



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CAMPUS ANÍSIO TEIXEIRA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RÔMULO ROMEU ANDRADE MACÊDO

**PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA
TOTAL PARA O GENÊRO *Marsetia* DC. (MELASTOMATACEAE)**

Vitória da Conquista, BA

2018

RÔMULO ROMEU ANDRADE MACÊDO

**PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL PARA O
GÊNERO *Marctia* DC.(MELASTOMATACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia como exigência para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Área de Concentração: Biologia Molecular e Botânica

Orientadora: Prof^a. Dra. Andrea Karla Almeida dos Santos.

Vitória da Conquista, BA

2018

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

Macêdo, Rômulo Romeu Andrade

Padronização de protocolos e de extração de DNA total para o gênero *Marcetia* DC. (Melastomataceae) / Rômulo Romeu Andrade Macêdo.- 2018.

27 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Karla Almeida dos Santos.
TCC (Graduação – Ciências Biológicas) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, 2018.

1. DNA. 2. Melastomataceae. 4. Chapada Diamantina. I. Universidade Federal da Bahia. II. Instituto Multidisciplinar em Saúde. III. Santos, Andrea Karla Almeida dos. IV. Título.

CDU: 577.213.3

Banca Examinadora

Prof. Dra. Ana Carolina da Cunha Rodrigues

Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Antonio Carlos de Oliveira

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Prof. Dr . Andrea Karla Almeida dos Santos - Orientador e Presidente da Banca

Universidade Federal da Bahia

Data da Defesa 10/12/2018

Banca Examinadora
MACÊDO, RÔMULO ROMEU ANDRADE. PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLOS E DE EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL PARA O GENÊRO *Marcetia* DC. (MELASTOMATACEAE) 2018.2. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) - Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, BA, 2018.

RESUMO

A etapa de extração de DNA é fundamental nos estudos moleculares. A obtenção de DNA de qualidade pode garantir o sucesso em todas as etapas do trabalho, do mesmo modo, DNA de baixa qualidade ou em baixa quantidade pode inviabilizar as etapas seguintes. Para plantas, os protocolos mais usuais na extração de DNA são baseados no uso do detergente CTAB no tampão de extração. No entanto, de acordo com os diferentes grupos vegetais adaptações ou mudanças nos protocolos são necessárias para otimizar o resultado. Este trabalho teve o objetivo de testar diferentes ensaios com mudanças que podem interferir na qualidade e quantidade de DNA extraído, tais como diferenças no peso da amostra (25 ou 50 mg), a utilização ou não de β -Mercaptoetanol e uma ou duas lavagens com clorofórmio-álcool isoamílico. O gênero alvo desse trabalho foi *Marcetia* DC. o qual já sabe ter uma série de espécies que contêm compostos secundários e portanto dificuldades na extração de DNA. Adicionalmente foram incluídas espécies de outros gêneros para a comparação. A análise foi feita comparando os resultados visualizados em gel de agarose a 1% e espectrofotômetro Nanodrop. A eficiência de extração não foi uniforme para todas as espécies e apesar de se observar uma facilidade em conseguir extrair DNA, este nem sempre apresentou boa qualidade. Os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou 50mg de material seco, sem uso de β -Mercaptoetanol e com apenas uma lavagem de clorofórmio.

Palavras-chave: CTAB, PCR, Recurso vegetal, Campos rupestres, Chapada Diamantina

ABSTRACT

The extraction of DNA is an important step in molecular studies. The high quality DNA extraction can guarantee success in every step in the study, in the same way, low quality DNA or in low amounts can stop every following step. For plants, the usual protocols for extraction are based in one that uses the CTAB detergent as an extraction buffer. However according to the different plant groups adaptations or modifications in the protocols may be necessary for the optimization of the result. This paper had the objective of testing different essays with modification that can alter the quality and quantity of the extracted DNA, it was tested the different dry weight of the sample (25mg or 50mg), the use of β -mercaptoethanol and either one or two washing phases with chloroform: isoamyl alcohol. The target genus of this study was *Marcetia* DC. This genus is known to have a series of species that contain secondary compounds and so difficulties in the DNA extraction, besides *Marcetia* species of other genus were added for comparison. The data analysis was made by comparing the results in the agarose gel at 1% and the spectrophotometer Nanodrop. The extraction efficiency was not uniform for all species although it was observed that while extracting DNA was relatively easy the quality was not always high. The best results were the ones that used 50mg of dry matter, without the use of β -mercaptoethanol and with only one washing phase with chloroform:isoamyl alcohol.

Keywords: CTAB, Plant resources, Chapada Diamantina, Rupestrian fields, PCR

AGRADECIENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer minha família que desde sempre me ajudaram. Em seguida gostaria de agradecer a minha orientadora Andrea Karla que me ajudou a completar este trabalho sendo que sem ela ele não seria possível. De mesma forma gostaria de agradecer a Iasmim Moreira que me ajudou nos trabalhos de laboratório necessários para o trabalho. Assim como Thaylana Santiago, Marianna Galvão e Valber Teixeira por razões similares ao ajudarem de forma indireta no projeto.

Meu colegas de turma também ocupam um lugar importante no meu coração pois me acompanharam em todos os momentos que da faculdade me ajudando em todos os momento. Tendo um agradecimento especial para Bernado Mirabal Douglas Campos, Vinicius Queiroz, Breno Ribeiro e Ronaldo Leoni que me foram meus amigos mais próximos dentre a turma.

Por fim agradecer à FAPESB T.O 0038/2011 por fornecer os fundos para este trabalho

SUMÁRIO

Artigo: Padronização de protocolos de extração de DNA total para o gênero *Marsetia* DC. (Melastomataceae)

Resumo.....	4
Abstract.....	5
Agradecimentos	6
Introdução.....	8
Materiais e Métodos.....	10
Resultados.....	14
Discussão	16
Conclusão.....	18
Quadro 1.....	19
Quadro 2.....	19
Figura 1.....	20
Figura 2.....	21
Figura 3.....	22
Figura 4.....	23
Figura 5.....	24
Referências.....	25
Considerações finais.....	29

PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL PARA O GÊNERO *Marcetia* DC. (MELASTOMATACEAE)

Rômulo Romeu Andrade Macêdo ¹

¹Estudante de Bacharelado em Ciências Biológicas

INTRODUÇÃO

A extração de DNA para trabalhos moleculares é um dos pontos mais importantes para a análise em si, principalmente quando o trabalho está relacionado com plantas. Isso ocorre porque muitas espécies quando submetidas ao processo padrão de extração, retém muitos contaminantes, entre eles: polissacarídeos (Lodhi 1994, Muray 1980), taninos, polifenóis (Porebski 1997), alcaloides, flavonoides e terpenos (Khanuja 1999).

