

---

## EXTRAÇÃO DE DNA EM MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes)

NASCIMENTO, Ana Letícia Sirqueira<sup>1</sup>  
SÁ, Aline Jesus<sup>2</sup>  
LEDO, Ana da Silva<sup>3</sup>  
SILVA, Ana Veruska Cruz<sup>3</sup>

---

Recebido em: 2017.03.22

Aprovado em: 2017.07.20

ISSUE DOI: 10.3738/1982.2278.2727

---

**RESUMO:** A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes – Apocynaceae) é uma planta nativa do Brasil, com crescente devastação nas áreas de ocorrência natural. Estudos de diversidade genética tem sido desenvolvidos para elaboração de estratégias de conservação da espécie. Devido à demanda de pesquisadores interessados na busca de um protocolo padronizado para extração de DNA de mangabeira, o presente trabalho foi desenvolvido para avaliar a eficiência de protocolos de extração de DNA na aplicação de técnicas moleculares em amostras da espécie. Foram utilizadas folhas jovens provenientes de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado em Itaporanga d'Ajuda, Sergipe. Foram testadas quatro protocolos e os ácidos nucleicos obtidos foram quantificados em espectrofotômetro. Três amostras com as maiores concentrações de DNA foram utilizadas nos diferentes protocolos para a PCR-ISSR utilizando seis primers (UBC 864, UBC 848, UBC 835, UBC 817, UBC 811 e UBC 80). A análise conjunta da quantificação e amplificação da PCR sugere a recomendação do protocolo de extração 2 (PE2) para extração de DNA de mangabeira.

**Palavras-chave:** Frutas nativas. Recursos genéticos. Marcadores moleculares

### DNA extraction in mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes)

**SUMMARY:** Mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes – Apocynaceae) is a native plant of Brazil, with increasing devastation in areas of natural occurrence. Studies of genetic diversity have been developed for the elaboration of strategies of conservation. Due to the demand of researchers interested in the search for a standardized protocol for extraction of DNA, the present work was developed to evaluate the efficiency of DNA extraction protocols in the application of molecular techniques in samples of the species. Young leaves were obtained from accessions of the Germplasm Bank of Embrapa Tabuleiros Costeiros, located in Itaporanga d'Ajuda, Sergipe. Four protocols were tested and the nucleic acids obtained were quantified in spectrophotometer. Three samples with the highest concentrations of DNA were used in the different protocols for the PCR-ISSR using six primers (UBC 864, UBC 848, UBC 835, UBC 817, UBC 811 and UBC 80). The joint analysis of PCR quantification and amplification suggests the recommendation of extraction protocol 2 (PE2) for the DNA extraction in mangaba.

**Keywords:** Native fruits. Genetic resources. Molecular markers

---

## INTRODUÇÃO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes - Apocynaceae) é uma planta nativa do Brasil, e está entre as primeiras espécies frutíferas cuja ocorrência foi relatada pelos exploradores da costa do Brasil no século XVI, pois apresenta ampla distribuição geográfica (LIMA, 1957). É uma espécie típica dos Cerrados, tabuleiros costeiros e baixada litorânea do Nordeste (SILVA JUNIOR; LÉDO, 2006). O potencial para o aproveitamento do seu fruto, a mangaba, é bastante variado, sendo utilizada para o

---

<sup>1</sup> UFS

<sup>2</sup> IFS-SE

<sup>3</sup> Embrapa Tabuleiros Costeiros

consumo *in natura* e industrialização de polpa, sucos, coquetéis, doces em calda, geleias, sorvetes, licores, vinhos e xaropes, demonstrando potencial para a agroindústria. A mangaba apresenta alto valor nutritivo, medicinal e econômico (FERREIRA; MARINHO, 2007).

É a região Nordeste que se destaca na produção do fruto. Houve um declínio na produção no triênio 2011-2013, entretanto, em 2014 a produção foi de 685 toneladas (CONAB, 2015). Entre os fatores que contribuíram para a diminuição destas áreas está o desmatamento da vegetação nativa, motivo que impulsionou a formação de bancos de germoplasma de mangabeira, uma tentativa de garantir a conservação da diversidade genética da espécie.

