



DNA de *Solenidium lunatum*(Lindl.) Kraenzl (Orchidaceae)

DNA of *Solenidium lunatum* (Lindl.) Kraenzl (Orchidaceae)

Elisa dos Santos Cardoso¹, Joameson dos Santos Lima², Cyntia Beatriz Magalhães Farias³, Juliana de Freitas Encinas Dardengo⁴, Ana Aparecida Bandini Rossi⁵

¹Mestra em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Rede Bionorte, Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, (66) 99977-2599, elisabyo@gmail.com; ²Engenheiro Florestal, Mestrando do Programa de Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, (66) 99635-2496, anjoamerson@gmail.com; ³Bióloga, Mestranda do Programa de Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, (66) 99955-5029, cyntia_bmf@hotmail.com; ⁴Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, (66) 99209-8149, julianadardengo@outlook.com; ⁵Doutora em Genética e Melhoramento, Professora Adjunta da Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, (66) 3521-8203, anabanrossi@unemat.br.

ARTIGO

Recebido: 13/11/2018

Aprovado: 23/03/2019

Palavras-chave:

CTAB

Diversidade genética

Marcadores moleculares

Orquídea

RESUMO

Estudo de caracterização molecular e de diversidade genética com base em marcadores moleculares requer DNA de qualidade, livre de contaminantes como fenóis e polissacarídeos, e também em quantidade suficiente para realização de reações em cadeia da polimerase (PCR). Os protocolos de extração de DNA vegetal são, em sua maioria, baseados no método CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio), contudo devido às particularidades de cada planta, são necessários ajustes quanto aos reagentes utilizados e à quantidade dos mesmos. Diante do exposto, este estudo teve por objetivo avaliar diferentes concentrações de CTAB e de β-mercaptoetanol no protocolo de extração de DNA de *Solenidium lunatum* (Lindl.) Kraenzl (Orchidaceae), visando futuros estudos de diversidade genética com utilização de marcadores moleculares. Para o CTAB foram testadas as concentrações 2% e 5%, enquanto que para o β-mercaptoetanol, foram testados 0% e 2%. Para verificar se o material extraído era passível de amplificação, realizam-se testes com três *primers* ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Os resultados indicam que todos os métodos foram eficientes na extração do DNA em quantidade e qualidade necessárias para realização de PCRs. Todavia, recomenda-se a utilização do protocolo CTAB 2% sem adição de β-mercaptoetanol, uma vez que não foram verificadas diferenças significativas nos resultados de amplificações. A utilização desse protocolo produz material de qualidade, passível de amplificação, com redução de custos e de riscos de intoxicação.

ABSTRACT

Key words:

CTAB

Genetic diversity

Molecular markers

Orchid.

Molecular characterization and genetic diversity studies based on molecular markers require a quality DNA, free of contaminants such as phenols and polysaccharides, and also a sufficient quantity to perform polymerase chain reactions (PCR). Plant DNA extraction protocols are mostly based on the CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide) method, however due to the particularities of each plant, adjustments are required regarding the reagents used and the amount of them. The objective of this study was to evaluate different concentrations of CTAB and β-mercaptoethanol in the DNA extraction protocol of *Solenidium lunatum* (Lindl.) Kraenzl (Orchidaceae), aiming future studies of genetic diversity using molecular markers. For the CTAB, 2% and 5% concentrations were tested, while for β-mercaptoethanol, 0% and 2% were tested. To verify if the extracted material was amenable to amplification, tests were performed with three *primers* ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). The results indicated that all the methods were efficient in extracting DNA with quantity and quality required to perform PCRs. However, it is recommended to use the 2% CTAB protocol without addition of β-mercaptoethanol, since no significant differences in amplification results were found. The use of this protocol produces a quality material, capable of amplification, with reduction of costs and risk of intoxication.



