



APLICABILIDADE DA TÉCNICA PCR-RAPD PARA A DETERMINAÇÃO DO PERFIL GENOTÍPICO DE VARIEDADES DE ROMÃ (*Punica granatum*)

Edna Maria Morais Oliveira¹, Ivanilda Santos de Lima², Barbara Torres Carneiro³, Regina Isabel Nogueira⁴, Otniel Freitas-Silva¹.

¹ Pesquisadores da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Diagnóstico Molecular e Micologia, edna@ctaa.embrapa.br; ofreitas@ctaa.embrapa.br

² Nutricionista, bolsista CNPq/DTI-3 da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Diagnóstico Molecular e Micologia, ivanildalima@gmail.com

³ Estudante de Ensino Médio do Colégio de Aplicação Emmanuel Leontisínis, estagiário da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Diagnóstico Molecular e Micologia, barbaracarneiro13@gmail.com

⁴ Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Planta Piloto de Operações Unitárias I, nogueira@ctaa.embrapa.br

Resumo: A romã (*Punica granatum*) é uma fruta originária do Oriente Médio e cresce em regiões de clima árido, com histórico de uso medicinal. A fruta apresenta sementes revestidas por uma polpa avermelhada (granada) onde estão presentes os compostos fenólicos, principalmente as antocianinas. Atualmente, é considerada uma importante fruta comercial largamente cultivada no Norte da África, no Mediterrâneo e Oriente Médio. As formas de consumo podem ser a granada fresca, como componente de saladas ou sobremesa, suco, geleia, aromatizante e corante na composição de outros produtos. No Brasil, algumas variedades de romã estão sendo cultivadas nos Estados de São Paulo, Bahia e Pernambuco, sendo os principais fornecedores da fruta para diferentes regiões do país. O objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação da técnica RAPD para posterior análise de similaridade genética/filogenia entre variedades comerciais de romã. Para tanto foram conduzidas reações PCR-RAPD com *primers* da série W (Operon). O DNA foi isolado da polpa e da casca usando os métodos CTAB e o kit comercial DNeasy. Os resultados obtidos mostraram que o DNA da polpa isolado com o método CTAB, usado na reação com OPW2, foi o que apresentou o perfil mais definido, com possibilidade de ser usado em análises posteriores de similaridade genética/filogenia e definição de marcador molecular para verificação da autenticidade de produtos industrializados à base de romã.

Palavras-chave: romã, genotipagem, RAPD.



Introdução

A Romã (*Punica granatum*) é uma das frutas com uma longa história medicinal, amplamente utilizada por muitas culturas, principalmente as orientais. Era considerada pelos antigos egípcios como um símbolo da prosperidade e da ambição, e as partes da árvore foram utilizadas como tratamento para a tênia e outras infecções por parasitas (BRAGA et al. 2005). Nos dias atuais é uma importante fruta comercial largamente cultivada nos países da Ásia, Norte da África, no mediterrâneo e Oriente Médio (SARKHOSH et al. 2006). Investigações sobre os componentes químicos e sua atividade biológica em todas as partes da romã, incluindo folhas, sementes, suco, casca e casca, estão despertando o interesse tanto do ponto de vista de saúde como econômico (LANSKY & NEWMAN, 2007; SINGH, CHIDAMBARA MURTHY, & JAYAPRAKASHA, 2002; GIL et al, 2000). Estudos relatam a eficácia de extratos obtidos de diferentes partes tanto da árvore (cascas e folhas) como dos frutos (cascas) de romã, com elevado conteúdo de compostos bioativos, para inibir o crescimento de patógenos, tanto em alimentos como em humanos (AL-ZOREKY, 2009). De acordo com Vasconcellos et al. (2003) e Duman et al. (2009), os extratos de romã também apresentam atividade antifúngica tendo atividade inibidora contra algumas espécies de *Candida* e *Saccharomyces cerevisiae*.

No Brasil, pesquisas realizadas têm demonstrado que existe a possibilidade de cultivo de espécies de climas tropical úmido, subtropical e temperada, com potencial econômico para as áreas irrigadas do semiárido brasileiro. Assim, a cultura da romãzeira está sendo introduzida e avaliada, também desde 2010, com o objetivo de encontrar uma nova opção de cultivo para os produtores da região. Estão em avaliação as cultivares “Wonderful” e “Bagawa”, importadas dos EUA e de Israel, no campo experimental da Embrapa Semiárido em Petrolina - PE.

O cultivo da romã promoveu um interesse pela definição de marcadores moleculares à base de DNA como o que já foi realizado para definir o mapeamento genético de muitas espécies de plantas como a alfafa, feijão guandu e maçã (AGARWAL, SHRIVASTAVA, PADH, 2008), que usaram a técnica RAPD (GIMÉNEZ, PISTÃO, MARTÍN, ATIENZA, 2009). A base da técnica de RAPD consiste de uma amplificação por PCR diferencial de DNA genômico, que detecta polimorfismos de DNA, usando curtas sequências de oligonucleótidos aleatórios (*primers* decaméticos) com sequencia predominantemente composta por G / C (60-80%) (WONG, YEOH, LIM E LOOI, 1997).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a aplicação da técnica RAPD para posterior análise de similaridade genética/filogenia entre variedades comerciais de romã e definição de marcador molecular para certificação da autenticidade de produtos industrializados à base de romã.