Algumas pesquisas já foram realizadas com o intuito de descrever diversidade genética em populações naturais de mangabeira e também em acessos de bancos de germoplasma. Mas por serem recentes e limitados, esses estudos devem continuar sendo desenvolvidos para garantir a geração de mais informações sobre tais aspectos e assim subsidiar estratégias para programas de conservação e melhoramento genético da espécie.

No processo de caracterização genética utilizando-se técnicas moleculares, uma das principais etapas é a extração de DNA, pois qualquer problema no seu desenvolvimento compromete a sequência dos futuros passos. O sucesso nesta etapa depende de vários fatores, inclusive a adequação do protocolo (EMBRAPA, 2001).

Entre as diversas metodologias que podem ser utilizadas para extração de DNA de plantas, os protocolos de Doyle; Doyle (1987;1990) são bastante citados na literatura, com e sem modificações. Devido à demanda de pesquisadores interessados na busca de um protocolo padronizado para extração de DNA de mangabeira, no presente trabalho foram descritos e avaliados quatro protocolos, com o objetivo de padronizar e recomendar uma extração de DNA eficiente para a espécie *Hancornia speciosa* Gomes.

## **MATERIAL E MÉTODO**

O material vegetal para estudo foi obtido de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de mangabeira (Figura 1-A), localizado em Itaporanga D'ajuda - SE, pertencente à Embrapa Tabuleiros Costeiros, fiel depositária da espécie. Imediatamente após a coleta de folhas jovens e saudáveis, as mesmas foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e depositadas em isopor com gelo, para evitar oxidação (Figura 1-B). O material foi recebido no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju - SE, onde foram organizados e armazenados em ultra freezer a - 80°C (Figuras 1-C e D).

**Figura 1.** (A) Procedimento de coleta das folhas jovens de mangabeira; (B) acondicionamento em sacos plásticos e isopor com gelo; (C) recepção e organização das amostras no laboratório e (D) armazenamento de folhas de mangabeira em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



O êxito na etapa de extração depende de vários fatores, inclusive a adequação de protocolo. Para a extração de DNA de mangabeira foram testados os seguintes protocolos:

**a) Protocolo de extração 1 (PE1) – DOYLE; DOYLE (1987), adaptado por LOIOLA et al. (2016):** Usou-se duas folhas, previamente lavadas e cortadas, evitando-se as nervuras. O material vegetal foi macerado em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido, onde adicionou-se 1000  $\mu\text{L}$  de tampão (2% de CTAB – brometo de cetiltrimetil amônio; EDTA – 0,5 M pH 8,0; Tris-Cl – 1 M pH 8,0; NaCl 5M; e 2% de PVP), sem  $\beta$ -mercaptoetanol. Posteriormente o material foi transferido para microtubos de capacidade de 2 mL, identificados, e as amostras foram incubadas em banho-maria a  $65^{\circ}\text{C}$  no intervalo de 30 a 40 minutos, com inversão dos microtubos a cada 10 minutos. Adicionou-se 800  $\mu\text{L}$  de solução 24:1 de clorofórmio álcool isoamílico e as amostras foram homogeneizadas, com leves inversões por 2 minutos. Houve centrifugação por 10 minutos a 13.500 rpm, seguida da transferência da fase superior para um novo microtubo e adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado (a  $-20^{\circ}\text{C}$ ). As amostras foram homogeneizadas com leves inversões até as fases se misturarem, e incubadas *overnight* a  $20^{\circ}\text{C}$ . Uma nova centrifugação ocorreu por 5 minutos a 13.500 rpm, a qual foi adicionado o isopropanol, e o sobrenadante de cada amostra foi descartado. Ao precipitado foi adicionado 450  $\mu\text{L}$  de solução de etanol 70%, e centrifugado por 5 minutos a 13.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento anterior. O precipitado foi seco a temperatura ambiente por 12 horas e posteriormente ressuspensão com 60  $\mu\text{L}$  de solução de TE (tris-HCl/EDTA), seguido de leve agitação para dissolução do DNA. As amostras foram mantidas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**b) Protocolo de extração 2 (PE2) – DOYLE; DOYLE (1990), adaptado por ALZATE-MARIN et al. (2005):** Para extração do DNA genômico, primeiramente foi pré-aquecido 750  $\mu\text{L}$  de tampão de extração (CTAB 2%) a  $65^{\circ}\text{C}$  em banho-maria. Acrescentou-se na hora do uso 2  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol e 3  $\mu\text{L}$  de proteinase K (10 mg/mL) para cada 1 mL de tampão de extração. Em microtubos de 2 mL, com auxílio de nitrogênio líquido foram macerados 15 discos de aproximadamente 5 mm de folhas jovens e

