

Fortaleza, CE / Novembro, 2024

Metodologia não destrutiva de extração de DNA em semente do cajueiro

Érika Beatriz de Lima Castro⁽¹⁾, Men de Sá Moreira de Souza Filho⁽²⁾ e Patricia do Nascimento Bordallo⁽²⁾⁽¹⁾ Engenheira-agrônoma, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. ⁽²⁾ Pesquisadores, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE.

Introdução

A caracterização e avaliação de acessos em Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) são etapas essenciais para conhecer e acessar a variabilidade genética dos materiais conservados. Isso auxilia na escolha de quais deles são mais promissores para os programas de melhoramento genético (Oliveira et al., 2020). Conservar a diversidade genética das culturas agrícolas é importante para que se tenha base genética disponível (alelos) para possíveis adaptações que possam ser necessárias no futuro (Burle, 2019), devido ao aparecimento de novas pragas e doenças, bem como mudanças climáticas.

A caracterização dos acessos conservados é feita por meio do uso de descritores, que se baseiam em características da planta, sendo eles: morfológicos, agronômicos, fisiológicos, moleculares, dentre outros (Faleiro et al., 2020). No entanto, o uso de todos esses descritores pode exigir muito trabalho, tempo e recursos, atrasando o processo de caracterização (Oliveira et al., 2020). Uma maneira de entender a diversidade genética é a partir da utilização de marcadores moleculares, que são como “impressões digitais” genéticas das plantas (Paiva et al., 2019), como *Single-Nucleotide Polymorphisms* (SNP), *Simple Sequence Repeats* (SSR), *Amplified Fragment Length Polymorphism*

(AFLP), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) e *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) (Dwiningsih; Rahmaningsih; Alkahtani, 2020).

Para realizar essa caracterização molecular, deve-se, primeiramente, realizar a extração do DNA a partir do material vegetal do indivíduo. Em geral, a extração é realizada utilizando-se o tecido foliar. Porém, quando realizada a partir de sementes, permite que a caracterização molecular seja realizada independentemente da fase da planta e antes da semeadura, economizando tempo e espaço (Von Post et al., 2003). Com isso, é possível acelerar as análises genéticas de genótipos, caracterizar e eliminar sementes que possuam características genéticas indesejáveis antes de levá-las ao campo (Ma et al., 2019). No entanto, é importante garantir que essa extração de DNA das sementes não danifique o embrião e deixe endosperma suficiente para que as sementes ainda possam germinar (Zheng et al., 2015).

Atualmente, a maior parte da conservação do cajueiro é feita por meio de plantas no campo e sob a forma de sementes em câmara fria (Castro, 2020). No entanto, alguns acessos coletados só estão conservados sob a forma de sementes, pois são resultado de coletas em regiões geograficamente distantes e a sua implementação em campo para estudos é mais demorada. Por isso, desenvolver ou adaptar

metodologias de extração de DNA diretamente da semente é fundamental, facilitando e agilizando o processo de análise genética. Estudos realizados em cajueiro, buscando facilitar essa extração, podem simplificar e otimizar muitas etapas, permitindo a obtenção de resultados de forma mais rápida.