Tais contaminantes podem influenciar na qualidade dos resultados da amplificação de DNA por diversos fatores entre eles: a degradação do DNA extraído, a diluição do DNA extraído dificultando a amplificação, e a interferência dessas substâncias secundárias com as enzimas da PCR (Polimerase Chain Reaction) inibindo a amplificação (Khanuja 1999, Loomis 1974).

Existem algumas opções para reduzir o nível de contaminação do DNA, fatores como a coleta de folhas jovens que tem menos compostos secundários (Porebski 1997) uso de proteinase K, β -mercaptoetanol e clorofórmio (Möller 1992). A partir do uso dessas opções altera-se os métodos de extração para melhor satisfazer as necessidades de cada espécie.

Para extração de DNA técnicas baseadas no uso do detergente CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio) são as mais utilizadas. Um dos protocolos mais utilizados foi proposto por Doyle & Doyle (1987), o qual serve na maioria das vezes como ponto de partida para muitos trabalhos que acabam por modificar o protocolo originalmente (Fulton 1995, Lodhi 1994, Porebski 1997). O método em geral se baseia na utilização do CTAB, que facilita a solubilização das

membranas da célula permitindo o acesso ao DNA. O processo por inteiro pode ser dividido em três partes principais: I quebra das membranas, que ocorre através da maceração e utilização do CTAB, II separação dos polissacarídeos e outras substâncias extras, feita pelo uso do clorofórmio e da centrifugação, e III a fase de precipitação e ressuspensão: através do isopropanol e do tampão TE (Tris-HCl (1M, pH:8,0)/EDTA(0,5 M, pH:8,0)) (Romano 1999).

A padronização de técnicas, especialmente de extração, é importante porque muitas vezes os procedimentos padrão não se aplicam adequadamente a todas as espécies e um protocolo direcionando para determinado grupo pode facilitar e acelerar as pesquisas. Além disso, muitas plantas apresentam compostos secundários que podem influenciar negativamente na extração de DNA, conforme apontado por Khanuja (1999).

O gênero escolhido, *Marcetia* DC. (Melastomataceae), é um grupo de plantas característico dos campos rupestres da Bahia, sendo encontrado principalmente na região da Chapada Diamantina e na Serra do Espinhaço (Santos, 2013). Estudos com o gênero são importantes, pois além deste estar presente em áreas de importância para a conservação, como a Chapada Diamantina, é um gênero com espécies de distribuição muito restrita o que é evidenciado, pelo fato de que 13 das 35 espécies desse gênero estão presentes na última lista de espécies ameaçadas, publicada pela Secretaria do Meio-Ambiente da Bahia (Portaria 40°).

Assim, este trabalho objetivou testar variações no protocolo de extração com CTAB, afim de comparar a eficiência das mudanças na quantidade e qualidade do DNA total extraído. Com o intuito de auxiliar na otimização de protocolos com marcadores moleculares que utilizem DNA total, a exemplo dos marcadores DAF e ISSR (baseados em métodos de PCR), principalmente para espécies que apresentam compostos secundários semelhantes a *Marcetia*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de vegetais:

Foram selecionadas para coleta amostras de quatro espécies de *Marcetia*, sendo elas *M. harleyi* Wurdack, *M. taxifolia* (A.St.-Hil.) DC., *M. mucugensis* Wurdack e *M. velutina* Markgr.), afim de comparar os resultados obtidos com as espécies do gênero *Marcetia*, foram coletadas espécies diferentes porém da mesma família (Melastomataceae) e uma espécie de uma família diferente (Leguminosae), assim foram incluídas as espécies de *Tibouchina heteromalla* (D.Don) Cogn. e *T. granulosa* (Desr.) Cogn., além de *Poincianella pluviosa* (DC.) L.P.Queiroz. Foram coletadas folhas jovens, sadias e livre de fungos ou sujeiras (observação em campo). Essas folhas foram acondicionadas em envelopes de papel absorventes, desidratadas completamente em sílica gel, sendo a sílica substituída até a completa secagem, e armazenadas em freezer para posteriormente serem utilizadas.

Área de coleta:

As amostras de *Marcetia* foram coletadas em áreas de vegetação nativa dos municípios de Mucugê, Barra da Estiva (Chapada Diamantina), sendo que *Marcetia taxifolia*, *M. mucugensis* e *M. velutina* no Parque Municipal de Mucugê (12°59'32.4''S 41°20'31.0''W), já *M. harleyi* foi coletada na rodovia em Barra da Estiva (13°39'35.4''S 41°18'22.8''W). As espécies *Tibouchina heteromalla*, *T. granulosa* e *Poincianella pluviosa* foram coletadas no Campus Anísio Teixeira, da Universidade Federal da Bahia (14°52'41.8''S 40°48'43.9''W) que fica no município de Vitória da Conquista

Etapas da extração com CTAB de DNA realizadas nesse estudo

1: Pesagem do material seco (folha) e congelado (25mg ou 50mg)(*)

2: Preparação do tampão no microtubo, usando 1000 µL de CTAB e posteriormente

aquecimento deste tampão e em banho-Maria a 60°C~65°C por 30 min. Nesta etapa houve uma variação, podendo ter sido adicionado ou não 2 µL de β-mercaptoetanol (*).