sem nervuras, adicionando o tampão de extração pré-aquecido e mexendo delicadamente. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 50°C. Elevou-se a temperatura a 65°C por 45 minutos, onde foram homogeneizadas a cada 10 minutos. Após isso, as amostras permaneceram em descanso em temperatura ambiente, e após 30 minutos adicionou-se 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Essa mistura foi invertida gentilmente por 8 minutos e colocada em agitador de tubos 50x, seguida de centrifugação a 6.900 rpm a 20°C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e colocado em um novo microtubo de 2 mL. Adicionou-se 400 µL de isopropanol gelado, misturado gentilmente para precipitação dos ácidos nucleicos. Após intervalo de 12 horas, as amostras foram acondicionadas em freezer a -20°C. Posteriormente, foram centrifugadas em alta velocidade, 10.000 g por 10 minutos, descartando o sobrenadante. Adicionou-se 500 µL de etanol 70% para soltar o precipitado da parede do microtubo, e em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos. Descartou-se o etanol 70% e foi repetida a etapa anterior, eliminando novamente o etanol 70%, e adicionando 500 µL de etanol 100%. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos para eliminação total do etanol. As amostras foram secas em temperatura ambiente por 12 horas, e o precipitado ressuspense em 100 µL de TE.

**c) Protocolo de extração 3 (PE3) – DOYLE; DOYLE (1987), adaptado por ALZATE-MARIN et al. (2005), com modificações:** Inicialmente, para a extração do DNA genômico foi adicionado 1 mL de tampão de extração (CTAB 2%) em microtubos de 2 mL, e então colocados em banho-maria a 65°C. Com auxílio de tesoura previamente esterilizada com álcool 70%, a amostra vegetal foi cortada sem nervuras, com massa de aproximadamente 3 g. O material vegetal foi colocado em almofariz, adicionado 100 mL de nitrogênio líquido para maceração até obtenção de um pó fino. Adicionou-se 20 µL de β-mercaptoetanol e o material foi homogeneizado e transferido para o microtubo que continha a solução de extração. Estes foram depositados em uma caixa térmica com gelo até completar todas as extrações das amostras. Posteriormente as amostras foram transferidas ao mesmo tempo para o banho-maria entre 60 e 70°C por 30 minutos, e vertidas 5 vezes a cada 10 minutos. As amostras permaneceram por mais 30 minutos em banho-maria entre 60 a 70°C. Adicionou-se 1 mL de clorofórmio: álcool isoamílico e os microtubos foram fechados e vertidos 50 vezes manualmente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa (fase superior) foi removida para um novo microtubo, evitando qualquer proteína desnaturada presente na interface. Adicionou-se clorofórmio: álcool isoamílico no mesmo volume da fase removida e foram centrifugadas por mais 10 minutos, seguida de remoção da fase aquosa e adição de 400 µL de isopropanol gelado. As amostras foram incubadas por 20 minutos a -20°C por 12 horas, e centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos. Os procedimentos anteriores foram repetidos mais uma vez, descartando-se a fase líquida. As amostras secaram a temperatura ambiente em *overnight*. Após a secagem, adicionou-se 100 µL de TE, e então homogeneizadas com leves inversões.

**d) Protocolo de extração 4 (PE 4) – DOYLE; DOYLE (1987), adaptado por COSTA et al. (2011):** No momento da extração do DNA genômico, em tubos falcon de 15 mL foram adicionados 10 mL de tampão de extração de acordo com o método CTAB 2%. Os tubos foram colocados em banho-maria a 65°C. Três folhas jovens foram selecionadas e maceradas em almofariz com 100 mL de nitrogênio líquido. Depois de obtido um pó fino do material, foi adicionada a solução tampão CTAB 2% pré-aquecida, e 20 µL de β-mercaptoetanol. A mistura foi homogeneizada ainda no almofariz com auxílio do pistilo e transferida para o tubo que continha a solução de extração CTAB. Os tubos foram colocados em caixa térmica com gelo até completar todas as extrações das amostras, em seguida, foram transferidas ao mesmo tempo para o banho-maria a 65°C, por 30 - 60 minutos. Foram retirados 1.000 µL de cada amostra e transferidos para microtubos de 2 mL (3 repetições de cada amostra). Adicionou-se 1.000 µL de

clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), e os microtubos foram fechados e vertidos lentamente por 50 vezes. As amostras foram centrifugadas a 7.000 rpm por 30 minutos a 4°C. A fase aquosa (fase superior) foi coletada e depositada em um novo microtubo de 2 mL, ao qual foi adicionado acetato de sódio 3M diluído em etanol 95% (1:6) no mesmo volume da fase aquosa coletada. Em freezer (-20°C), as amostras foram armazenadas por 24 horas para precipitação do DNA. Posteriormente, houve nova centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos. O acetato de sódio 3M foi eliminado com cuidado para não perder o precipitado. Adicionou-se 1.500 µL de etanol 70% ao precipitado. As amostras foram armazenadas por 10 minutos a temperatura ambiente, e depois centrifugadas por 10 minutos a 4000 rpm. O etanol foi descartado com cuidado para não perder os precipitados, deixando-os secar ao ar livre. Adicionou-se 100 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1mM). As repetições com DNA solubilizado em TE foram reunidas em um único microtubo de 1,5 mL deixado em repouso na geladeira (4 a 10°C) por 4 horas.

Após o processo de extração, torna-se necessário proceder a quantificação para verificar a quantidade de DNA obtida. Essa é uma etapa fundamental para a eficiência da reação de PCR (reação de polimerase em cadeia), e é necessária porque a concentração de DNA inadequada implicará em falhas nas etapas subsequentes (EMBRAPA, 2001). Dentre as técnicas disponíveis para estimar a concentração de DNA, as mais utilizadas são a leitura em espectrofotômetro e a análise comparativa em gel de agarose corado em brometo de etídio. Para a padronização da quantidade de DNA por amostra foi utilizado 2 µL no espectrofotômetro digital (THERMO *Scientific* NANODROP 2000c) nas faixas de 260 a 280 nm, para a quantificação do DNA. Após a quantificação, as amostras foram diluídas em TE (Tris-HCL 10 Mm, Ph 8,0; EDTA) e armazenadas em freezer (-20°C) até a realização das reações de ISSR.

**Figura 2.** (A) Amostra do DNA de mangabeira sendo colocada para quantificação; (B) quantificação em espectrofotômetro nanodrop e (C) visualização dos resultados de quantificação.



O DNA extraído foi avaliado em gel de agarose a 0,8%, com TBE 1x, para confirmar a qualidade e a presença do material desejado. Foram utilizadas alíquotas de 6 µL de água ultrapura, 2 µL de DNA de cada amostra e 2 µL de solução de carregamento (Azul de bromofenol 0,001 % p/v; glicerol 40% v/v). Foi realizada uma eletroforese horizontal durante 1 hora a 100 Volts. Em seguida, o gel resultante foi corado com Brometo de Etídio, por cerca de 30 minutos, e fotodocumentado em equipamento Gel doc L-pix HE (Loccus Biotecnologia, Brasil).

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 20 µL, seguindo o protocolo comercial Invitrogen®, contendo: 1,0 µL de DNA de cada amostra, em um mix contendo: 0,2 µL dos primers da University of British Columbia (UBC 864, UBC 848, UBC 835, UBC 817, UBC 811, UBC 807), que nortearam a região do DNA a ser ampliada; 0,4 µL de DNTP que formaram as novas fitas de DNA; 15,6 µL de H<sub>2</sub>O, 2,0 µL de tampão, 0,6 µL de MgCl<sub>2</sub>, e 0,2 µL de *Taq* DNA Polimerase.

Em termociclador, as amostras foram inicialmente submetidas à desnaturação a 95°C por cinco minutos, seguidas por 45 ciclos de amplificação. A cada ciclo, as amostras sofreram em cadeia a desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a diferentes temperaturas (tabela 1) por 45 segundos, e finalmente extensão a 72°C por dois minutos.

**Tabela 1.** Primers ISSR utilizados na amplificação do DNA de folhas jovens de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).