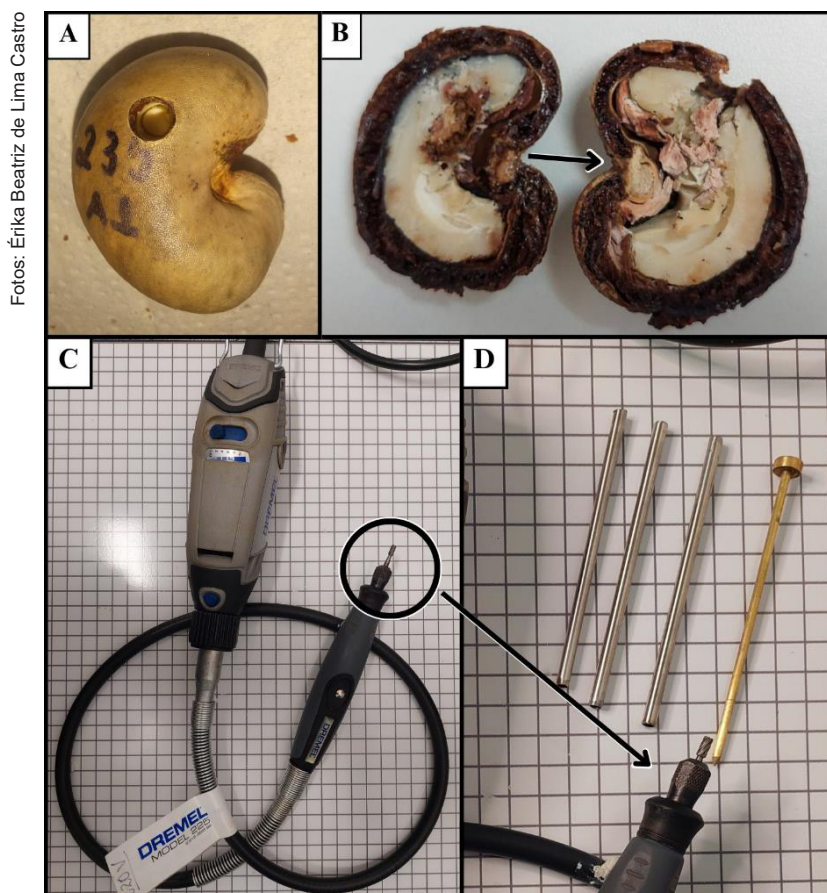
Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para coleta de tecido vegetal a partir de semente de cajueiro para extração de DNA, de modo a não comprometer a germinação futuras das sementes.

Material vegetal e coleta do endosperma

Sementes do clone CCP 06 (BGC 522, safra 2022) foram utilizadas para o desenvolvimento da metodologia. O acesso ao patrimônio genético foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados do Ministério do Meio Ambiente (SISGEN, MMA Brasil) sob o número AF2BAA5, nos termos da

Lei nº 13.123/2015 e suas regulamentações subsequentes (Brasil, 2015).

As sementes foram perfuradas na porção mais distal em relação à posição do embrião (Figuras 1A e 1B) com o auxílio de uma minirretífica (marca Dremel, USA) (Figura 1C), com uma broca do tipo escariadora nº 194 (1/8 polegadas) até atingir o endosperma. Uma pequena amostra do endosperma (≥ 20 mg) foi coletada com um tubo de aço, previamente autoclavado, de 3 mm de diâmetro (Figura 1D) e imediatamente colocada no microtubo com o auxílio de um pino, este também de aço (Figura 1D). Um novo tubo autoclavado foi utilizado para cada amostra. Os tubos de aço foram usados para retirar a quantidade necessária de endosperma de forma mais fácil e sem perdas, pois o diâmetro é semelhante ao da broca utilizada. É importante notar que as dimensões do tubo de aço foram definidas em função do tamanho da broca. Assim, foram adquiridos no diâmetro desejado e cortados no comprimento de 10 cm, sendo suas extremidades afiadas para facilitar a remoção de parte da semente.



Fotos: Érika Beatriz de Lima Castro

Figura 1. Sementes do clone CCP 06 de *Anacardium occidentale* L. perfuradas e equipamentos utilizados. (A) Visão externa; (B) Visão interna (a seta preta indica a posição do embrião); (C) minirretífica; (D) tubos de aço utilizados para retirada do endosperma.

Material selante e teste de germinação

Para selar o orifício aberto com a broca e preservar a semente, foi utilizado cimento-cola preparado de acordo com as instruções do fabricante e inserido com o auxílio de uma seringa de 3 mL. Após a secagem, realizou-se o teste de germinação com dois tratamentos: sementes perfuradas e seladas; sementes não perfuradas (sementes controle), com 100 sementes por tratamento num delineamento inteiramente casualizado (DIC). As sementes de cada tratamento foram semeadas em tubetes (288 mL) com substrato comercial (Germina Plant) e avaliadas uma vez por semana, pelo período de um mês, para quantificar a emergência. Os experimentos de germinação foram conduzidos no viveiro de produção de mudas da Embrapa Agroindústria Tropical, em Pacajus, CE. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, por meio do software Genes (Cruz, 2016).