3: Maceração da amostra seca em almofariz de porcelana, até que se obtenha um pó;

4: Adição do CTAB pré-aquecido no material macerado e transferência da amostra homogeneizada para o microtubo onde o tampão foi aquecido;

5: Retorno do microtubo com a mistura (tampão + amostra) ao banho-Maria a 60°C~65°C por 30 minutos;

6: Adição de 800 µL de clorofórmio-álcool isoamílico(24:1) no microtubo contendo a a mistura para homogeneização dos microtubos com leves movimentos de inversão por 20min;

7: Após esse processo foi feita à centrifugação, com a rotação de 5.500RPM por 20 minutos;

8: Após a centrifugação são observadas três fases distintas da amostra no microtubo, foi feita a retirada com a pipeta do sobrenadante (fase superior) e transferido para um novo microtubo;

(Podem ser repetidos ou não os passos 6 a 8 mais uma vez)(*)

9: Ao sobrenadante foi adicionado 700 µL de Isopropanol

10: A mistura foi levada ao freezer por 48 horas;

11: Após esse período foi ser feita a centrifugação da amostra, a 5.500RPM por 20 min de forma que o pellet ficou aderido ao fundo do microtubo;

12: O sobrenadante deve ser escorrido ou retirado com cuidado para não soltar o *pellet* e este deve ser lavado pelo menos duas vezes com etanol 70%.

13: Após lavado o *pellet* deve ser seco a temperatura ambiente por algumas horas para evaporação completa do etanol;

14: Após seco foi adicionado 100 μ L de tampão TE 10x para a ressuspensão, este processo final completo durou de 1 a 3 dias.

As etapas acima fazem referência à técnica básica utilizada no laboratório baseada em Doyle & Doyle (1987), sendo aquelas sinalizadas com o (*) os passos que foram modificados para comparação de influência na maior efetividade na extração. As modificações foram feitas sempre a partir das amostras que apresentaram melhores resultados, totalizando quatro modificações no protocolo combinados da seguinte maneira:

I. Teste na quantidade de peso de amostra seca de 25mg, sem β -mercaptoetanol e uma lavagem com clorofórmio álcool isoamílico;

II. Teste na quantidade de peso de amostra seca de 50 mg, sem β -mercaptoetanol e uma lavagem com clorofórmio álcool isoamílico;

III. As amostras com melhor resultado passaram por adição ou não de β -mercaptoetanol;

IV. Os melhores resultados do teste acima foram submetidos a comparação do processo de uma ou duas lavagens com clorofórmio álcool-isoamílico.

Durante todas as etapas do processo de extração foi verificado atentamente se as amostras apresentavam mudança de coloração ou do aspecto esperado, este aspecto faz referência à coloração normal, verde, sendo que quanto mais escura mais oxidação está presente, entre uma fase e outra.

Análise e avaliação do DNA total extraído

Após cada protocolo seguido foi feita a avaliação da qualidade e a quantificação do

DNA presente em cada amostra extraída, essa avaliação foi feita por dois tipos de quantificação, a eletroforese em gel de agarose a 1% e a espectrofotometria com o uso do Nanodrop.

Avaliação qualitativa do DNA total extraído

O gel de agarose foi feito à concentração de 1%, com tampão TBE (Tris-Ácido Bórico-EDTA) e corado com Brometo de Etídio. Para a inclusão nos poços do gel as amostras foram preparadas com o uso de 5 µL de azul de bromofenol mais 3 µL de amostra de DNA extraído, o tempo de corrida foi de 30min sendo utilizado 90 V e 120 A. Após a corrida o gel foi revelado em sistema de fotodocumentação para visualização das bandas de DNA. Tanto foi verificado se houve extração, como os padrões de apresentação dessas bandas. Os resultados foram comparados com a literatura, por exemplo, com a síntese apresentada por Romano e Brasileiro (1999) e Costa (2001), e com o formato e conformação das bandas, arrasto e posição do DNA como mencionado por Bloom (1996)

Avaliação quantitativa:

Essa avaliação foi feita a partir de uso de espectrofotometria para se observar a quantidade de DNA total e o nível de pureza ou contaminação utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 2000 sendo utilizado 2 µL de amostra para os testes. O espectrofotômetro analisa a pureza e a concentração de DNA a partir da densidade óptica, considerando que o DNA absorve luz no comprimento de 260 nm e as proteínas, por exemplo em 280 e outros grupos de matéria orgânica mais próxima de 230 nm, assim quanto maiores os valores de 280 e 230 maior a contaminação, sendo então aceito que os valores da razão de 260/280 deve ser próximos de 1,8~2,0 e da razão 260/230 próximo de 1,8~2,2 para o DNA ser considerado puro (Oliveira 2007)

RESULTADOS

Foram comparadas quatro variações do protocolo CTAB, totalizando 7 extrações, por variação, e 46 amostras analisadas no total. Os resultados para cada espécie em cada uma das quatro combinações estão expressos nos quadros e nas figuras em anexo. No Quadro 1 estão os resultados da análise quantitativa através da espectrofotometria com o uso do Nanodrop, é possível perceber que não houve um protocolo que fosse o melhor para todas as espécies amostradas, os valores em negrito mostram qual protocolo foi o mais evidente para cada espécie.

Os resultados também estão expressos nas Figuras 1 e 2. Comparando a quantidade de peso seco (25 ou 50mg), foi verificado que para todas as espécies foi conseguido extrair DNA, porém para as espécies de *Marcetia* a quantidade final de DNA foi maior com o uso de 50 mg de peso seco, para espécies de outros gêneros o peso de 25mg apresentou maior quantidade de DNA extraído. No segundo ensaio usando 50 mg de amostra e testando a eficiência do β -mercaptoetanol, para *Marcetia* percebeu-se que apenas *M. mucugensis* apresentou maior quantidade de DNA comparando com o ensaio anterior, para as espécies de outros gêneros o uso do β -mercaptoetanol, favoreceu maior extração de DNA quando seu peso foi de 50 mg. (Quad. 1 e Fig. 3)

Quando foi feita a análise qualitativa em gel de agarose, também foi possível perceber que não houve um único protocolo que fosse mais eficiente para todas as espécies (Fig. 1 e 2). Para *Marcetia harleyi*, o melhor foi o segundo tratamento (50mg, não uso de β -mercaptoetanol e única lavagem com clorofórmio). Para *M. taxifolia* este segundo tratamento foi o mais eficiente em extrair DNA. Porém esta banda apresentou-se curvada e também com grande quantidade de arrasto e de RNA demonstrando contaminação. Para *M. mucugensis*, não houveram grandes diferenças no padrão de bandas observado nos diferentes tratamentos, mas os tratamentos 3 e 4 não apresentaram arrasto. Por fim para *M. velutina* o tratamento 3 (com β -mercaptoetanol) foi o mais eficiente em extrair DNA, mas os tratamentos 2 e 4 se mostraram mais eficientes

em diminuir o arrasto, ou seja a quantidade de material degradado ou outros contaminantes.