Primers ISSR	Sequências 5' 3'	Temperatura de anelamento (°C)
UBC 864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	43,6
UBC 848	CAC CAC CAC CAC CAC CAC	53
UBC 835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	55
UBC 817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	50,4
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AT	53
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	50,4

O resultado da amplificação foi submetido à eletroforese horizontal, em gel 1,5% de agarose, durante 1 hora a 100 Volts. Foram utilizadas alíquotas de 18 µL de cada amostra e 2 µL de solução de carregamento (Azul de bromofenol 0,001 % p/v; glicerol 40% v/v). Em seguida, o gel foi corado com Brometo de Etídio, por cerca de 60 minutos. Para a mensuração do padrão dos fragmentos foi utilizado o marcador de peso molecular de 1KB,(Promega, Madison, South Dakota, EUA). A visualização dos resultados foi realizada em equipamento de fotodocumentação Locus L-pix HE (Locus Biotecnologia, Brasil).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tanto a quantificação de DNA em espectrofotômetro, quanto à quantificação em gel mostraram diferenças nos resultados em função do tipo de protocolo de extração. A quantificação em espectrofotômetro revelou maiores concentrações de DNA quando usou-se o protocolo DOYLE; DOYLE (1987) adaptado por LOIOLA et al. (2016) – PE1(Tabela 2).

**Tabela 2.** Quantificação de DNA de mangabeira (ng/µL) oriundo de três protocolos de extração: PE1 - LOIOLA et al. (2016); PE2 - ALZATE-MARIN et al. (2005) e PE3 - ALZATE-MARIN et al. (2005) com modificações.

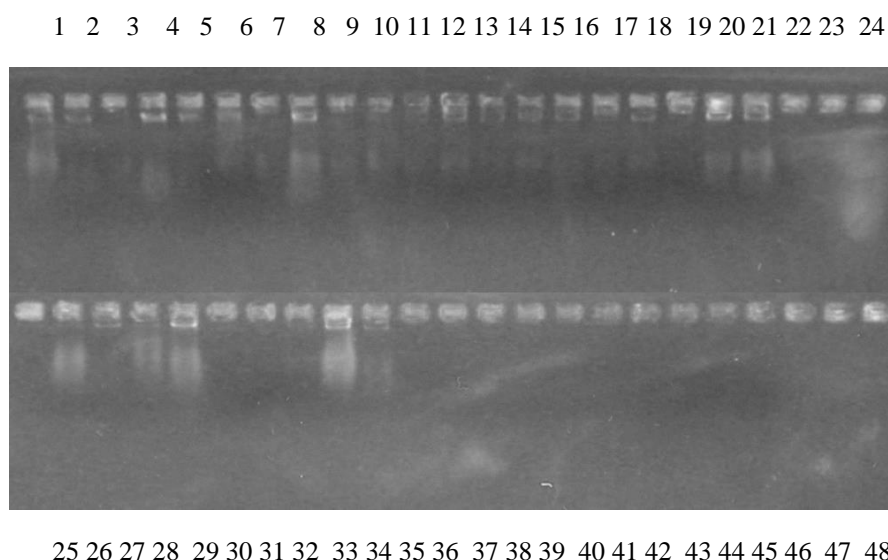
Amostras	PE1		PE2		PE3	
	DNA (ng/µL)	260/280	DNA (ng/µL)	260/280	DNA (ng/µL)	260/280
1	264,85	1,53	88,22	1,61	81,9	8,53
2	438,90	1,61	68,60	1,45	31,45	2,12
3	805,85	1,47	84,85	1,69	115,7	2,32
4	759,30	1,23	182,20	1,83	38,05	2,16
5	1214,15	1,67	295,0	1,70	25,65	3,32
6	49,70	0,25	174,0	1,89	99,65	2,31
7	250,30	0,78	110,05	1,71	38,75	2,30
8	53,55	1,08	200,70	1,86	296,6	1,89
9	292,80	0,55	62,55	1,65	78,5	3,96
10	53,00	0,89	134,70	1,74	92,15	2,09

Os protocolos avaliados diferem entre si principalmente em relação à forma de maceração (em microtubo ou almofariz), tipos e quantidades de reagentes utilizados para extração de DNA (CTAB,  $\beta$ -mercaptoetanol e proteinase K). Foi observado que a presença e quantidade destes ou outros reagentes podem interferir nos resultados de quantificação.