INTRODUÇÃO

Solenidium lunatum (Lindl.) Schltr., é uma orquídea nativa do Brasil com registro de ocorrência nos estados do Pará, Rondônia, Roraima, Goiás, Mato Grosso e Maranhão, incluídos nos biomas Amazônico e Cerrado (BARROS et al., 2015). É uma espécie com potencial ornamental, que, no Brasil, é encontrada em regiões de grande pressão antrópica, onde o extrativismo indiscriminado e as demandas do agronegócio têm promovido a substituição de áreas de vegetação nativa por pastagens e monoculturas, o que, de acordo com Laurance e Vasconcelos (2009) e Queiroz (2009), resulta em fragmentação florestal e perda de habitat, redução da biodiversidade e alteração no tamanho e na dinâmica das populações, entre outros fatores.

No início dos anos 2000, a exploração de orquídeas nativas pelo mercado de plantas ornamentais tem ganhado espaço, bem como a produção de mudas para utilização em projetos de reflorestamento, tendo em vista que, ao oferecerem recursos florais e abrigo, estas espécies contribuem para a manutenção da fauna local (DORNELES; TREVELIN, 2011; ENDRES JÚNIOR et al., 2015).

Entretanto, no Brasil, são poucas as pesquisas sobre a biodiversidade de espécies ornamentais nativas (CARINI et al., 2014), sendo que, estudos que avaliem a diversidade genética destas espécies contribuem tanto para projetos de reflorestamento e manutenção da biodiversidade quanto para a seleção de genótipos de maior valor comercial, para posterior propagação e comercialização. Dentre os diferentes métodos de avaliação da diversidade genética estão os marcadores moleculares, que não são influenciados pelo ambiente e detectam o polimorfismo a nível de DNA (GRIFFITHS et al., 2013).

Os marcadores moleculares permitem a caracterização da variabilidade genética e da estrutura genética nas populações (SOUZA et al., 2008), sendo, portanto essenciais na melhoria das práticas de manejo e conservação de espécies (ROSSI et al., 2014). Estudo com marcadores moleculares realizados via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), requerem DNA de qualidade, com baixo grau de impurezas, como metabólitos secundários que dificultam a ação da Taq DNA polimerase, o que pode ser obtido por meio de um protocolo de extração adequado (OLIVEIRA et al., 2010).

De acordo com Devi et al. (2013) protocolos que utilizam Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) resultam em DNA total de boa qualidade e são utilizados para diferentes espécies, mas não são universais, sendo necessárias adequações e adaptações de acordo com o organismo de interesse. As adaptações podem ser feitas por meio de alterações nas concentrações tanto de CTAB quanto de outras substâncias como clorofórmio, β -mercaptoetanol, proteinase, acetato de amônia, entre outros, além de ajustes nas etapas de execução do protocolo, tornando a extração de DNA prática, rápida e eficiente, estabelecendo um protocolo adequado para espécie em estudo (DANNER et al., 2011; ZORTÉA et al., 2016; SOARES et al., 2016);

Considerando a ausência de estudos com dados moleculares da espécie *S. lunatum*, faz-se necessário estabelecer

um método de obtenção de DNA de qualidade que possa ser utilizado em ampliações via PCR e posterior avaliação da diversidade genética da espécie. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo testar protocolos de extração de DNA quanto à qualidade e quantidade de material obtido bem como o potencial de amplificação do mesmo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os testes de extração de DNA foram realizados no Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular do CEPTAM (Centro de Tecnologia e Pesquisa da Amazônia Meridional) na Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus Universitário de Alta Floresta, MT. O tecido foliar de *S. lunatum* foi coletado no Orquidário Altaflorestense da UNEMAT, campus de Alta Floresta (9°51'41.31"S; 56°42.30"O), sendo amostrados dois indivíduos, considerados como repetições nos testes. Os testes de extração do DNA total basearam-se no método CTAB proposto por Doyle e Doyle (1987), com variações na quantidade de CTAB (2% e 5%) e de β -mercaptoetanol (0% e 2%), conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Testes de extração de DNA em *Solenidium lunatum*, com base no método CTAB (Doyle; Doyle, 1987), com modificações.