A partir dos dados registrados após a quantificação no Nanodrop (Quad. 2 e Fig. 4 e 5) pode-se verificar que os diferentes ensaios influenciaram na qualidade do DNA, principalmente para a razão A260/280, que indica a contaminação (por proteínas e compostos fenólicos) quando é menor que 1,8. O peso de material seco foi o principal determinante desta qualidade, uma vez que o protocolo com 25mg apresentou os piores resultados para todas as espécies. Quando se observa a razão A260/230 (contaminação por polissacarídeos, carboidratos e compostos fenólicos). Percebe-se que nenhum dos ensaios foi eficiente, uma vez que todos apresentam valores bem inferiores a 1,8. No entanto, os melhores resultados para as amostras aqui utilizadas foram o uso de duas lavagens com o clorofórmio álcool-isoamílico (Quad. 2)

Quando se compara as Quadros 1 e 2 (com os dados de quantidade e qualidade do DNA extraído respectivamente), percebe-se que não há uma correlação clara entre a contaminação visualizada no gel e os valores das razões A260/280 do Nanodrop. Por exemplo, para *Marsetia taxifolia* (Fig. 1 amostras 2.1-2.4), o DNA extraído no ensaio 2.2 foi o que apresentou arrasto mais evidente no gel, teve os maiores valores da razão A260/280. Quando se observa espécies de outros gêneros isso também se repete, a exemplo dos resultados dos ensaios 5.1 e 5.3 para *T. granulosa* ambos com arrasto muito evidente e com a pior e a melhor razão de A260/280, respectivamente.

Por fim, além dos dados acima apresentados com base nos resultados finais de cada ensaio foi verificado ao longo de todas as etapas do processo de extração, a ocorrência da mudança de aspecto ou coloração das amostras a cada etapa, e apenas aquelas da *P. pluviosa* apresentaram uma cor marrom durante e após a adição de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 e centrifugação, bem como o *pellet* de DNA formado apresentou uma coloração marrom claro. No entanto, como pode ser visto nos resultados da eletroforese e do Nanodrop este fator não impediu a extração do DNA, mas foi à espécie que apresentou arrasto mais evidente na quantificação e o ensaio que denotou o melhor valor da razão A260/280 foi aquele em que foi utilizado β -mercaptoetanol

DISCUSSÃO

A partir desses resultados foi possível perceber que protocolos com base em CTAB foram eficientes para extrair o DNA, corroborando com os dados da literatura de que esse de fato é um método eficiente para espécies vegetais (Alzate-Marin 2009, Doyle e Doyle 1987 Romano e Brasileiro 1999). Porém a quantidade e qualidade obtida variaram bastante quando comparado as espécies de *Marcetia* com as espécies de outros gêneros. Percebe-se que os mesmos protocolos foram menos eficientes para as *Marcetia*, sugerindo a existência de compostos específicos para o gênero Lodhi (1994) , Khanuja (1999) e Porebski (1997) destacaram em seus trabalhos que a presença de compostos secundários em algumas espécies interferem na quantidade e qualidade do DNA extraído

De acordo com Bloom (1996) a presença e a intensidade do arrasto visualizado no gel evidenciam tanto contaminação quanto degradação do DNA. Observando as figuras 1 e 2 dos géis é possível perceber tanto o arrasto quanto alguma quantidade de DNA retido no poço de aplicação (Amostras: 1.3, 2.2, 2.3, 2.4, 4.3, 5.1, 5.3, 6.1, 6.3, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4) indicam que o DNA não foi diluído totalmente e apresenta um DNA de grande tamanho molecular (Bloom 1996)

Na avaliação qualitativa foi observada a forma da banda de DNA, de acordo com Bloom (1996) e Costa (2001) quanto mais circular, mais enovelada a banda de DNA, é considerada, bandas como a encontrada na Figura 1. Amostra 2.2 são as consideradas *supercoiled* (super enovelada, encontrada em plasmídeos) estas bandas de DNA se movem mais rápido no gel por isso forma este formato.

A presença de muito RNA também foi verificada em algumas amostras (Fig. 1 amostra 2.2) essas bandas que são de ácido nucléico de fita única se movem muito mais rápido que o DNA e quando em excesso podem também prejudicar a amplificação. No

entanto caso seja necessário eliminar esse excesso de RNA para o trabalho na etapa de amplificação pode se fazer o uso de RNAses para a limpeza desses contaminantes (Costa 2001).

Fulton (1995) traz possíveis soluções para alguns problemas comuns na extração sendo eles: Baixa quantidade de DNA extraído: utilização de tecido mais jovem, ou a maceração por mais tempo permitindo uma melhor quebra das paredes; problemas na fixação do *pellet* após a centrifugação com isopropanol: uso de 70% de Etanol com uma centrifugação por alguns minutos a uma baixa intensidade; e baixa diluição do DNA: deixar o *pellet* ressuspender por mais tempo, ou centrifugar o material por menos tempo depois da utilização de isopropanol, pois caso seja muito longo existe a possibilidade de polissacarídeos contaminarem a amostra

Com relação a qualidade do DNA, estimada pela espectrofotometria, observando a razão A260/280, verificou-se que para quase todos testes os valores de contaminação foram baixos, Alzate-Marin et. Al. (2009) conseguiram amplificar com sucesso DNA cujos valores quantificados de extração estavam entre 333 e 530 ng e a razão A260/280 entre 1,03 e 1,30. Desta forma, acredita-se que as adaptações utilizadas foram eficientes para a extração de DNA e permitirá a partir de agora o uso do material nos testes para amplificação.