A germinação das sementes perfuradas do clone CCP 06 foi de 60%, ao passo que 81% das não perfuradas (controle) germinaram. Não foram constatadas diferenças visuais e estruturais discrepantes entre as plantas produzidas a partir das sementes perfuradas e não perfuradas. No entanto, constatou-se que os resultados para a germinação foram significativos, indicando que estatisticamente existe diferença entre perfuradas e não perfuradas.

Extração de DNA das sementes do clone CCP 06

Adaptações foram feitas a fim de melhorar os resultados da extração, como o armazenamento das amostras de endosperma em ultrafreezer a -80 °C para evitar oxidação e manter a integridade até o início da extração de DNA. Não foi utilizado nitrogênio líquido para evitar o endurecimento devido ao congelamento da amostra dentro do microtubo.

A solução de lise foi adicionada diretamente no microtubo, e a amostra foi macerada com o auxílio de um pistilo de plástico autoclavado, a fim de evitar possíveis contaminações e perda do material durante a transferência do cadinho para o microtubo.

Recomenda-se que haja treinamento prévio do operador da minirretífica, a fim de evitar a retirada de endosperma em excesso e/ou danos maiores nas sementes.

Para a extração do DNA, foi utilizado o kit comercial Wizard Genomic DNA Purification kit. Após esse processo, o DNA de todas as amostras foi quantificado em espectrofotômetro, sendo o DNA total visualizado em gel de agarose a 0,8% (Figura 2). A metodologia desenvolvida, aliada à extração utilizando-se o kit comercial Wizard Genomic DNA Purification kit, resultou em quantidade suficiente e qualidade aceitável de DNA.

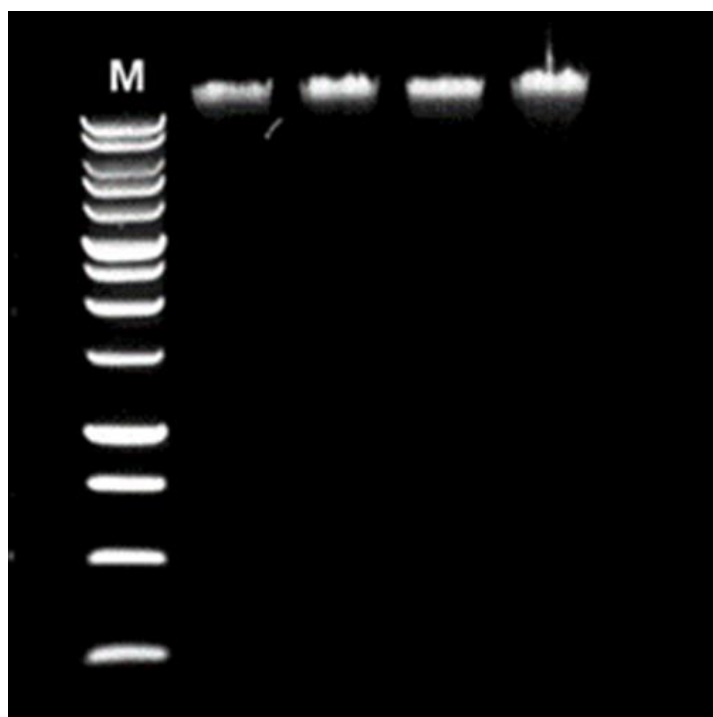


Foto: Érika Beatriz de Lima Castro

Figura 2. Gel de agarose mostrando os resultados das extrações de DNA total de quatro amostras do clone CCP 06 de *Anacardium occidentale* L.

PCR para verificar a viabilidade do DNA extraído

A verificação da viabilidade do DNA extraído do clone CCP 06 com a metodologia desenvolvida foi realizada por meio de reações de PCR utilizando-se três *primers* do tipo ISSR (Tabela 1).