A visualização do DNA em gel permitiu observar que utilizando o protocolo DOYLE; Doyle (1987), adaptado por COSTA et al. (2011) – PE4 - não foi possível visualizar fragmentos do DNA amplificados (Figura 3). Dessa forma, as amostras extraídas por esse protocolo foram eliminadas dos testes de PCR. Este protocolo difere dos demais testados principalmente em relação à quantidade de solução tampão (CTAB) utilizada para extração que é consideravelmente maior, o que pode ter interferido nos resultados de quantificação de DNA.

O PE1, adaptado por LOIOLA et al. (2016) proporcionou a obtenção de concentrações maiores de DNA, mesmo sendo o único entre os testados a não utilizar  $\beta$ -mercaptoetanol com o tampão de extração. Isso indica que este reagente não interfere na quantidade de DNA extraído, o que também foi comprovado por SILVA et al. (2014) ao testar diferentes concentrações de  $\beta$ -mercaptoetanol em protocolos de extração de DNA de *Anacardium giganteum*.

**Figura 3.** Fotodocumentação de gel de quantificação de DNA de mangabeira. Canaletas de 1 a 10: PE1 – LOIOLA et al. (2016); de 11 a 20: PE2 - DOYLE; DOYLE (1990) modificado por ALZATE-MARIN et al. (2005); de 25 a 34: PE3 - DOYLE; DOYLE (1987) adaptado ALZATE-MARIN et al. (2005), com modificações; de 35 a 44: PE4 – COSTA et al. (2011). As canaletas de 21 a 24 e as de 45 a 48 não continham amostra.



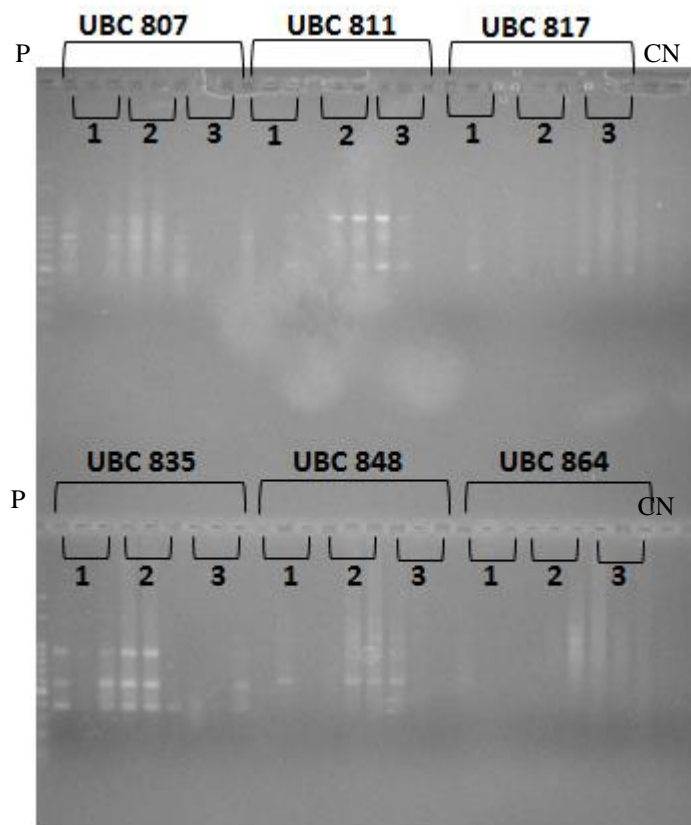
Um dos aspectos importantes na extração é que a quantidade de DNA necessária varia em função da técnica molecular a ser utilizada (COSTA; MOURA, 2001). Apesar de ter proporcionado a obtenção de concentrações maiores de DNA, o PE1 não proporcionou bons resultados para amplificação através de PCR-ISSR. Foi o protocolo adaptado por ALZATE-MARIN et al. (2005) – PE2 - que mostrou os melhores resultados de amplificação, visto que dos seis primers testados, quatro (UBC 807, UBC 811, UBC 835 e UBC 848) foram eficientes (Figura 4).