CONCLUSÃO

O uso de protocolos em CTAB foi eficiente na extração de DNA para o gênero *Marsetia*. A análise do gel e do Nanodrop revelaram que aparentemente o DNA tem quantidade e qualidade aceitáveis para a amplificação, mas ainda apresenta alguns arrastos, excesso de RNA e presença de polissacarídeos evidenciada pelo DNA retido no poço de aplicação. Embora as razões de A260/280 indicam boa qualidade de DNA para alguns contaminantes, as razões de A260/230 demonstram que ainda há contaminação e esta pode interferir na PCR. A principal evidência deste estudo é que dentre as sete espécies analisadas não houve método que fosse igualmente eficiente para todas, ressaltando assim a necessidade de testes prévios, de acordo com cada espécie antes de realizar estudos moleculares. Embora seja possível a recomendação do teste III com o uso de 2 μ L de β -mercaptoetanol pois este obteve os melhores resultados em média

Quadro 1. Quantidade de DNA extraído para cada uma das modificações realizadas no protocolo com CTAB. Nanodrop ng/ μL . Em negrito estão destacados para cada espécie quais foram os ensaios que resultaram na maior quantidade de DNA extraído.

<i>Espécie</i>	<i>Teste I</i>	<i>Teste II</i>	<i>Teste III</i>	<i>Teste IV</i>
<i>Marcetia harleyi</i>	77,3 ng/ μL	275,4 ng/μL	203,7 ng/ μL	126,1 ng/ μL
<i>Marcetia taxifolia</i>	167,9 ng/ μL	377,1 ng/μL	314,5 ng/ μL	265,4 ng/ μL
<i>Marcetia mucugensis</i>	157,8 ng/ μL	153,8 ng/ μL	219,9 ng/μL	166,2 ng/ μL
<i>Marcetia velutina</i>	209,3 ng/ μL	186,2 ng/ μL	257,2 ng/μL	226,3 ng/ μL
<i>Tibouchina heteromalla</i>	839,3 ng/μL	270,5 ng/ μL	712,3 ng/ μL	286,6 ng/ μL
<i>Tibouchina granulosa</i>	422,9 ng/ μL	286,8 ng/ μL	544,1 ng/μL	242,4 ng/ μL
<i>Poincianella pluviosa</i>	342,9 ng/ μL	415,0 ng/ μL	434,0 ng/ μL	462,2 ng/μL

Quadro 2. Qualidade do DNA extraído para cada uma das modificações realizadas no protocolo com CTAB. Nanodrop. Em negrito estão destacados para cada espécie quais foram os ensaios que resultaram na melhor qualidade de DNA extraído.

<i>Espécie</i>	<i>Teste I</i>		<i>Teste II</i>		<i>Teste III</i>		<i>Teste IV</i>	
	<i>A260/230</i>	<i>A260/280</i>	<i>A260/230</i>	<i>A260/280</i>	<i>A260/230</i>	<i>A260/280</i>	<i>A260/230</i>	<i>A260/280</i>
<i>Marcetia harleyi</i>	0,36	1,61	0,44	1,47	0,34	1,83	0,50	2,07
<i>Marcetia taxifolia</i>	0,31	1,77	0,52	1,68	0,44	1,92	0,60	1,93
<i>Marcetia mucugensis</i>	0,34	1,13	0,36	1,74	0,44	1,49	0,74	1,89
<i>Marcetia velutina</i>	0,37	1,56	0,39	1,60	0,45	1,61	0,62	1,54
<i>Tibouchina heteromalla</i>	0,45	1,13	0,62	1,89	0,95	1,80	0,95	1,80
<i>Tibouchina granulosa</i>	0,59	1,59	0,53	1,79	0,80	1,91	0,92	1,71
<i>Poincianella pluviosa</i>	0,57	1,53	0,83	1,85	0,87	1,98	0,92	1,57

Figura 1: Quantificação em gel de agarose 1% Espécie: 1 *M. harleyi* 1.1 25mg, 1.2 50mg, 1.3 β -mercaptoetanol 1.4: Duas lavagens com clorofórmio álcool isoamílico; Espécie 2: *M. taxifolia* 2.1 25mg, 2.2 50mg, 2.3 β -mercaptoetanol, 2.4 Duas lavagens com clorofórmio álcool isoamílico; Espécie 3: *M. mucugensis* 3.1 25mg, 3.2 50mg, 3.3 β -mercaptoetanol 3.4 Duas lavagens com clorofórmio álcool isoamílico; Espécie 4: *M. velutina* 4.1 25mg, 4.2 50mg, 4.3 β -mercaptoetanol 4.4 Duas lavagens com clorofórmio álcool isoamílico

