

*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](http://www.embrapa.br/meio-norte)  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://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 Neoob 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 Flávio 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

# ANÁLISE COMPARATIVA DE TRÊS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA EM MANGABEIRA

Gizele de Andrade Luz<sup>1</sup>; Maria Fernanda da Costa Gomes<sup>2</sup>; Jailson de Araújo Santos<sup>3</sup>; Kelly Pires de Oliveira<sup>4</sup>; Sérgio Emílio dos Santos Valente<sup>5</sup>; Lúcio Flavo Lopes Vasconcelos<sup>6</sup>; Paulo Sarmanho da Costa Lima<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Mestre em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, [gizeledeandrade@gmail.com](mailto:gizeledeandrade@gmail.com)

<sup>2</sup>Mestranda em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, [fernanda\\_mf2@hotmail.com](mailto:fernanda_mf2@hotmail.com)

<sup>3</sup>Bacharel em Biologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, [j.santospi@hotmail.com](mailto:j.santospi@hotmail.com)

<sup>4</sup>Graduada em Biologia, Universidade Estadual do Piauí, Teresina, PI, [kelly\\_fenny@hotmail.com](mailto:kelly_fenny@hotmail.com)

<sup>5</sup>Professor da Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, [svalente2@yahoo.com.br](mailto:svalente2@yahoo.com.br)

<sup>6</sup>Pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI

## RESUMO

A mangabeira é uma frutadeira nativa do Brasil que se destaca pelo potencial de exploração de seus frutos. Essa espécie está em processo de erosão genética ressaltando-se a importância do desenvolvimento de estudos moleculares que subsidiem programas de conservação e melhoramento. Para a realização dessas análises moleculares é necessário a obtenção de um DNA em quantidade e qualidade adequadas. Portanto, este estudo objetivou avaliar três protocolos de extração de DNA a partir de folhas jovens frescas e desidratadas de mangabeira. A integridade do DNA foi visualizada em gel de agarose e a concentração no Qubit e NanoDrop, sendo que no último também foi estimada a pureza das amostras. Então, foi realizado um teste de PCR com o DNA extraído utilizando iniciador ISSR. Com o kit 2 obteve-se baixa concentração de DNA extraído a partir de folhas frescas e a quantidade de DNA elevou-se consideravelmente na extração a partir de folhas desidratadas. Com a extração orgânica não se obteve resultados satisfatórios. Assim, o Kit 1 foi o mais indicado para obtenção de DNA íntegro em concentração e qualidade aceitáveis para folhas frescas e desidratadas de mangabeira.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Hancornia speciosa*, membrana de afinidade, extração orgânica

## INTRODUÇÃO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma espécie nativa do Brasil da família Apocynaceae que se destaca pelo potencial de exploração de seus frutos, a mangaba, de sabor e aroma agradáveis (MARTINS et al., 2012). Apesar do potencial econômico, a exploração dessa espécie em processo de erosão genética é realizada essencialmente de forma extrativista ressaltando-se, desse modo, a importância do desenvolvimento de estudos moleculares que subsidiem programas de conservação e melhoramento genético (SÁ; LÉDO; LÉDO, 2011).

Para estudos genéticos, os marcadores moleculares são amplamente utilizados. Essa técnica não é influenciada pelo ambiente e possui várias aplicações, tais como na análise filogenética e em estudos de diversidade genética, sendo uma forma rápida e precisa de distinguir os indivíduos (GROVER; SHARMA, 2016). Entretanto, para a realização desses estudos moleculares é essencial a obtenção de um DNA em quantidade e qualidade adequadas. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar três protocolos de extração de DNA a partir de folhas jovens frescas e desidratadas de mangabeira.