Este protocolo foi o único entre os testados a utilizar proteinase K, o que pode ter proporcionado a obtenção de amostras de DNA de melhor qualidade, já que este reagente é responsável pela desproteínação do extrato celular. Avaliando métodos de extração de DNA de *Araucaria angustifolia*,



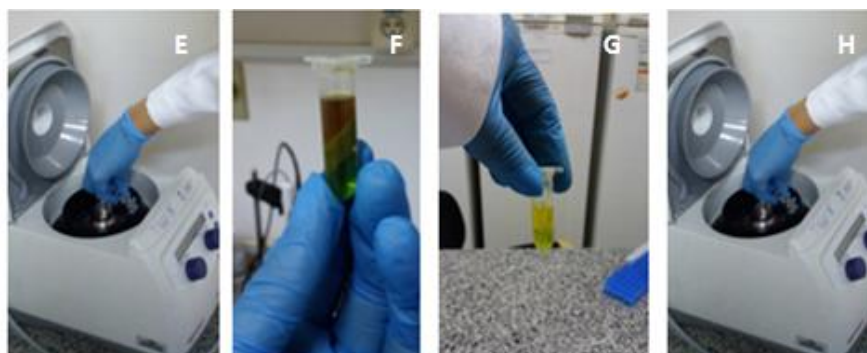
MAZZA; BITENCOURT (2000) obtiveram material gênico de qualidade através da adição da proteinase K durante a execução de protocolo. Resultados semelhantes foram obtidos por PAIVA et al. (2014), no estudo de modificações na metodologia de extração para obtenção do material genético de macrófitas aquáticas.

**Figura 4.** Fragmentos de DNA de mangabeira utilizando seis primers ISSR (UBC807, UBC 811, UBC 817, UBC 835, UBC 848 e UBC 864) em três protocolos de extração (1 – LOIOLA et al. (2016); 2 – DOYLE; DOYLE (1990) modificado por ALZATE-MARIN et al., (2005); 3 – DOYLE; DOYLE (1987) adaptado ALZATE-MARIN et al. (2005), com modificações. P: padrão 1Kb; CN: controle negativo.



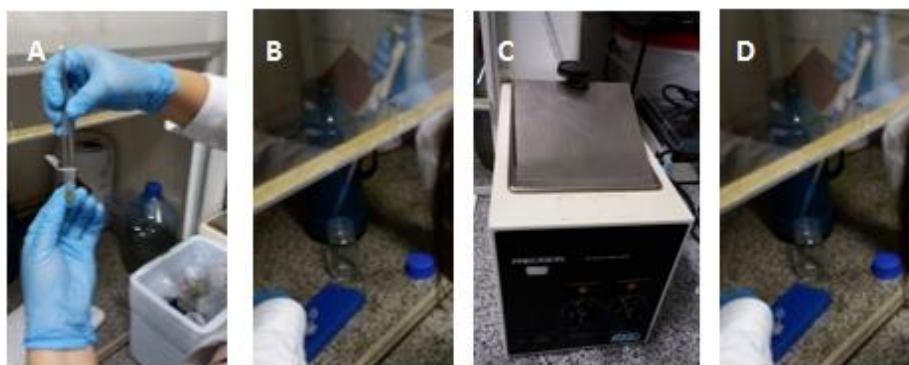
Tanto os resultados da quantificação quanto da PCR sugerem que o melhor protocolo para extração de DNA de mangabeira seja o de ALZATE-MARIN et al. (2005), que encontra-se ilustrado detalhadamente a seguir (Figuras 5, 6 e 7).

**Figura 5.** (A) Maceração das folhas de mangabeira em microtubos contendo nitrogênio líquido; (B) Adição do tampão de extração; (C) Banho-maria por 1 hora; (D) Adição de clorofórmio.

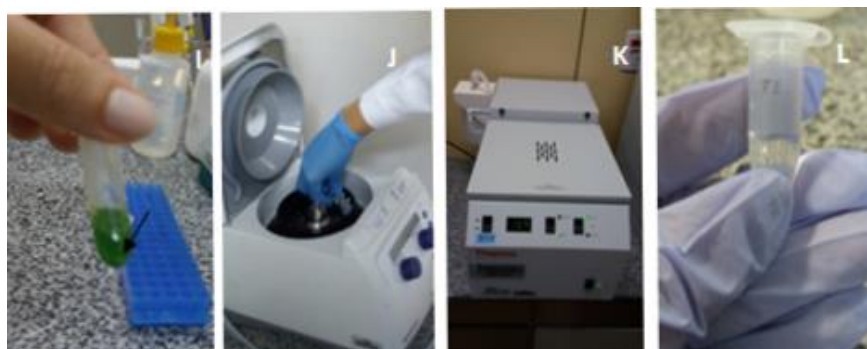




**Figura 6.** (E) Centrifugação por 10 minutos; (F) Coleta da fase aquosa; (G) Transferência para novo tubo e adição do isopropanol; (H) Centrifugação por 10 minutos.