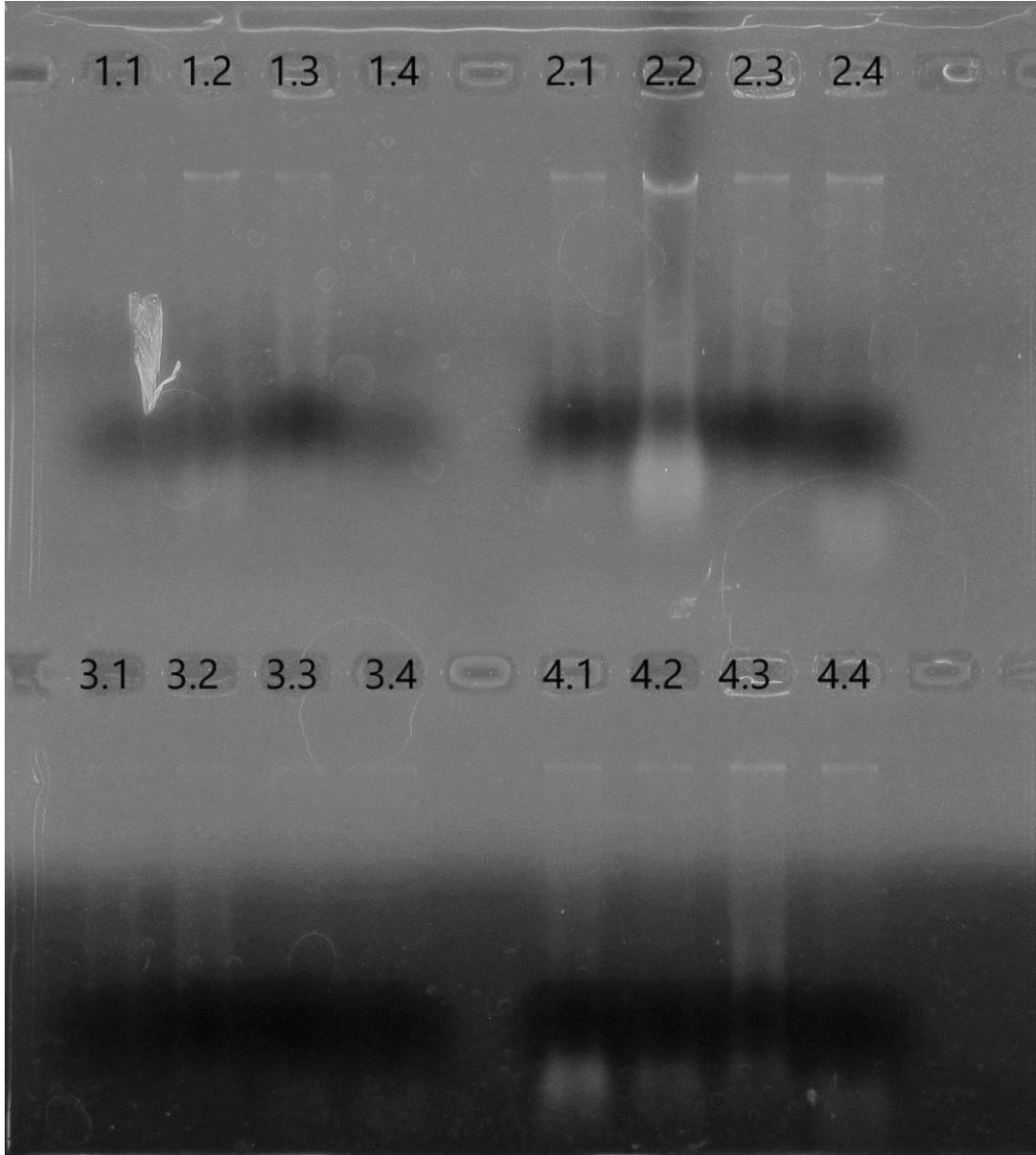


Figura 2: Quantificação em gel de agarose 1% Espécie 5: *T. heteromalla* 5.1 25mg, 5.2 50mg, 5.3 β -mercaptoetanol 5.4: Duas lavagens com clorofórmio álcool isoamílico; Espécie 6: *T. granulosa* 6.1 25mg, 6.2 50mg, 6.3 β -mercaptoetanol 6.4: Duas lavagens com clorofórmio álcool isoamílico; Espécie 7: *Poincianellapluviosa* 7.1 25mg, 7.2 50mg, 7.3 β -mercaptoetanol 7.4: Duas lavagens com clorofórmio álcool isoamílico;

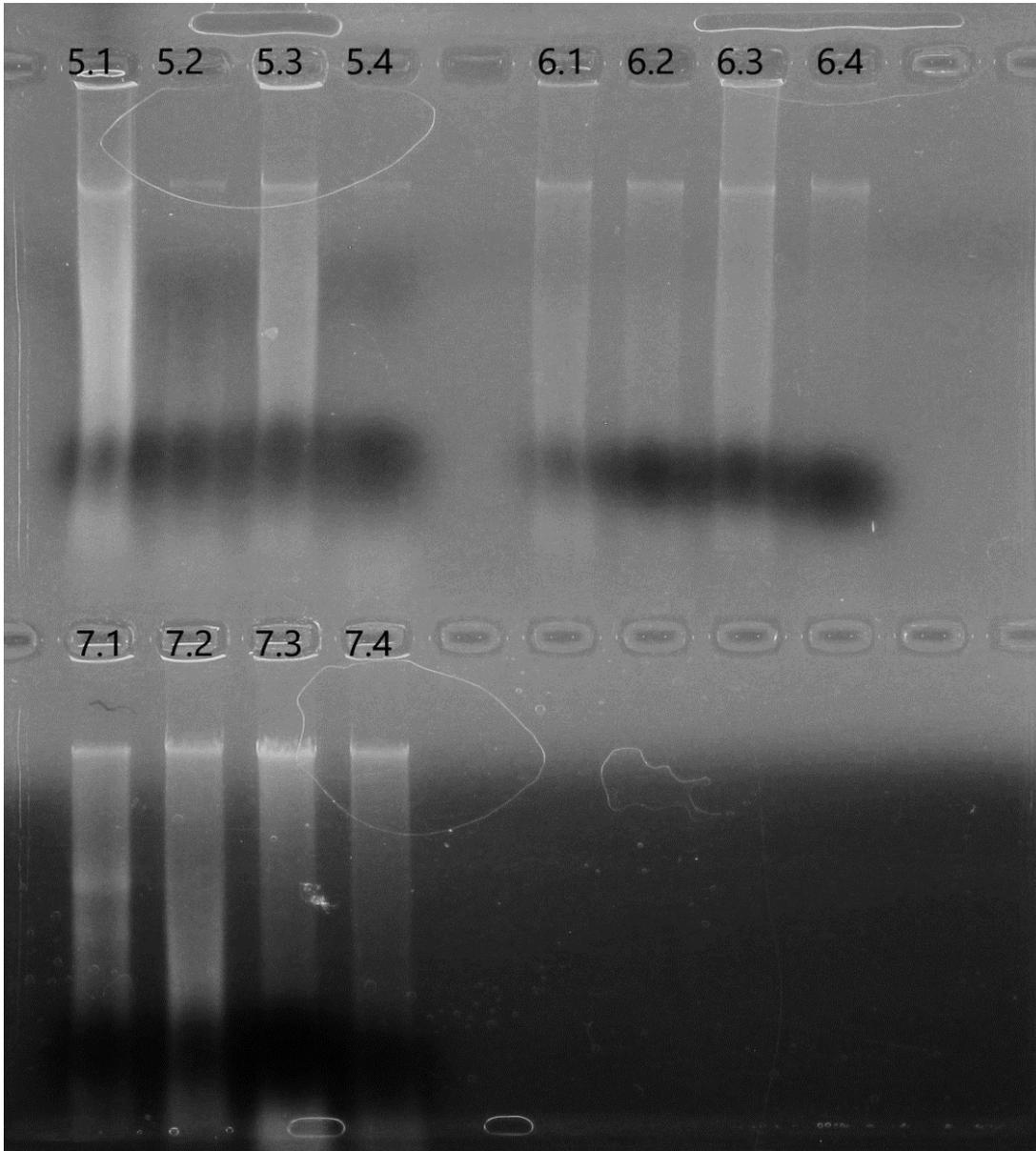


Figura 3: Quantidade de DNA total extraído para cada uma das espécies em cada um dos diferentes ensaios. No eixo Y valores ng/uL de DNA.