Material e Métodos

A extração do DNA da variedade Wonderful (polpa e casca) foi conduzida usando o kit DNeasy (Qiagen, Hilden, Alemanha) e o método CTAB (MURREY, THOMPSON, 1980). A concentração da solução do DNA isolado foi determinada por espectrofotometria UV/VIS (260nm). A pureza do isolado foi determinada pela razão Abs_{260nm}/Abs_{280nm} . Em seguida, foi realizada a genotipagem usando a técnica PCR-RAPD com *primers* decaméricos da série W da Operon (OPW).

Para a condução das reações foram usados 30ng de DNA. A PCR-RAPD foi conduzida no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, California, EUA), com ciclagem: desnaturação inicial (94°C/1min) seguida de 45 ciclos: desnaturação (94°C/30s), anelamento (37°C/30s), extensão (72°C/1min), e extensão final (72°C/5min). Os produtos da reação foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1.5% em tampão TBE 1X (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico e 2 mM EDTA) com 100 volts por 4 horas, e fotodocumentados. (Vilmart, Biosystems, EUA).

Resultados e Discussão

O rendimento obtido com a extração do DNA genômico da polpa e casca, bem como a pureza desses isolados, usando os diferentes métodos de extração estão representados na Tabela 1. Pôde-se verificar que o rendimento e a qualidade/pureza do DNA da polpa extraído com CTAB foram os melhores resultados. A genotipagem (PCR-RAPD) foi conduzida então usando os *primers* decaméricos OPW1 e OPW2. Os resultados obtidos mostraram que o DNA da polpa isolado com o método CTAB, usado na reação com OPW2, foi o que apresentou o perfil mais definido, com possibilidade de ser usado em análises posteriores de similaridade genética/filogenia (Figura 1).

Tabela 1: Rendimento da extração e pureza do DNA.

Amostras	Concentração [ng/ μ L]	Pureza
Polpa CTAB	12,44	2,00
Polpa DNeasy	9,78	1,26
Casca CTAB	8,33	1,39
Casca DNeasy	25,00	0,89

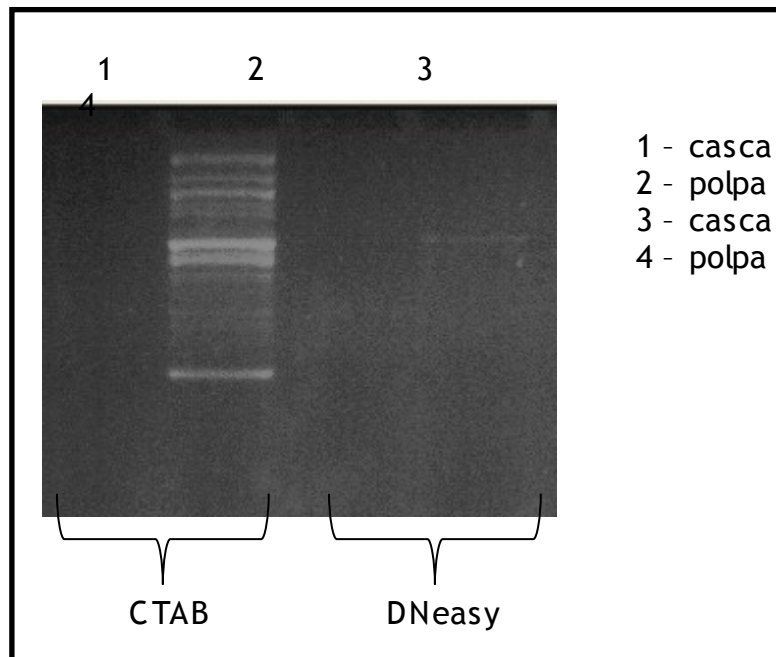


Figura 1: Perfil de bandejamento como resultado da PCR-RAPD do DNA de polpa e casca de romã usando os *primers* decaméricos OPW1 e OPW2.

Conclusão

Os resultados mostraram que a técnica PCR-RAPD é aplicável para a análise da similaridade/diversidade genética de variedades comerciais de romã. Assim sendo, será possível definir um marcador molecular para a presença de romã em produtos industrializados, garantindo a sua autenticidade.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq.

Referências Bibliográficas

- AGARWAL, M., SHRIVASTAVA, N., PADH, H (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.*, 27, 617-631.
- AL-ZOREKY, N. S. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *Int. J. Food Microbiol.* 2009, 134, 244 – 248.
- BRAGA, L. C., SHUPP, J. W., CUMMINGS, C., JETT, M., TAKAHASHI, J. A., CARMO, L. S., ET AL. (2005). Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 335–339.



- DUMAN, A. D.; OZGEN, M.; DAYISOYLU, K. S.; ERBIL, N.; DURGAC, C. Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. *Molecules*, 2009, 14, 1808–1817.
- GIL, M. I., TOMAS-BARBERRAN, F. A., HESS-PIERCE, B., HOLCROFT, D. M., & KADER, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4581-4598.
- LANSKY, E. P., & NEWMAN, R. A. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 177–206.
- MURREY, M.G., THOMPSON, W.F (1908). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8, 4321-4325.
- SARKHOSH, A., ZAMANI, Z., FATAHI, R., & EBADI, A. (2006). RAPDmarkers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum* L) genotypes. *Scientia Horticulturae*, 111, 24–29.
- SINGH, R. P., CHIDAMBARA MURTHY, K. N., & JAYAPRAKASHA, G. K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 81-86.
- WELSH, J., MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Reseach*, v. 18, p. 7212-7218, 1990.
- WONG, H., YEOH, H., LIM, S., & LOOI, K. L. (1997). Design of primers for RAPD analyses of cassava, *Manihot esculenta*. *Phytochemistry*, 46(5), 805-810.