Repetições	Amostra	CTAB	B-mercaptoetanol
1	01	2%	0%
2	02	2%	0%
1	03	2%	2%
2	04	2%	2%
1	05	5%	0%
2	06	5%	0%
1	07	5%	2%
2	08	5%	2%

O tecido foliar foi pulverizado na presença de nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo de porcelana e transferido para microtubo de 2mL, ao qual foi adicionado 800 μ l de tampão de extração CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 mM NaCl; 20 mM EDTA; CTAB (2% e 5%, conforme tabela 1) e polivinilpirrolidona (PVP) e β -mercaptoetanol). As amostras foram homogeneizadas por meio de agitação em vortex Kasvi e incubadas em banho-maria a 65°C por 30 min, sendo realizada inversão manual após 15 min.

As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min em microcentrífuga Nova técnica (NT 800), promovendo a separação do material em duas fases, sendo o sobrenadante (fase aquosa) transferido para microtubo de 1,5 mL onde foram adicionados 700 μ l de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 (v/v)). A mistura foi novamente homogeneizada em vortex e centrifugada por 10 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e precipitado em 500 μ L de álcool isopropílico gelado por aproximadamente três h à -20°C para precipitação do DNA.

O material foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 min e o precipitado foi lavado duas vezes com álcool etílico a 70% (v/v) e uma vez com álcool etílico a 95% (v/v), sendo que a cada

lavagem as amostras eram centrifugadas por 3 min a 10.000 rpm. Em seguida, o precipitado foi seco em temperatura ambiente e posteriormente ressuspendido em 40 µL de TE 0,1 mM (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0) com 0,12 µl de RNase e incubado em banho-maria a 37 °C, por 30 min. As amostras foram acondicionadas em geladeira, a 4 °C por um período de 24 hs e, posteriormente, armazenadas a -20 °C.

A integridade do DNA total extraído foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (10 mg mL⁻¹). A avaliação da eletroforese foi realizada em transiluminador com luz UVB (Loccus Biotecnologia® – LTB-STi) e o registro fotográfico realizado e editado por meio de fotodocumentador L-Pix STi (Loccus Biotecnologia®) e software L-Pix STi Image, respectivamente. A concentração do DNA extraído foi estimada por meio de avaliação visual por comparação com marcador de DNA λ (100 ng/µL), sendo o DNA extraído diluído para uma concentração de 10 ng µL⁻¹ e armazenado a -20 °C para posterior amplificação.

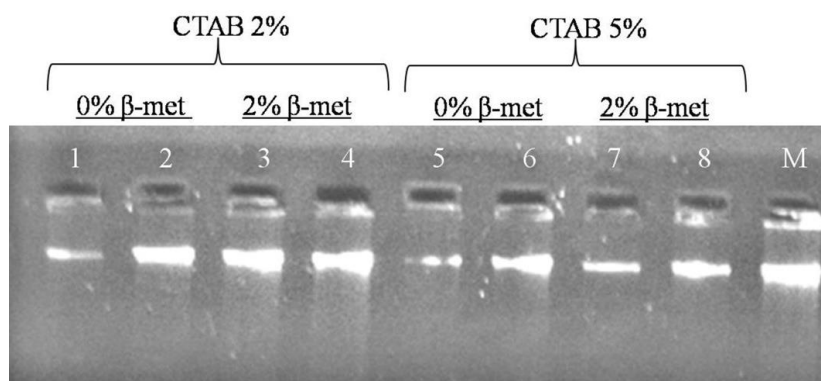
Para os testes de amplificação do DNA foram utilizadas duas amostras para cada um dos testes de protocolo de extração e três primers do tipo ISSR (*Inter Sequence Simple Repeats*), desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC), Vancouver, Canadá (tabela 2).