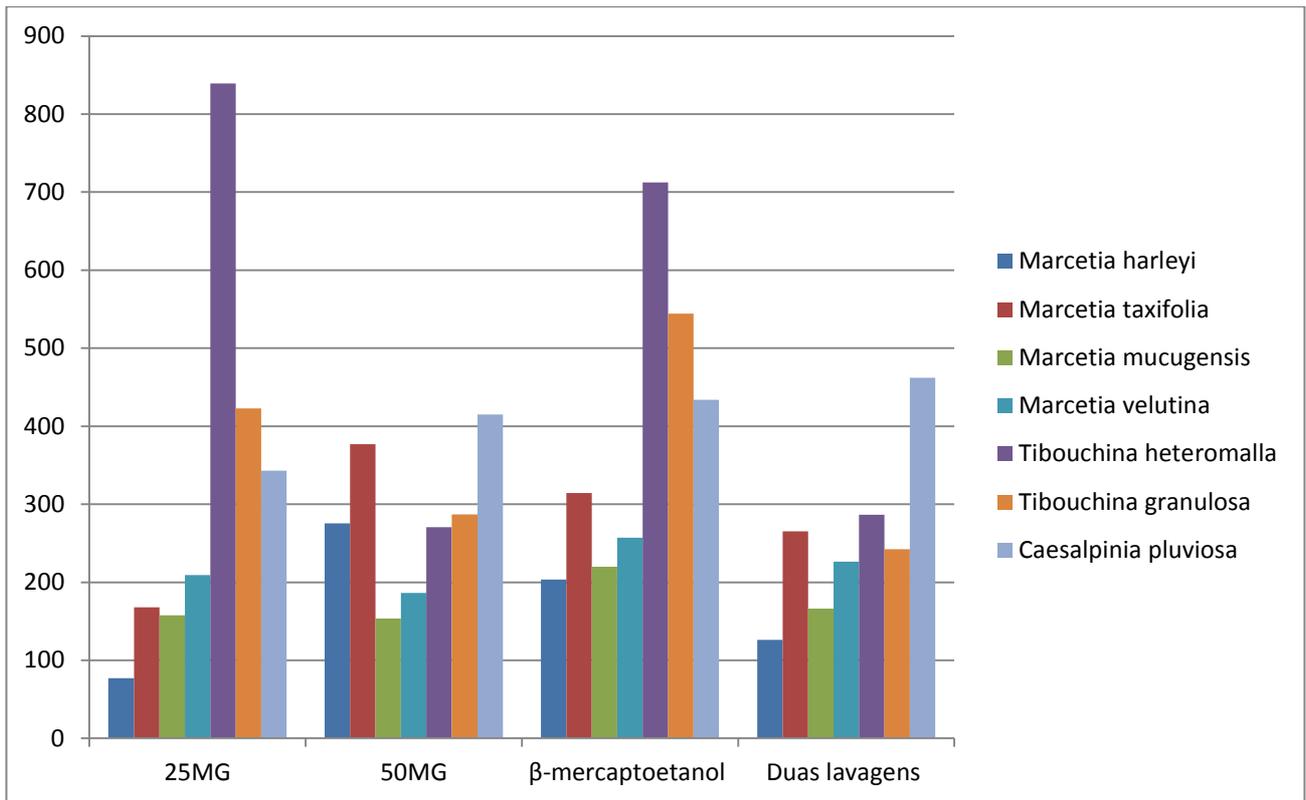


Figura 4: Qualidade do DNA extraído para cada uma das espécies em cada um dos diferentes ensaios. No eixo Y valores da razão 260/230 de DNA

