

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio-Norte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Anais

II Jornada Científica

Embrapa Meio-Norte



Teresina, 14 e 15 de setembro de 2016

Embrapa Meio-Norte
Teresina, PI
2016

Embrapa Meio-Norte

Av. Duque de Caxias, 5.650, Bairro Buenos Aires
Caixa Postal 01
CEP 64006-220, Teresina, PI
Fone: (86) 3198-0500
Fax: (86) 3198-0530
www.embrapa.br/meio-norte
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Unidade responsável pelo conteúdo e edição

Embrapa Meio-Norte

Comitê de Publicações

Presidente: *Jefferson Francisco Alves Legat*

Secretário-administrativo: *Jeudys Araújo de Oliveira*

Membros: *Ligia Maria Rolim Bandeira, Flavio Favaro Blanco, Luciana Pereira dos Santos Fernandes, Orlane da Silva Maia, Humberto Umbelino de Sousa, Pedro Rodrigues de Araujo Neto, Carolina Rodrigues de Araujo, Danielle Maria Machado Ribeiro Azevedo, Karina Neob de Carvalho Castro, Francisco das Chagas Monteiro, Francisco de Brito Melo, Maria Teresa do Rêgo Lopes, José Almeida Pereira*

Normalização bibliográfica e editoração eletrônica: *Orlane da Silva Maia*

Capa: *Luciana Pereira dos Santos Fernandes*

1ª edição

Publicação digitalizada (2016)

Revisores Ad hoc (Embrapa Meio-Norte)

Aderson Soares de Andrade Junior, Adriana Mello de Araújo, Alitieni Moura Lemos Pereira, Ana Lúcia Horta Barreto, Angela Puchnick Legat, Braz Henrique Nunes Rodrigues, Bruno de Almeida Souza, Cândido Athayde Sobrinho, Edson Alves Bastos, Fabíola Helena dos Santos Fogaça, Francisco José de Seixas Santos, Geraldo Magela Côrtes Carvalho, João Avelar Magalhães, Jorge Minoru Hashimoto, José Ângelo Nogueira de Menezes Júnior, José Lopes Ribeiro, Lúcio Flavo Lopes Vasconcelos, Maria Clideana Cabral Maia, Maurisrael de Moura Rocha, Paulo Fernando de Melo Jorge Vieira, Paulo Henrique Soares da Silva, Raimundo Bezerra de Araújo Neto, Ricardo Montalvan Del Aguila, Rosa Maria Cardoso Mota de Alcântara, Tânia Maria Leal, Teresa Herr Viola, Valdenir Queiroz Ribeiro

Comissão organizadora

Coordenador: *Edvaldo Sagrilo*

Membros: *José Oscar Lustosa de Oliveira Júnior, Bruno de Almeida Souza, Flávio Favaro Blanco, Izabella Cabral Hassum, Jefferson Francisco Alves Legat, Paulo Sarmanho da Costa Lima, Danielle Maria Machado Ribeiro Azevedo, Juliana Priscila Sussai, Magda Cruciol, Orlane da Silva Maia, Francisco de Assis David da Silva*

A linguagem escrita, os conceitos e opiniões emitidos nos resumos constantes desta publicação, são de inteira responsabilidade dos respectivos autores. A Comissão Organizadora não assume responsabilidades pelos dados e conclusões apresentadas nos trabalhos publicados nos anais desta jornada.

Todos os direitos reservados.

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Meio-Norte

Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Meio-Norte (2. : 2016 : Teresina, PI).

Anais da II Jornada Científica da Embrapa Meio-Norte / II Jornada Científica da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI, 13 a 14 de setembro de 2016. – Teresina : Embrapa Meio-Norte, 2016. 126 p.

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: <<http://www.cpamn.embrapa.br/jornada2016/downloads/EMBRAPAEBOOK.pdf>>.

1. Pesquisa científica. 2. Iniciação científica. 3. Agricultura. 4. Pecuária. 5. Tecnologia. I. Título. II. Embrapa Meio-Norte.

CDD 607

© Embrapa 2016

RESULTADOS PRELIMINARES DA COMPARAÇÃO DE TRÊS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE CAJUI

Maria Fernanda da Costa Gomes¹ Artemisa Nazaré Costa Borges² Jailson de Araújo Santos³
Sérgio Emílio dos Santos Valente⁴ Paulo Sarmanho da Costa Lima⁵

¹Mestranda em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, fernanda_mf2@hotmail.com

²Doutoranda em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pernambuco, Recife, PE.

³Graduado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI.

⁴Professor Associado II da Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI.

⁵Pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI.