As concentrações adotadas para o volume final de 20 µL consistiram em: tampão da PCR 1X; MgCl₂ 2 mM; dNTP 0,2 mM; 1U Taq DNA polimerase; 0,8 µM de *primer*; 20 ng de DNA; e água ultrapura

para completar o volume final. Para as reações de PCR, as amostras foram amplificadas utilizando-se termociclador (*Applied Biosystems*, modelo Veriti 96 – *Well Thermal Cycler*) nas seguintes etapas: (I) desnaturação inicial do DNA a 94 °C por 5 minutos; (II) 40 ciclos a 94 °C por 1 minuto; anelamento durante 40 segundos a temperaturas específicas para cada *primer* (Tabela 1); extensão por 2 minutos a 72 °C; e (III) extensão final do DNA por 5 minutos a 72 °C. Os resultados das amplificações podem ser verificados na Figura 3.

Tabela 1. *Primers* ISSR utilizados em amplificações de DNA do clone CCP 06 de *Anacardium occidentale* L.

<i>Primers</i> ISSR	Sequência completa (5'-3')	Ta (°C)
I826	(AC) ₈ C	47.1
I834	(AG) ₈ YT	50.4
I846	(CA) ₈ RT	50.0

Ta = temperatura de anelamento; Y = C ou T; R = A ou G.

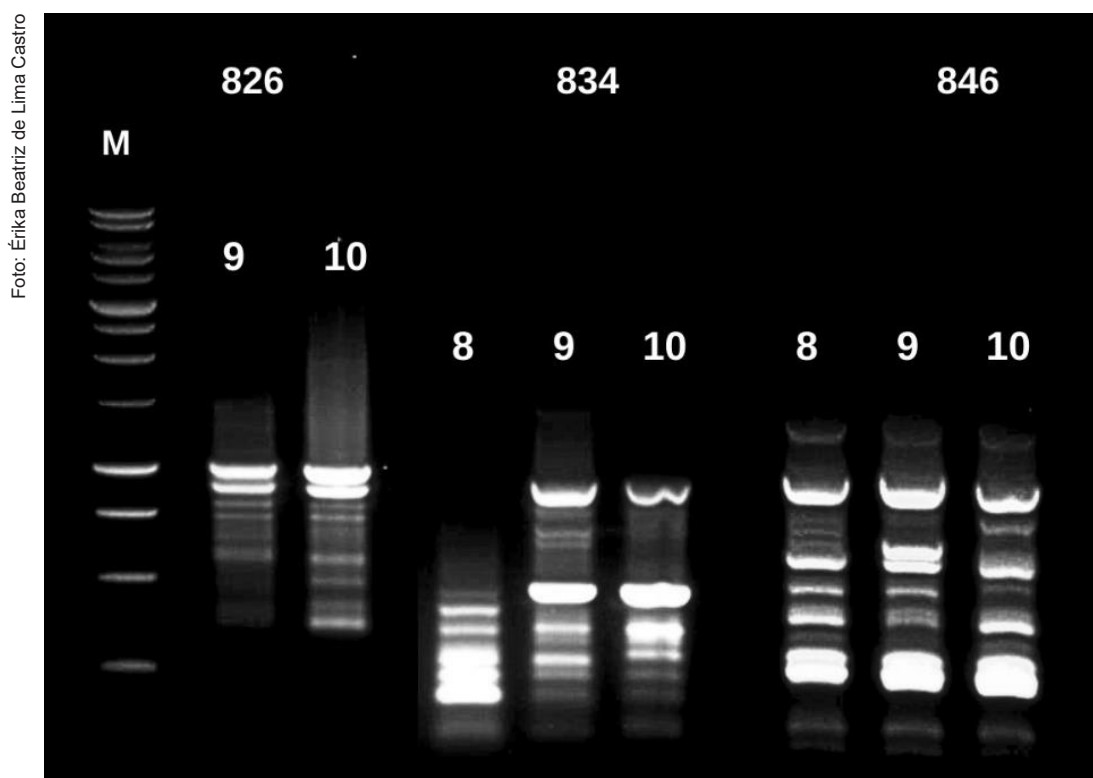


Foto: Érika Beatriz de Lima Castro

Figura 3. Resultado da amplificação do DNA do clone CCP 06 de *Anacardium occidentale* L. com os *primers* ISSR I826, I834 e I846. Amostras 8–10: DNA da semente extraído com *Wizard Genomic DNA Purification kit*; M: marcador de peso molecular de 1 Kb.