Tabela 2. Primers ISSR testados para amplificação do DNA de *Solenidium lunatum*. TA = temperatura de anelamento.

Nome do primer	Sequência 5' → 3'	TA (°C)
UBC 807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	48
UBC 826	ACACACACACACACACG	48
UBC 842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG*	48

*Y = C ou T

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1%. DNA genômico extraído de *Solenidium lunatum* com duas concentrações de CTAB (2% e 5%) e de β-mercaptoetanol (0% e 5%). M = marcador 100 ng DNA λ.



Diferentes concentrações de CTAB e/ou de β-mercaptoetanol são comumente testadas em protocolos de extração de DNA de plantas, no intuito de obter maior eficiência no rompimento das membranas plasmáticas e no isolamento do DNA e/ou na desnaturação de proteínas e também inibir a ação de agentes antioxidantes, respectivamente (SOARES et al., 2016; SILVA, 2010; ROMANO; BRASILEIRO, 1999). De acordo com essas considerações, para a espécie em estudo, a utilização de tampão de extração

As reações de amplificação via reação em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas conforme Rossi et al. (2014), com alteração na concentração das dNTPs, resultando em um volume final de 20 µl, contendo 5,8 µl de água mili-Q®, 2,0 µl de tampão 10x (500 mM de KCl, 200 mM de Tris e 0,1% de Tween 20), 5 mM de MgCl₂, 1 µl de DMSO, 0,2 mM de cada dNTP (dGTP, dATP, dCTP, dTTP), 0,3 µM de primer, 1 U de taq polimerase e 20 ng de DNA.

As amplificações foram conduzidas em termociclador (Aeris), utilizando protocolo proposto por Rodrigues (2010), com adaptações, compreendendo uma desnaturação inicial à 94 °C por 1,5 min, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 40 segundos, 48 °C por 45 segundos e 72 °C por 1,5 min, concluindo com uma extensão final de 72 °C por 5 min. Os produtos das amplificações foram separados via eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TBE 1X, sob voltagem constante de 80V em sistema de eletroforese horizontal LCH 20x25 (Loccus Biotecnologia®). Para auxiliar a análise dos fragmentos amplificados (bandas), utilizou-se o marcador Kapa Universal DNA Ladder (KK6302). Após a eletroforese o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,6 µg mL⁻¹), por 20 min e, posteriormente, visualizado, fotografado e editado em transiluminador com luz UVB LTB-20x20 STi, fotodocumentador e software L-Pix STi, respectivamente (Loccus Biotecnologia®).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da Figura 1 possibilita inferir que as concentrações de CTAB e de β-mercaptoetanol foram eficientes na extração do DNA de *S. lunatum*, sendo portanto, úteis em trabalhos que visem acessar o DNA da espécie.

sem β-mercaptoetanol e com 2% de CTAB mostrou-se eficiente, resultando em DNA em quantidade e qualidade suficientes para análises moleculares posteriores.

Dalbosco et al. (2015), por sua vez, em estudos com *Epidendrum viviparum* (Orchidaceae), ao testar duas concentrações de CTAB (2% e 5%) e três concentrações de β-mercaptoetanol (0; 1 e 2,5%), obtiveram resultados apenas com o tampão contendo 2% de CTAB com adição de 1 ou 2,5% de β-mercaptoetanol. Os diferentes resultados obtidos nos estudos