RESUMO

O cajui (*Anacardium* spp.) é um dos frutos de ocorrência na Região Meio-Norte do Brasil que apresenta potencial econômico tanto para o mercado de frutas *in natura* como para o processamento. Entretanto, a exploração dá-se exclusivamente pelo extrativismo, onde não há estratégias de conservação, o que pode levar à perda de variabilidade genética. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos moleculares de caracterização da diversidade genética dessas espécies. Esses estudos requerem um método rápido e barato de extração de DNA. Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar três métodos de extração de DNA a partir de folhas de cajui com ênfase tanto na quantidade quanto na qualidade. O DNA genômico foi extraído de folhas jovens de dois indivíduos conforme as recomendações dos três métodos testados (Kit 01, Kit 02 e Orgânico). A concentração e qualidade das amostras foram estimadas através de espectrofotômetro e a integridade do DNA foi avaliada com base em gel de agarose 0,8%. Os métodos Kit 01 e Orgânico foram eficientes para a extração de DNA de folhas de cajui, enquanto o Kit 02 foi ineficiente. A escolha do método fica a critério do pesquisador, que pode optar pelo Kit 01 que não utiliza solventes orgânicos tóxicos, ou pelo método orgânico que apresenta menor custo.

PALAVRAS-CHAVE: *Anacardium* spp., estudos moleculares, isolamento de DNA.

INTRODUÇÃO

Uma das espécies frutíferas que ocorre na região Meio-Norte do Brasil é o cajuzeiro (*Anacardium* spp.) cujo fruto, o cajui, apresenta potencial econômico tanto para o mercado de frutas *in natura* como para o processamento. O aproveitamento do cajui envolve tanto o fruto, a castanha; como o pseudofruto que por sua vez possui teores consideráveis de açúcares, compostos fenólicos e minerais, sendo consumido *in natura* ou na produção de doces, temperos e bebidas (RUFINO et al., 2008).

As espécies de cajui são ainda utilizadas para fins medicinais como antioxidantes (BARBOSA FILHO et al., 2014) e desempenham um importante papel ecológico, caracterizando-se como a vegetação pioneira das dunas (CRESPO; SOUZA, 2014). Entretanto, a exploração das espécies de cajui dá-se exclusivamente pelo extrativismo onde não há estratégias de conservação o que pode levar à perda de variabilidade genética (RUFINO et al., 2008). Portanto, tornam-se necessários estudos moleculares de caracterização da diversidade genética dessas espécies para subsidiar os programas de conservação e melhoramento.

Esses estudos normalmente envolvem um grande número de amostras, necessitando de um método rápido e barato de extração de DNA que seja adaptado a espécie em estudo (SOUSA et al., 2014). Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar um protocolo baseado no cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) e dois kits de purificação comercial para a extração de DNA a partir de folhas jovens de cajui quanto à pureza e concentração do DNA extraído.

MATERIAL E MÉTODOS

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens de dois acessos de cajuí (38 e 39) coletados no Parque Nacional de Sete Cidades, Piauí, Brasil. As amostras foram identificadas, armazenadas em solução saturada de NaCl - CTAB e transportadas até o laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte, onde foram realizadas as extrações.

Três protocolos foram testados: kits 01 e 02 de purificação comercial baseados em membrana de afinidade, e método de extração orgânica baseado em CTAB. O material vegetal foi macerado na presença de nitrogênio líquido para os três métodos testados. O DNA foi extraído conforme as instruções do fabricante, para os Kits comerciais; e de acordo com o protocolo sugerido por Doyle e Doyle (1990) com modificações (utilizou-se 1000µl de tampão de extração) para o método orgânico.

Os ácidos nucleicos obtidos foram quantificados e analisados quanto à pureza por meio de um espectrofotômetro (Nanodrop®2000-2000C). Além disso, para analisar a integridade e estimar a concentração de DNA com base em um marcador DNA λ as amostras foram separadas em gel de agarose 0.8%, usando o agente intercalante GelRed com tampão de carregamento; e fotografadas sob luz ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração e pureza do DNA extraído das folhas de cajuí por meio dos três métodos de extração estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Concentração e pureza de amostras de DNA obtidas através de três métodos de extração de DNA genômico de cajuí (*Anacardium* spp.).