Validação do protocolo em sementes de cajueiro do Cerrado

Para validar o protocolo desenvolvido, este foi testado em cinco sementes do acesso BGC 676 (safra 2019), integrante do BAG Caju, coletado no Cerrado brasileiro, no município de Campos Belos, Goiás (13°00'24" S e 46°36'11" W, 633 m de altitude). O DNA total foi quantificado e visualizado em gel de agarose a 0,8%. Para a validação da reação de PCR, foi utilizado um marcador do tipo ISSR [primer I848: sequência completa 5'-3': (CA

8RG], seguindo as condições de PCR, conforme descrito anteriormente para o clone CCP 06.

Os resultados do DNA total e a quantificação para as cinco amostras extraídas do acesso BGC 676 são apresentados na Figura 4 e na Tabela 2, respectivamente. Com isso, foi possível visualizar as bandas de DNA para todas as amostras. A qualidade do DNA, indicado pelas razões 260/280 e 230/260, também não foi um fator limitante para o uso posterior em técnicas que utilizam marcadores moleculares.

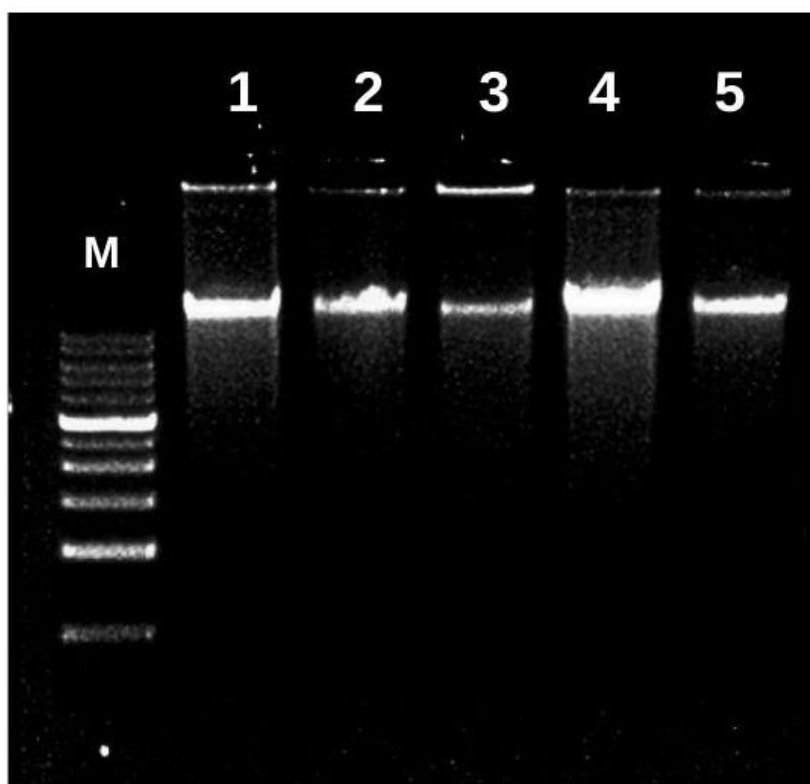


Foto: Érika Beatriz de Lima Castro

Figura 4. Resultado da extração de DNA do acesso BGC 676 de *Anacardium occidentale* L. por meio do Wizard Genomic DNA Purification kit. Os números em cada coluna do gel correspondem à identificação das sementes utilizadas; M: marcador de peso molecular de 1 Kb.

Tabela 2. Quantificação de DNA do acesso BGC 676 de *Anacardium occidentale* L.

ID	Concentração (ng/μL)	260/280	260/230
01	157,7	1,81	1,6
02	137,6	1,77	1,56
03	118,9	1,58	0,8
04	111,5	1,68	1,24
05	65,2	1,71	1,24

O teste de viabilidade do DNA extraído de cada semente foi realizado por meio de PCR com marcador do tipo ISSR (I848). Ocorreu amplificação em todas

as amostras (Figura 5), indicando que o material pode ser utilizado para análises posteriores, como, por exemplo, análises de divergência genética.