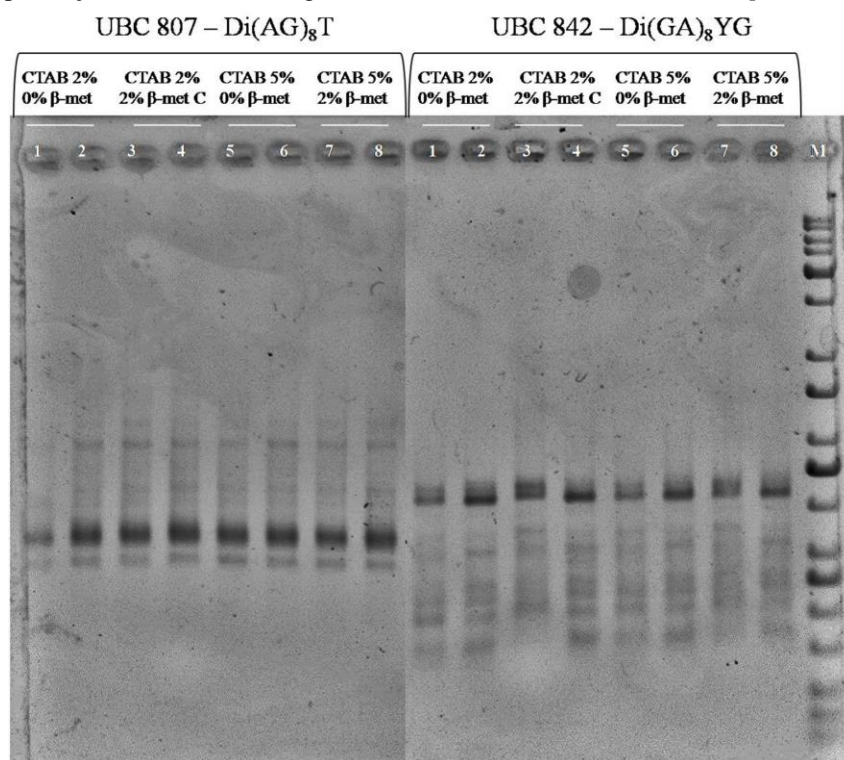
realizados com *S. lunatum* e *E. viviparum* evidenciam que protocolos de extração podem ter resultados distintos, mesmo em se tratando de organismos pertencentes à mesma família botânica, o que reforça a necessidade de testes que possibilitem o ajuste do protocolo de extração para a espécie alvo de estudos moleculares.

A quantidade de CTAB utilizada nos protocolos de extração de DNA vegetal está relacionada à separação dos polissacarídeos e ácidos nucleicos pela diferença de solubilidade entre estes (ROMANO; BRASILEIRO, 1999), de modo que a eficiência do processo em protocolos que utilizam 5%, ou mais, de CTAB são indicativos que as folhas da espécie possuem alto teor de polissacarídeos. A utilização de β -mercaptoetanol por sua vez, está relacionada à contaminação por polifenóis, uma vez que atua como antioxidante, assim como o PVP (DEHESTANI; TABAR; 2007). Dessa forma, para espécies cujas folhas apresentem baixa concentração destes metabólitos secundários, o PVP pode ser suficiente para eliminar a contaminação do DNA, dispensando ou reduzindo a utilização do β -mercaptoetanol, que, de acordo com a FISPQ 805740 é um produto tóxico por ingestão, inalação e contato, podendo causar irritação cutânea, lesões no globo ocular, dentre outras complicações (MERCK, 2017). Os testes realizados com *S. lunatum* indicam que os teores de polissacarídeos e de compostos fenólicos presentes nas folhas da espécie não são capazes de interferir no processo de extração do DNA, uma vez

que as diferentes concentrações de CTAB (2% e 5%) e de β -mercaptoetanol (0% e 2%) não resultam em diferenças significativas quanto à quantidade e integridade do DNA extraído.