Protocolo	Acesso	Conc.(ng/µl) ¹	Razão A _{260/280}	Razão A _{260/230}	Conc.(ng/µl) ²
Kit 01	38	25,5	1,71	0,31	21,0
	39	197,9	1,87	1,16	8,0
	Média	111,7	1,79	0,74	14,5
Kit 02	38	3,5	1,08	2,05	0
	39	2,4	0,84	4,43	0
	Média	2,95	0,96	3,24	0
Orgânico	38	71,9	2,08	1,86	7,0
	39	688,7	2,10	2,33	7,0
	Média	380,3	2,09	2,10	7,0

¹Concentração de ácidos nucleicos estimada por meio de Nanodrop. ²DNA estimado por meio de comparação com o marcador de DNA λ baseado em eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Os resultados obtidos por meio do espectrofotômetro indicam que todos os métodos testados resultaram na obtenção de ácidos nucleicos, embora o Kit 02 tenha resultado em baixa concentração. Analisando o perfil eletroforético percebe-se que as maiores concentrações de DNA foram obtidas por meio do Kit 01(média 14,5 ng/µl), embora o método orgânico (7ng/µl) tenha resultado em concentração também suficiente para ser aplicada em futuros estudos moleculares (Figura 1).

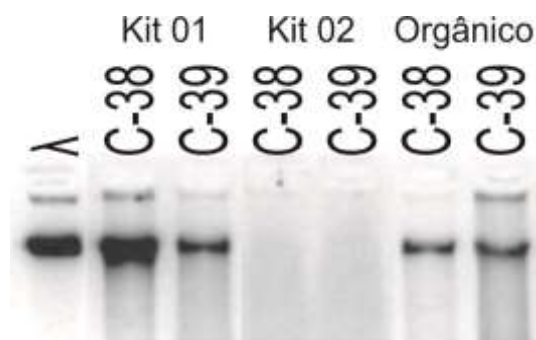


Figura 1. Perfil eletroforético de DNA extraído de folhas jovens de cajú pelos seguintes métodos: Kit 01, Kit 02 e Orgânico.

Além disso, tanto o Kti 01 quanto o método Orgânico resultaram na obtenção de DNA íntegro (Figura 1), importante característica requerida por muitas técnicas moleculares como reações de amplificação, digestões e clonagem (NUNES et al., 2011), ao passo que o Kit 02 foi ineficiente para a extração do DNA. Este fato pode ter sido acarretado possivelmente devido a uma lise ineficaz do material vegetal.

A pureza dos ácidos nucleicos pode ser estimada com base na razão $A_{260/280}$ onde um DNA puro encontra-se entre 1,8 e 2,0, e, de modo secundário, pela razão $A_{260/230}$ onde espera-se um valor entre 2,0 e 2,2 (LUCENA-AGUILAR et al., 2016). Desse modo, apenas o método orgânico encontra-se dentro dos valores esperados, indicando ter resultado em um DNA de qualidade (média $A_{260/280} = 2,09$ e a $A_{260/230} 2,1$).

O Kit 01 apresentou uma razão $A_{260/280}$ boa (média $\cong 1,8$), entretanto um valor discrepante para $A_{260/230}$ (0,74) o que indica contaminação por componentes das soluções do próprio método, como guanidina residual normalmente presente em kits baseados em colunas de ligação como o utilizado; ou ainda por metabólitos secundários da planta (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2011). Apesar do indício de contaminação e uma vez que a razão $A_{260/280}$ está dentro do padrão, o DNA obtido pelo Kit 01 pode ser considerado viável para aplicação em diversos experimentos em biologia molecular.

Agradecimentos: À Embrapa Meio-Norte pela infraestrutura.

CONCLUSÃO

Os métodos Kit 01 e Orgânico são eficientes para a extração de DNA de folhas de cajú.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA FILHO, V. M. et al. Phytochemical constituents, antioxidant activity, cytotoxicity and osmotic fragility effects of caju (*Anacardium microcarpum*). **Industrial Crops and Products**. v. 55, p. 280–288, Apr. 2014.
- CRESPO, M. de F. V.; SOUZA, L. I. de (Coord.). **Cajú:** boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável. Parnaíba: Comissão Ilha Ativa, 2014. 27 p.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg, v. 12, p. 13-15, 1990.
- LUCENA-AGUILAR, G. et al. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. **Biopreservation and Biobanking**, New Rochelle, v. 14, n. 4, p. 264-270, Aug. 2016.
- NUNES, C. F. et al. An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1383-1389, 2011.

RUFINO, M. do S. M. et al. Utilização atual do cajuí nativo da vegetação litorânea do Piauí, Brasil. **Proceedings of Interamerican Society of Tropical Horticulture**, San Jose, Costa Rica, v. 52, p. 147-149, 2008.

SOUSA, C. C. et al. Comparison of methods to isolate DNA from *Caesalpinia ferrea*. **Genetic and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 2, p. 4486-4493, 2014.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Assessment of nucleic acid purity**. Wilmington: NanoDrop, 2011. (NanoDrop Spectrophotometers. Technical Bulletin, T042). Disponível em:

<<http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>>. Acesso em: 26 jul. 2016.