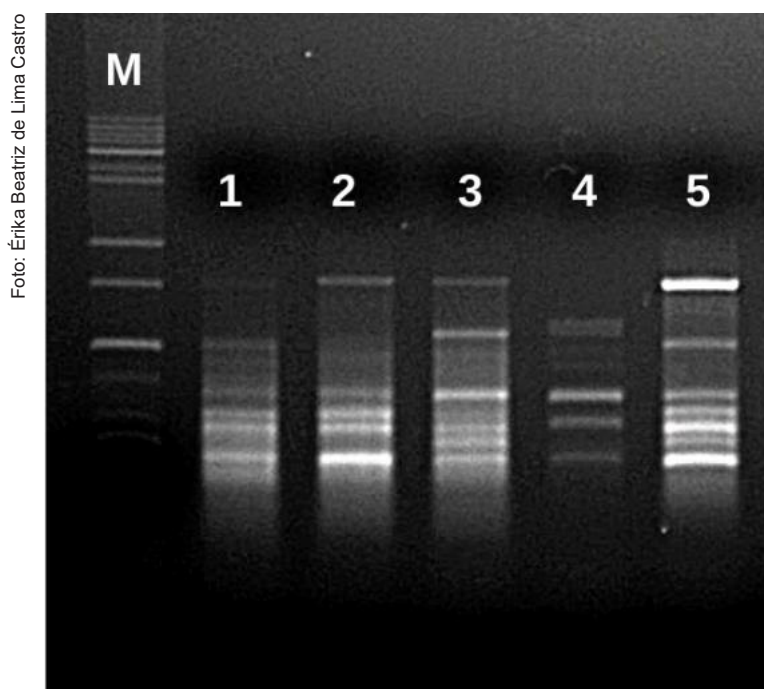


Figura 5. Resultado da PCR com *primer* ISSR 848 para DNA extraído de sementes do acesso BGC 676 de *Anacardium occidentale* L. para validação da metodologia de extração. Os números em cada coluna do gel correspondem à identificação das sementes utilizadas; M: marcador de peso molecular de 1 Kb.

Considerações finais

A metodologia apresentada para extração de DNA a partir do endosperma da semente de cajueiro mostrou-se eficaz. O cimento-cola possibilitou satisfatoriamente a vedação da perfuração na semente. Outros kits comerciais de extração também podem ser utilizados para a extração de DNA a partir de amostras do endosperma de cajueiro para uso em técnicas de PCR baseadas em marcadores moleculares. A escolha poderá levar em conta a relação custo-benefício. Com a utilização desse método de extração diretamente na semente, é possível otimizar o tempo, a operação e a realização de extração de muitas amostras por dia, além da economia de recursos na produção de mudas visando à extração de DNA utilizando-se o tecido foliar.

Agradecimentos

À Cândida Hermínia Campos de Magalhães, Ana Cecília Ribeiro de Castro e Ingrid Bernardo de Lima Coutinho pela revisão da versão inicial do documento; a Adriano Lincoln Albuquerque Mattos

pela confecção dos tubos de aço utilizados para a coleta de amostras.

Referências

BURLE, M. L. **Conservação de recursos genéticos vegetais na Embrapa**: histórico e perspectivas futuras. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019. 14 p.

BRASIL. **Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015.**

Determina que “considera-se parte do patrimônio genético existente no território nacional, para os efeitos da Lei, o microrganismo que tenha sido isolado a partir de substratos do território nacional, do mar territorial, da zona econômica exclusiva ou da plataforma continental”. Brasília, DF, 2015. Disponível em: <https://legislacao.presidencia.gov.br/atos/?tipo=LEI&numero=13123&ano=2015&ato=9a0ITU65UNVpWTc7b>.

Acesso em: 21 nov. 2024.

CASTRO, A. C. R. Banco ativo de germoplasma de cajueiro: Embrapa Agroindústria Tropical. In: PÁDUA, J. G.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; MELO, S. C. M. (ed.). **Bancos e coleções de germoplasma da Embrapa**:

conservação e uso. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020.

CASTRO, E. B. L. **Metodologia não destrutiva de extração de DNA a partir da semente do cajueiro e diversidade genética de acessos de cajueiro do Cerrado**. 2023. 66 f. Graduação (Bacharel em Agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

CRUZ, C. D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 38, n. 4, p. 547-552, 2016.
DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i4.32629>.