## MATERIAL E MÉTODOS

Folhas jovens coletadas de dois acessos de mangabeira do Banco de Germoplasma da Embrapa Meio-Norte foram envolvidas em papel toalha e colocadas dentro de sacos plásticos hermeticamente fechados, sendo transportadas em contato com gelo até o laboratório. A outra parte dessas folhas foi mantida em sacos plásticos hermeticamente fechados contendo sílica por 24 horas para desidratação. Foi realizada a extração de DNA dessas folhas a partir de três protocolos. Nos métodos 1 e 2 o DNA foi extraído, respectivamente, por membrana de afinidade (kit 1) e membrana de afinidade mais proteinase K (kit 2) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante, exceto a lise e homogeneização realizada no Precellys a 6600 rpm com 2 ciclos de 20 segundos. No método 3 foi realizada a extração orgânica do DNA de mangabeira segundo a metodologia proposta por Doyle e Doyle (1990), salvo algumas modificações. Adicionou-se 1000 µL de tampão de extração e a lise e homogeneização foi realizada no Precellys como descrito acima.

A análise da concentração do DNA foi realizada no Qubit (Invitrogen) e no NanoDrop (Thermo scientific), sendo que no último também mensurou-se a pureza das amostras pelas razões A260/A280 e A260/A230. A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose (0,8%), corado com GelRed e fotodocumentado sob luz ultravioleta. Além disso, foi realizado um teste de PCR com o DNA extraído pelos três métodos com o iniciador UBC 857. As reações de amplificação do DNA foram realizadas nas seguintes concentrações: 1X de tampão [20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl] (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 1 mM de dNTP, 0,4 µM de iniciador, 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 7 ng de DNA e água ultrapura em um volume final de 10 µL. As reações foram conduzidas em termociclador Veriti™ 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 1 ciclo de 94°C-1'30"; 40 ciclos (94°C-40", 55°C-45", 72°C-2"); 72°C-7'. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose (1,5%), na cuba 11x14 conduzido a 80 V por 2,5 horas, corados com GelRed e fotodocumentados sob luz ultravioleta.

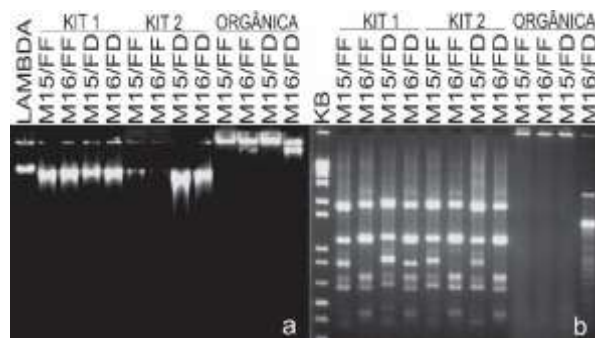
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eficiência dos protocolos de extração é estimada pela concentração e pureza do DNA. Geralmente, o DNA é considerado puro quando as razões A260/A280 e A260/A230 estão, respectivamente, entre 1,8 e 2,0 e de 2 a 2,2 (LUCENA-AGUILAR et al., 2016). Os três métodos de extração mostraram diferenças quanto à qualidade e quantidade do DNA (Tabela 1).

**Tabela 1.** Comparação dos três métodos de extração quanto a média da quantidade e qualidade do DNA obtido a partir de folhas jovens frescas e desidratadas de mangabeira.

| Método   | Estado da folha | NanoDrop     |           |           | Qubit        |
|----------|-----------------|--------------|-----------|-----------|--------------|
|          |                 | Concentração | A260/A280 | A260/A230 | Concentração |
| Kit 1    | Folha fresca    | 30,35 ng/µL  | 2,09      | 2,11      | 22 ng/µL     |
|          | Desidratada     | 24,65 ng/µL  | 2,17      | 2,27      | 18,15 ng/µL  |
| Kit 2    | Folha fresca    | 28,4 ng/µL   | 1,73      | 0,22      | 2,22 ng/µL   |
|          | Desidratada     | 133,65 ng/µL | 1,91      | 1,13      | 24,9 ng/µL   |
| Orgânica | Folha fresca    | 232,15 ng/µL | 1,44      | 0,51      | 9,95 ng/µL   |
|          | Desidratada     | 511,4 ng/µL  | 1,7       | 0,98      | 12,3 ng/µL   |

O kit 1 possibilitou a obtenção de DNA íntegro em boa concentração, sendo a média no NanoDrop e Qubit, respectivamente, 30,35 ng/µL e 22 ng/µL para folhas frescas e de 24,65 ng/µL e 18,15 ng/µL para folhas desidratadas. As razões A260/A280 e A260/A230 foram, respectivamente, 2,09 e 2,11 para folhas frescas e de 2,17 e 2,27 para folhas desidratadas (Tabela 1 e Figura 1a). Assim, o DNA extraído com kit 1 mostrou-se adequado para análises moleculares que utilizam a reação em cadeia da polimerase (PCR) como verificado na Figura 1b.