Os resultados obtidos neste estudo permitem inferir que, embora, todos os testes tenham resultado em DNA de qualidade, o protocolo CTAB 2% sem adição de β -mercaptoetanol é o mais indicado para espécie devido à redução dos custos e do manuseio de produtos tóxicos. A utilização de protocolos sem β -mercaptoetanol para extração de DNA de diferentes espécies vegetais tem apresentado resultados satisfatórios conforme os obtidos por Zortéa et al. (2016) para *Eugenia stipitata*, por Soares et al. (2016), para duas espécies do gênero *Inga*, por Schimitt et al. (2014) para *Curcuma longa* e por Silva et al. (2014) para *Anacardium giganteum*, com obtenção de DNA íntegro e com baixo teor de contaminantes. Todavia, a eficiência do protocolo não é determinada apenas pela obtenção de material visualmente avaliado como íntegro e de qualidade, é necessário também que a quantidade e a qualidade sejam adequadas para reações de amplificação do DNA via PCR. Todos os DNAs extraídos resultaram em amplificação com os marcadores dominantes UBC 807 e UBC 842 (Figura 2). A qualidade no padrão de bandas apresentado demonstra que as técnicas de extração utilizadas em todos os testes foram satisfatórias e poderão ser utilizadas em futuros estudos moleculares da espécie *S. lunatum*.

Figura 2. Produtos de amplificação da PCR do DNA genômico de *Solenidium lunatum* com os primers UBC 807 e UBC 842.



A amplificação com dois dos três primers ISSR testados confirma que todos os testes do protocolo de extração foram eficientes para obtenção de DNA de qualidade, com baixo grau de impurezas.

A avaliação dos produtos da amplificação indica que o aumento na concentração de CTAB não implica em maior qualidade e número de fragmentos amplificados e que não houve diferença relacionada à quantidade de β -mercaptoetanol.

utilizadas, indicando que, para a espécie em estudo, não é necessária a utilização deste reagente. A não amplificação das amostras pelo primer UBC 826 pode estar relacionada à quantidade ou concentração dos reagentes utilizados para PCR ou à ausência desta sequência simples repetida ((AC)₈G) no genoma da espécie.

CONCLUSÕES

O método CTAB é eficiente para extração de DNA de folhas de *Solenidium lunatum*, sendo que o aumento de CTAB de 2% para 5% e a utilização de β-mercaptoetanol não interferiram na quantidade e qualidade do DNA extraído. Dessa forma, recomenda-se a utilização do protocolo CTAB 2% sem adição de β-mercaptoetanol na extração de DNA de *S. lunatum*.

REFERÊNCIAS

BARROS, F. DE; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L.; FURTADO, S. G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C. O.; GUIMARÃES, L. R. S. Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB20200>>. 2015. Acesso em 12 mar 2019.

CARINI, S.; RICHETTI, E.; BAGATINI, K. P. Identificação de espécies nativas das florestas ombrófila mista e estacional decidual com potencial ornamental. Unoesc & Ciência - ACBS, v.5, n.2, p.165-172, 2014.

DALBOSCO, E. Z.; SILVA, C. G.; MELHORANÇA, E. A. L.; MIRANDA, A. F.; SILVA, C. S. Otimização do protocolo para extração de DNA genômica de *Epidendrum viviparum*Lindl. (Orchidaceae). Enciclopédia Biosfera, v.11, n.21, p.3236-3243, 2015.

DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z.; BITTENCOURT, J. V. M.; SACHET, M. R. Proposta de protocolo para extração de DNA de jabuticabeira. Ciência Florestal, v.21, n.2, p.363-367, 2011. 10.5902/198050983241.

DEHESTANI, A.; TABAR, S. K. K. A rapid efficient method for DNA isolation from plants with high levels of secondary metabolites. Asian Journal of Plant Sciences, v.6, n.6, p.977-981, 2007. 10.3923/ajps.2007.977.981.

DEVI, K. D.; PUNYARANI, K.; SINGH, N. S.; DEVI, H. S. An efficient protocol for total DNA extraction from the members of order Zingiberales – suitable for diverse PCR based downstream applications. Springer Plus, 2: 669, 2013. 10.1186/2193-1801-2-669.

DORNELES, L. T.; TREVELIN, V. Aclimação e reintrodução de *Cattleya intermedia*Graham ex Hook. (Orchidaceae) obtidas por propagação *in vitro*. Iheringia Série Botânica, v.66, n.2, p.167-174, 2011.