DWININGSIH, Y.; RAHMANSINGH, M.; ALKAHTANI, J. Development of single nucleotide polymorphism (SNP) markers in tropical crops. **Advance Sustainable Science, Engineering and Technology**, v. 2, n. 2, p. 1-13, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.26877/asset.v2i2.6279>.

FALEIRO, F. G.; OLIVEIRA, J. da S.; WALTER, B. M. T.; JUNQUEIRA, N. T. V. O gênero *Passiflora*: diversidade, conservação e uso. In: FALEIRO, F. G.; OLIVEIRA, J. da S.; WALTER, B. M. T.; JUNQUEIRA, N. T. V. (ed.). **Banco de germoplasma de *Passiflora* L. 'Flor da Paixão'**: caracterização fenotípica, diversidade genética, fotodocumentação e herborização. Brasília, DF: Prolimpress, 2020. 140 p.

MA, Z.; WANG, Y.; WEI, W.; RU, Z. A new, harmless, high-throughput endosperm-based DNA extraction method for wheat. **Ciência Rural**, v. 49, n. 9, p. 1-10, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170936>.

OLIVEIRA, J. da S.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. Recursos genéticos e caracterização morfo-agronômica. In: FALEIRO, F. G.; OLIVEIRA, J. da S.; WALTER, B. M. T.; JUNQUEIRA, N. T. V. O. (ed.). **Banco de germoplasma de *Passiflora* L. 'Flor da Paixão'**: caracterização fenotípica, diversidade genética, fotodocumentação e herborização. Brasília, DF: Prolimpress, 2020. 140 p.

PAIVA, S. R.; TEIXEIRA, F. F.; RAMOS, S. R. R.; MACHADO, C. de F.; MAZZOCATO, A. C.; LAMEIRA, O. A.; LEITE, D. L.; CASTRO, A. C. R. de; MELLO, S. C. M. de; SILVA, J. B. T. da; AZEVEDO, V. C. R. Caracterização de recursos genéticos. In: PAIVA, S. R.; ALBUQUERQUE, M. do S. M.; SALOMÃO, A. N.; JOSÉ, S. C. B. R.; MOREIRA, J. R. de A. (ed.). **Recursos genéticos**: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019. 298 p.

VON POST, R.; VON POST, L.; DAYTEG, C.; NILSSON, M.; FORSTER, B. P.; TUVESON, S. A high-throughput DNA extraction method for barley seed. **Euphytica**, v. 130, p. 255-260, 2003.
DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1022863006134>.

ZHENG, X.; HOEGENAUER, K. A.; MAEDA, A. B. V.; WANG, F.; STELLY, D. M.; NICHOLS, R. L.; JONES, D. C. Non-destructive high-throughput DNA extraction and genotyping methods for cotton seeds and seedlings. **BioTechniques**, v. 58, n. 5, p. 234-243, 2015.
DOI: <https://doi.org/10.2144/000114286>.

Embrapa Agroindústria Tropical
Rua Pernambuco, 2.270, Pici
60511-110 Fortaleza, CE
www.embrapa.br/agroindustria-tropical
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente: José Roberto Vieira Junior

Secretária-executiva: Celli Rodrigues Muniz

Membros: Afrânio Arley Teles Montenegro, Aline Saraiva Teixeira, Eveline de Castro Menezes, Francisco Nelsieudes Sombra Oliveira, Helenira Ellery Marinho Vasconcelos, Kirley Marques Canuto, Laura Maria Bruno, Marlon Vagner Valentim Martins, Pablo Busatto Figueiredo, Roselayne Ferro Furtado e Sandra Maria Moraes Rodrigues

Comunicado Técnico 287

ISSN 1679-6535

Novembro, 2024

Edição executiva: Celli Rodrigues Muniz

Revisão de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica: Rita de Cassia Costa Cid (CRB-3/624)

Projeto gráfico: Leandro Sousa Fazio

Diagramação: José Cesamildo Cruz Magalhães

Publicação digital: PDF



Ministério da
Agricultura e Pecuária

Todos os direitos reservados à Embrapa.