**Figura 1** - Perfil eletroforético das amostras de DNA extraídas a partir de folhas jovens frescas e desidratadas de mangabeira com os Kit 1, Kit 2 e método orgânico. **a:** Visualização da integridade do DNA em agarose 0,8%; **b:** Padrão de bandas obtido com a amplificação do DNA extraído com o iniciador UBC 857.

Baixas concentrações de DNA foram obtidas a partir de folhas frescas com o kit 2, sendo a média 28,4 ng/μL no NanoDrop e 2,22 ng/μL no Qubit. Na extração a partir de folhas desidratadas obteve-se DNA íntegro com a concentração média de 133,65 ng/μL no NanoDrop e de 24,9 ng/μL no Qubit (Tabela 1 e Figura 1a). Essa diferença na concentração de DNA a partir do estado da folha pode estar relacionada à maior facilidade de maceração do tecido seco. Pelas razões A260/A280 e A260/A230, as amostras mostraram-se contaminadas por metabólicos secundários ou outros compostos utilizados na extração que absorvem em 230 nm. Pelo teste de PCR, obteve-se uma amplificação adequada para os acessos M15 e M16 com o iniciador UBC 857 para o DNA extraído a partir dos dois estados das folhas, apesar da contaminação e baixa concentração do DNA obtido a partir de folhas frescas (Figura 1b).

A extração orgânica não proporcionou a obtenção de resultados satisfatórios, sendo que o DNA apresentou-se retido ou próximo ao poço que evidencia contaminação por polissacarídeos. Além disso, as razões A260/A280 e A260/A230 demonstraram que o DNA estava impuro. As concentrações médias de DNA inferidas pelo NanoDrop e Qubit foram, respectivamente, 232,15 ng/μL e 9,95 ng/μL para folhas frescas e de 511,4 ng/μL e 12,13 ng/μL para folhas desidratadas (Tabela 1 e Figura 1a). Em relação a PCR realizada com as amostras extraídas pelo método orgânico, somente o DNA do acesso M16 proveniente de folha desidratada amplificou, entretanto, o padrão de bandas apresentou-se diferentes das demais amostras que pode ser em consequência da presença de contaminantes como polissacarídeos que podem atuar como inibidores de PCR ou promover a amplificação ineficiente (DEMEKE; JENKINS, 2010).

A extração orgânica é um método econômico para o isolamento de DNA, entretanto a mesma utiliza compostos tóxicos. Já a utilização de kits comerciais, apesar de serem mais caros, é um método rápido e seguro em que não há exposição a solventes orgânicos como clorofórmio.

## CONCLUSÕES

O kit 1 é o método mais indicado para extração de DNA íntegro, em boa concentração e de qualidade em mangabeira a partir de folhas jovens frescas ou desidratadas, sendo que o uso de folhas desidratadas é uma opção adequada, principalmente quando o material vegetal encontra-se em áreas distantes do local de extração.

**Agradecimentos:** Ao Macroprograma 1, à UFPI e UESPI pelo suporte acadêmico e a Embrapa Meio-Norte pela disponibilização de sua infraestrutura.

## REFERÊNCIAS

- DEMEKE, T.; JENKINS, G. R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 396, n. 6, p. 1977-1990, 2010.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg, v. 12, p. 13-15, 1990.
- GROVER, A.; SHARMA, P. C. Development and use of molecular markers: past and present. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 36, n. 2, p. 290-302, 2016.
- 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.
- MARTINS, G. V. et al. Diversity and genetic structure in natural populations of *Hancornia speciosa* var. *speciosa* Gomes in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 34, n. 4, p. 1143-1153, 2012.
- SÁ, A. J. et al. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 57-62, 2011.