**Figura 7.** (I) Descarte do sobrenadante e lavagem do precipitado; (J) Centrifugação por 5 minutos; (K) Secagem das amostras e (L) adição de TE.



## CONCLUSÃO

Sugere-se a preferência pelo protocolo de DOYLE; DOYLE (1990) adaptado por ALZATE-MARIN et al. (2005) para a extração de DNA de folhas de mangabeira, devido à qualidade e amplificação do DNA com os primers ISSR testados e a otimização do tempo.

## REFERÊNCIAS

ALZATE-MARIN, A. L. et al.. Otimização de um método econômico e rápido de extração de DNA para quatro espécies de árvores tropicais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. **Anais**. Águas de Lindóia: SBG, p.510. 2005. <[http://web2.sbg.org.br/congresso/CongressosAnteriores/Pdf\\_resumos/51/GP510.pdf](http://web2.sbg.org.br/congresso/CongressosAnteriores/Pdf_resumos/51/GP510.pdf)>

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Conjuntura Mensal - Mangaba**. <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_01\\_19\\_11\\_10\\_43\\_conjuntura\\_mangaba\\_dezembro\\_de\\_2015.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_01_19_11_10_43_conjuntura_mangaba_dezembro_de_2015.pdf)>

COSTA, T. S. et al. (2011) Diversidade genética de acessos do Banco de Germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.5, p. 499-508, 2011. <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v46n5/07.pdf>>

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v.19, 11-15.

- DOYLE, J.J. ; DOYLE, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12: 13-15.
- EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de Extração de DNA**. COSTA, M. R; MOURA E. F. Belém: Embrapa. Amazônia Oriental, 2001. 24p. <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/63491/1/Oriental-Doc89.pdf>>
- FERREIRA, E.G.; MARINHO, S.J.O. Produção de frutos da mangabeira para consumo *in natura* e industrializado. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.1, n.1, p.9-14, 2007. <[http://revistatca.pb.gov.br/edicoes/volume-01-2007/volume-1-numero-1-setembro-2007/tca02\\_mangaba.pdf](http://revistatca.pb.gov.br/edicoes/volume-01-2007/volume-1-numero-1-setembro-2007/tca02_mangaba.pdf)>
- LIMA, D.A. **Estudos fitogeográficos de Pernambuco**. Recife: Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco, 1957. 44 p. (Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco. Publicação, 2). <<http://www.journals.ufrpe.br/index.php/apca/article/view/47/44>>
- LOIOLA, C. M. Genetic relationships among Tall coconut Palm (*Cocos nucifera* L.) accessions of the International Coconute Genebank for Latin America and the Caribbean (ICG-LAC), evaluated using microsatellite markers (SSRs). **Plos One**, 11:3, p.1-11, 2016. <<http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0151309&type=printable>>
- SILVA JUNIOR, J.F. da; LÉDO, A. da S. (Ed.). Botânica. In: SILVA JUNIOR, J.F. da; LÉDO, A. da S. (Ed.). **A cultura da mangaba**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. p. 25-33.
- SILVA, B. M..et al.. Protocolo para extração de DNA genômico de *Anacardium giganteum* W. Hancock ex Engl (Anacardiaceae). **Enciclopédia Biosfera**. v. 10, n. 19, p. 2401. 2014. <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2014b/CIENCIAS%20BIOLOGICAS/protocolo%20para%20extracao.pdf>>
- MAZZA, M. C. M.; BITENCOURT, J. V. M. Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 41, p.12-17, 2000. <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF-2009-09/3015/1/mazza.pdf>>
- PAIVA, R. M. S.et al.. Nota técnica sobre modificações na metodologia de extração pra obtenção do material genético de macrófitas aquáticas das grades do PPBio do estado de Roraima. **Boletim do Museu Integrado de Roraima**, v.8, n.2, p. 68-74, 2014. <<http://uerr.edu.br/bolmirr/wp-content/uploads/2014/12/BOLMIRR-v82-Paiva-et-al.pdf>>