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

ENDRES JR, D.; SASAMORI, M. H.; SILVEIRA, T.; SCHMITT, J. L.; DROSTE, A. Reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham (Orchidaceae) em borda e interior de um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual no sul do Brasil. Revista Brasileira de Biociências, v.12, n.1, p.33-40, 2015.

GRIFFITHS, A. J. F.; LEWONTIN, R. C.; CARROLL, S. B.; WESSLER, S. R. Introdução à Genética. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 10ª ed., 2013. 736p.

LAURANCE, W. F.; VASCONCELOS, H. L. Consequências ecológicas da fragmentação florestal na Amazônia. Oecologia Brasiliensis, v.13, n.3, p.434-451, 2009. 10.4257/oeco.2009.1303.03.

MERCK S/A Brasil. Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ β-mercaptoetanol para síntese. 2017

OLIVEIRA, L. V. R.; FARIA, R. T.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M.; SANTOS, M. O.; CARVALHO, V. P. Genetic Analysis of Species in the Genus *Catasetum* (Orchidaceae) using RAPD Markers. Brazilian Archives of Biology and Technology, Curitiba, v.53, n.2, p.375-387, 2010. 10.1590/S1516-89132010000200017.

QUEIROZ, F. A. Impactos da sojicultura de exportação sobre a biodiversidade do Cerrado. Sociedade & Natureza, v.21, n.2, p.193-209, 2009. 10.1590/S1982-45132009000200013.

RODRIGUES, J. F. Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. mantiqueirae* (Fowlie) Van den Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR. 2010. 81f. Dissertação (Mestrado Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, n.9, p.40-43, 1999.

ROSSI, A. A. B.; SILVA, I. V.; LAVEZO, A.; DARDENGO, J. F. E.; EBÚRNEO, L.; BONFANTE, L. V. Extração e amplificação de DNA de seis espécies de *Catasetum* nativas da Amazônia Meridional. Revista de Ciências Agroambientais, v.12, n.2, p.133-137, 2014.

SCHMITT, K. F. M.; SILVA, B. M.; ROSSI, A. A. B.; SANDER, N.; SILVA, C. J. Estabelecimento e otimização de protocolo para extração e amplificação de DNA em tecido foliar de *Curcuma longa* L.. Enciclopédia Biosfera, v.10, n.18, p.1560 - 1568, 2014.

SILVA, B. M.; DALBOSCO, E. Z.; BOTINI, N.; FARIA, R. B.; ROSSI, A. A. B. Protocolo para extração de DNA genômico

de *Anarcadium giganteum* W. Hancock ex Engl. (Anarcadiaceae). Enciclopédia Biosfera, v.10, n.19, p.2401-247, 2014.

SILVA, M. N. Extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do cerrado. Revista Árvore, v.34, n.6, p.973-978, 2010. 10.1590/S0100-67622010000600002.

SOARES, F. S.; OLIVEIRA, F. T.; BORGES, N. M.; SILVA, B. M.; ROSSI, A. A. B. Otimização de protocolo para extração de DNA de tecido foliar de duas espécies de ingazeiro. Enciclopédia Biosfera, v.13, n.24, p.795-802, 2016. 10.18677/EnciBio_2016B_074.

SOUZA, G. A.; CARVALHO, M. R. O.; MARTINS, E. R.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, L. O. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.43, n.7, p.843-849, 2008. 10.1590/S0100-204X2008000700008.

ZORTÉA, K. E. M.; MIKOVSKI, A. I.; CASTRILLON, R. G.; RUZZA, D. A. C.; ROSSI, A. A. B. Estabelecimento de protocolo de extração de DNA para *Eugenia stipitata* Mc. Vaung, visando estudos moleculares. Enciclopédia Biosfera, v.13, n.24, p.495-502, 2016. 10.18677/EnciBio_2016B_045.