCIA DA IDADE DO TECIDO FOLIAR NA QUALIDADE DO DNA EM MARACUJAZEIRO AZEDO**

### **INFLUENCE OF LEAF TISSUE AGE ON THE QUANTITY AND QUALITY OF DNA EXTRACTED FROM SOUR PASSION FRUIT**

*Edilson Marques Junior, Gabriel Antônio Dalapícula Serafini, Luciana Domiciano Silva Rosado, Jussara Firmino da Costa, Gener Augusto Penso, Carlos Eduardo Magalhães dos Santos*

Universidade federal de Viçosa, Campus Viçosa, Departamento de Fitotecnia. E-mail:  
edilsonmarquesjr@hotmail.com, gapserafini@gmail.com, lusrosado@gmail.com, jussara.costa@ufv.br,  
generpenso@gmail.com, carlos.magalhaes@ufv.br  
Autor correspondente: edilsonmarquesjr@hotmail.com

Apresentado na

30ª Semana Agronômica do CCAE/UFES - SEAGRO 2019

16 a 20 de setembro de 2019, Alegre - ES, Brasil

**RESUMO** - O melhoramento do maracujazeiro visa superar limitações a cultura como pragas, doenças e fatores climáticos. A adoção de abordagem biotecnológicas, tem proporcionado avanços significativos nos trabalhos de caracterização e desenvolvimento de novos genótipos, e pode ser aplicada em diversas etapas em programas de melhoramento. O isolamento do ácido nucleico a ser trabalhado, consiste em uma etapa importante em técnicas moleculares, visto que todas as etapas seguintes dependem da qualidade do material extraído. Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência da idade do tecido foliar na concentração e qualidade do DNA extraído. Foram extraídos DNA de folhas jovens completamente expandidas, folhas adultas obtidas do ramo secundário e do ramo terciário e de folhas cotiledonares, usando o método CTAB. A concentração e a qualidade foram verificadas em espectrofotômetro. Todas os tipos de tecidos foliares apresentaram DNA em quantidade suficiente para realização de análises moleculares, sendo que as folhas completamente expandidas forneceram maiores concentrações que os demais. Além disso, amostras mais puras foi obtida com este tecido foliar. Amostras de DNA com menor relação de pureza foi obtida a partir do tecido foliar adulto.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biotecnologia, Relação 260/280, Relação 260/230, Análises moleculares.

**KEYWORDS:** Biotechnology, relation 260/280, Relation 260/230, Molecular analyzes

**SEÇÃO:** Biotecnologia e Melhoramento de plantas.

### **INTRODUÇÃO**

O *Passiflora edulis* Sims, popularmente conhecido como maracujazeiro azedo, consiste em uma espécie frutífera, de maior importância do gênero *Passiflora*. O Brasil é maior produtor e consumidor mundial de maracujás, o que leva a cultura assumir importante papel socioeconômico no país, principalmente para pequenos e médios produtores, em especial os da agricultura familiar (MELETTI, 2011).



Nas últimas décadas houve um considerável incremento nas áreas de cultivo e na produção de frutos de maracujás no Brasil. O rápido retorno econômico, e o alto valor agregado dos frutos, faz com que o maracujazeiro se destaque entre as diversas frutíferas e muitos produtores invistam em novos cultivos. Apesar da expansão dos cultivos no Brasil, a produtividade média da cultura é em torno de 13 toneladas por hectare, considerada baixa frente ao potencial da cultura, superior a 30 toneladas por hectare (SILVA, 2009; HAFLE et al., 2010; FREITAS et al., 2011). O melhoramento genético é tido como o maior responsável pelo crescimento e expansão da cultura no Brasil, a partir do lançamento de cultivares superiores no mercado (MELETTI, 2011). Apesar disso, há uma carência de cultivares com resistência as principais pragas e doenças que acometem a cultura, e se tornam limitantes para contínuos avanços na cultura. O melhoramento do maracujazeiro ainda carece de caracterização de genótipos domesticados e silvestres, que poderiam proporcionar incrementos nos ganhos dos programas (CERQUEIRA-SILVA et al., 2018).

A adoção de abordagem biotecnológicas, tem proporcionado avanços significativos nos trabalhos de caracterização e desenvolvimento de novos genótipos em programas de melhoramento. Essas abordagens podem ser aplicadas em diversas etapas no melhoramento de plantas, auxiliando na caracterização da diversidade genética, seleção assistida por marcadores, direcionamento de cruzamentos, assegurar pureza de materiais dentre outras aplicações (PEREIRA et al., 2005).

Assim, o emprego dessas técnicas e o sucesso das mesmas está intrinsecamente ligado a qualidade do material genético obtido para realização dos trabalhos. A aplicação das técnicas moleculares exige DNA em quantidade suficientes e de alta pureza (ROCHA et al., 2017). A extração de DNA consiste em uma etapa importante em técnicas moleculares, visto que todas as etapas seguintes dependem da qualidade do material extraído. O isolamento de ácidos nucleicos pode ser feito a partir de diferentes tecidos da planta estudada, e até mesmo em diferentes idades (NOVAES et al., 2009).

Dentre outros fatores, o tipo de tecido utilizado para extração e a metodologia, podem influenciar significativamente na qualidade e quantidade de DNA extraído (ROCHA et al., 2017). Assim são necessários estudos que visam identificar e ajustar metodologias para obtenção de material genético de melhor qualidade e quantidade para o emprego eficiente destas técnicas. Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência da idade fisiológica do tecido foliar de maracujazeiro na qualidade do DNA extraído.

## METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal do setor de Fruticultura da Universidade Federal de Viçosa. Foram coletadas folhas de maracujazeiro azedo em quatro estágios de crescimento para a extração do DNA: 1º) Folhas jovens completamente expandidas; 2º) Folhas completamente expandidas da região mediana do ramo terciário; 3º) Folhas coriáceas do ramo secundário; 4º) Folhas cotiledonares. Duas amostras de cada tipo de tecido foram extraídas.

A extração do DNA foi realizada com o protocolo CTAB (DOYLE e DOYLE, 1990), com modificações. Inicialmente, 200 mg de cada tipo de tecido foliar foi macerado em 700 µl tampão constituído de CTAB 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris pH 8,0 100 nM e PVPP 1%, mais 4 µl de 2-mercaptoethanol, em macerador TissueLyser II (QIAGEN®). Em seguida, o macerado foi incubado por 20 min a 65 °C em banho Maria. Para a purificação, foi adicionado 700 µl da mistura clorofórmio: Alcool Isoamílico: Fenol (24:1:25) e centrifugado a 5000 rpm, por 10 min. Esse procedimento foi repetido por três vezes, onde ao final de cada centrifugação o sobredante era transferido para um novo microtubo de 1,5 ml, e sobre este era adicionado a mistura clorofórmio: Álcool Isoamílico: Fenol.

A precipitação do DNA foi realizada com 700 µl de álcool isopropílico PA gelado, mais 70 µl de acetato de sódio 3 M, e então deixado em *overnight* a -20 °C. Após o *overnight*, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 min, para formação do *pellet* de DNA. Em seguida, 700 µl de álcool 70% foi adicionado sobre o *pellet* para lavagem, e então centrifugadas novamente a 13.000 rpm por 15 min. Esse procedimento foi realizado por três vezes, sendo que para a última centrifugação foi adicionado álcool 95% gelado. Após a secagem o *pellet* foi eluído



em 100 µl de água deionizada autoclavada, acrescentado de 1 µl de RNase 10 mg.µl, e incubado por 20 minutos em banho Maria a 37 °C.

A quantidade de DNA obtida em cada tipo de tecido foliar foi verificada em espectrofotômetro Thermo Scientific™ Multiskan GO™, e a qualidade verificada através da relação da absorvância nos comprimentos de onda 260/280 nm e 260/230.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

A idade do tecido foliar interferiu na qualidade e quantidade do DNA extraído. A concentração média de DNA extraída nos tecidos foliares de maracujazeiro variou de 78,92 a 152,77 ng. µl<sup>-1</sup>, e a relação de absorvância nos comprimentos de onda 260/280 variou de 1,70 a 1,84 (Tabela 1).

**Tabela 1.** Concentração de DNA e relação de absorvância nos comprimentos de onda 260/280 e 260/230, para o DNA extraído de tecido foliar de maracujazeiro azedo em diferentes idades.

Tecido foliar	Concentração de DNA (ng. µl <sup>-1</sup> )	Relação 260/280	Relação 260/230
Jovem completamente expandido	152.78	1.84	1.43
Adulto da região mediana do ramo terciário	93.78	1.78	1.15
Adulto coriáceo do ramo secundário	136.78	1.70	1.21
Jovem cotiledonar	78.93	1.84	1.22

A maior concentração de DNA foi obtida nas folhas novas completamente expandidas, e a menor concentração foi obtida na extração em folhas cotiledonares. Apesar da variação na concentração de DNA obtida, todos os tecidos foliares utilizados fornecem quantidades de DNA suficientes para a realização de análises moleculares, com o protocolo adotado, indicando que é possível extrair DNA de maracujazeiro em qualquer idade foliar. A menor concentração de DNA em folhas cotiledonares pode estar relacionado a idade destas folhas.

A maior relação 260/280 foi encontrada no DNA extraído de folhas jovens completamente expandidas e de folhas cotiledonares, com média de 1,84, enquanto que a menor razão foi obtida de tecido foliar adulto completamente expandido do ramo secundário. Relações 260/280 entre 1,8 e 2, considera-se que as amostras são de elevado grau de pureza, em relação a contaminação com proteína, que absorvem no comprimento de onda de 280 nm (PASAKINSKIENĖ; PASAKINSKIENĖ, 1999; CARVALHO et al., 2019). A menor relação 260/280 em folhas mais adultas de maracujá, indica que estas amostras tendem a fornecer DNA de menor pureza, que tecidos mais jovens.

Na relação 230/260 todas as amostras apresentaram valores inferiores a 1,8, o que evidencia um grau de contaminação em todas as amostras. Relações 260/230 inferiores a 1,8 é um indicador de presença de sais, polissacarídeos e fenóis. Folhas mais maduras tendem a ter uma maior concentração de metabólitos secundários, como polifenóis. Estas substâncias tendem a se acumular em folhas ao longo do desenvolvimento fisiológico das plantas (MOREIRA; OLIVEIRA, 2011), o que justifica as amostras de DNA extraídas de tecido foliar adulto terem apresentado as menores razões de absorvância 260/260. Além disso, o maracujazeiro é tido como uma espécie rica em polifenóis, o que confere a planta características de interesse na área medicinal.

Por outro lado, maior concentração de polissacarídeos é encontrado em folhas cotiledonares, visto que as mesmas são as primeiras folhas emitidas pelas plântulas, e aloca as reservas para desenvolvimento inicial das



plântulas (WEIDLICH et al., 2010), o que pode influenciado na razão de absorvância na amostra extraída de folhas cotiledonares. A melhor relação 260/230 é encontrada nas amostras de DNA extraídas do tecido foliar jovem completamente expandidos, o que evidencia que este se configura no tecido mais adequado para extração de DNA de maracujazeiro azedo.

## CONCLUSÃO

A idade do tecido foliar interfere na concentração de DNA obtido, entretanto todos fornecem DNA em quantidade suficiente para realização de análises moleculares. Melhores relações de pureza são obtidas ao extrair DNA de tecido foliar jovem completamente expandido.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem os órgãos de fomento, pelo apoio financeiro e estrutural para realização do trabalho.

## REFERÊNCIAS

- CARVALHO, M. S.; NOIA, L. R.; FERREIRA, M. F. S; FERREIRA, A. DNA de alta qualidade isolado a partir do córtex de *Euterpe edulis* Mart.(Arecaceae). **Ciência Florestal**, v. 29, n. 1, 2019.
- CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; FALEIRO, F.G.; JESUS, O.N.; SANTOS, E.S.L.; SOUZA, A.P. Passion fruit (*Passiflora* spp.) Breeding. In: AL-KHAYRI, J. M.; JAIN, S. M.; JOHNSON, D. V. **Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits**. Springer, 2018. p. 929-951.
- DOYLE, Jane L.; DOYLE, John. J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13- 15.1990.
- FREITAS, J. P. X.; OLIVEIRA, E. J.; CRUZ NETO, A. J.; SANTOS, L. R. Avaliação de recursos genéticos de maracujazeiro-amarelo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 9, p. 1013-1020, 2011.
- HAFLE, O. M.; RAMOS, J. D.; ARAÚJO NETO, S. E. D.; MENDONÇA, V. Rentabilidade econômica do cultivo do maracujazeiro-amarelo sob diferentes podas de formação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, n. 32, p. 1082-1088, 2010.
- MOREIRA, P. A.; OLIVEIRA, D. A. Leaf age affects the quality of DNA extracted from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), a tropical tree species from the Cerrado region of Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 1, p. 353-358, 2011.
- MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, ed. especial, p. 83-91, 2011.
- NOVAES, R. M. L.; RODRIGUES, J. G.; LOVATO, M. B. An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 1, p. 86-96, 2009.
- PASAKINSKIENĖ, I.; PASAKINSKIENĖ, V. Floral meristems as a source of enhanced yield and quality of DNA in grasses. **Plant Cell Reports**, v. 18, n. 6, p. 490-492, 1999.

16 a 20 de Setembro de 2019  
www.seagroufes.net



- PEREIRA, M. G.; PEREIRA, T. N. S.; VAINA, A. P. Marcadores moleculares aplicado ao melhoramento genético do maracujazeiro. In: FALEIRO, f. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Org.). **Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético**. 1 ed. Brasília: EMBRAPA, v. 1, 2005. p. 277-294.
- ROCHA, V. D.; ZÓRTEA, K. É. M.; SANTOS CARDOSO, E.; BISPO, R. B.; TIAGO, A. V.; ROSSI, A. A. B. Efeito da idade da folha na qualidade do DNA extraído de *Piper aduncum* L. **Revista de Ciências Agroambientais**, v. 15, n. 2, p. 218-222, 2017.
- SILVA, M. G. M. Seleção recorrente intrapopulacional no maracujazeiro amarelo: Alternativa de capitalização de ganhos genéticos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 01, p. 170-176, 2009.
- WEIDLICH, E. W. A.; PESCADOR, R.; UHLMANN, A. Alocação de recursos (carboidratos) no desenvolvimento inicial de plântulas de *Schizolobium parahyba* (Vell.) SF Blake (Fabaceae-Caesalpinioideae). **Revista Árvore**, v.34, n.4, p.627-635, 2010