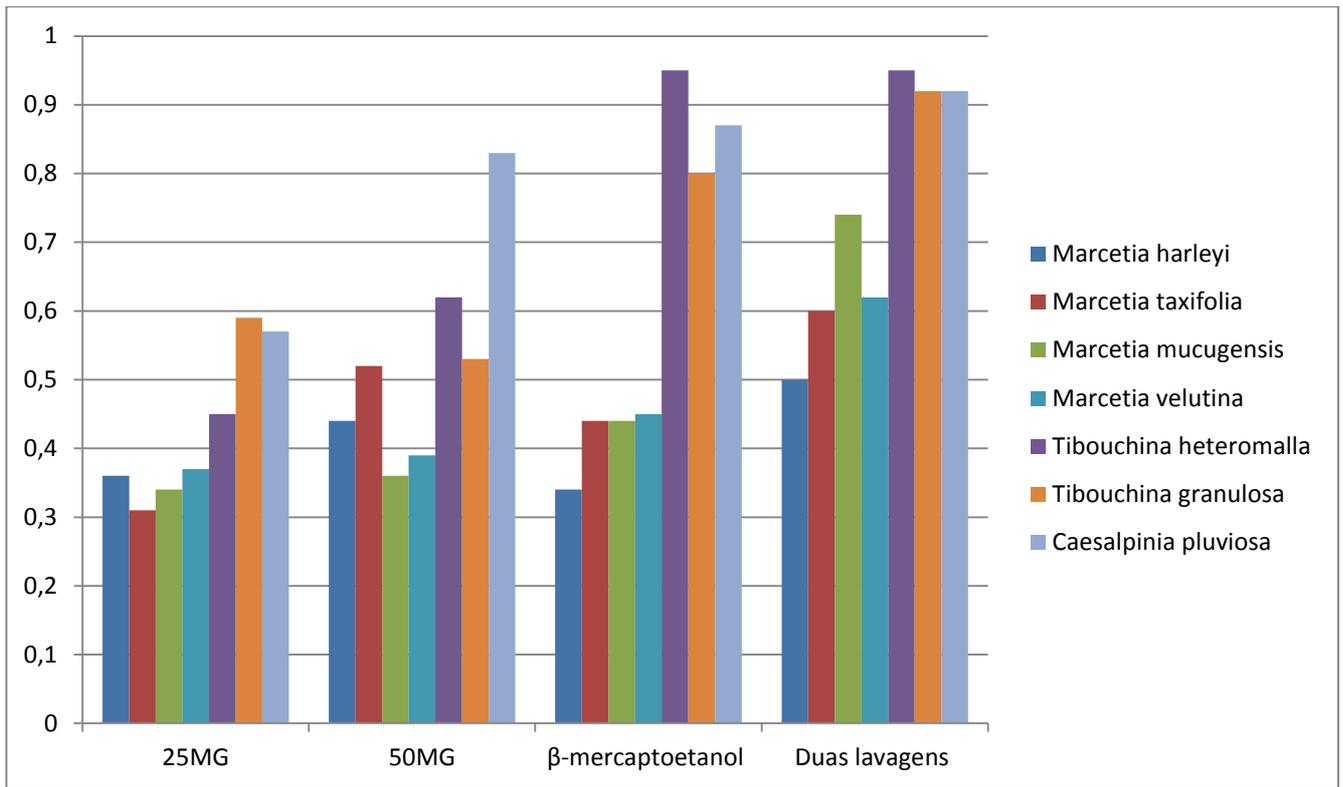
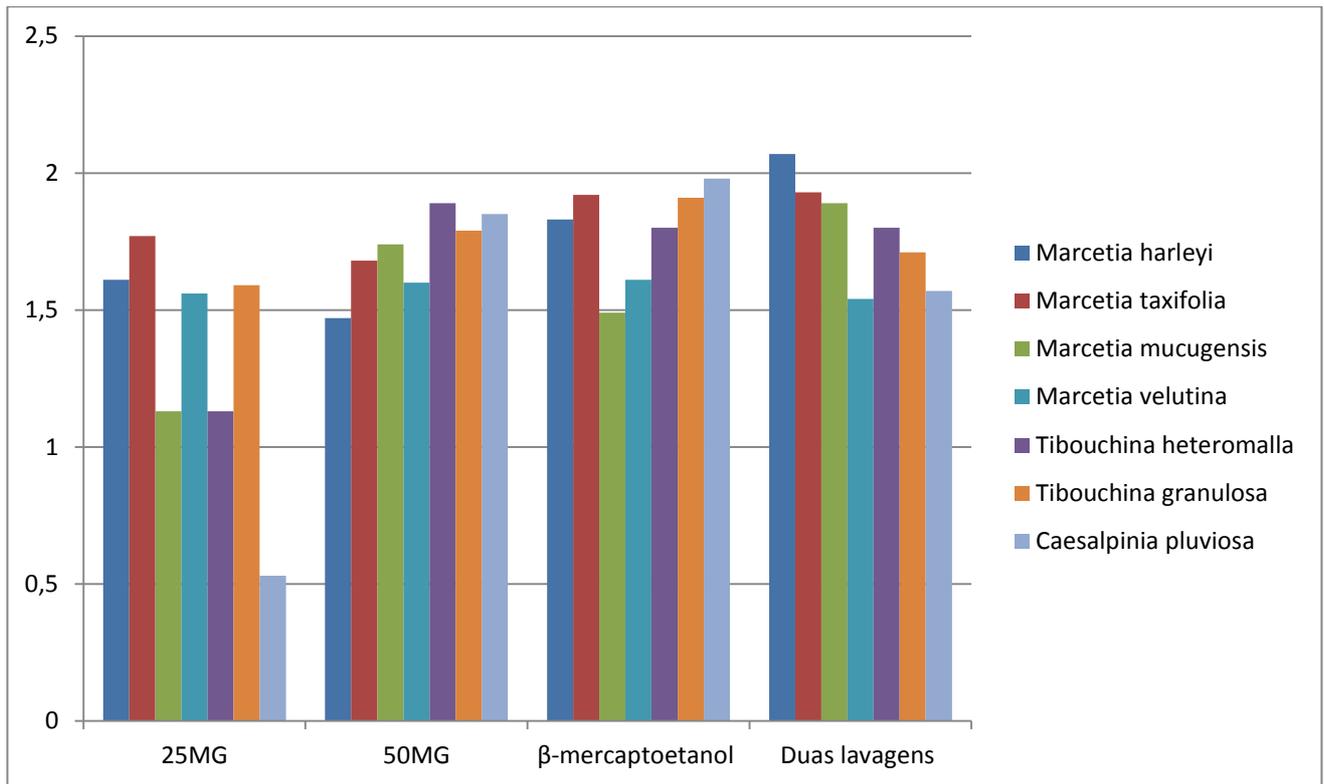


Figura 5: Qualidade do DNA extraído para cada uma das espécies em cada um dos diferentes ensaios. No eixo Y valores da razão 260/280 de DNA



REFERÊNCIAS

Alzate-Marin, A.L. M.C Guidugli, H.H. Soriani, C.A. Martinez and M.A Mestriner. 2009. An efficient and rapid DNA minipreparation procedure suitable for PCR/SSR and RAPD analyses in tropical forest tree species. *Braz Arch Biol Technol* 52:1217-1224.

Bloom, M. V., G.A. Freyer and D.A. Micklos. 1996. *Laboratory DNA Science: an introduction to recombinant DNA techniques and methods of genome analysis*. The Benjamin/Cummings publ.Co.Inc

BRASIL. Portaria nº 40, de 21 de agosto de 2017

Costa, M.C. and E.F. Moura 2001 Manual de extração de DNA documento número 89 Embrapa

Doyle, J.J., J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. *Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer* 19:11-15

Fulton, T.M., J. Chunwongse and S.D. Tanksley 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants *molecular Biology Reporter* 13:207-209

Khanuja, S.P.S., A.K. Shasany, M.P. Darokar and S. Kumar. 1999. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils *molecular Biology Reporter* 17:1-7

Lodhi, M.A, G.N. Ye, N.F. Weeden and B.I. AReisch. 1994. simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species *molecular Biology Reporter* 12:6-13

Loomis M.D. 1974 Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant DNA , *Nucl Acids Res* 8:4321-4325

Möller, E.M., G. Bahnweg, H. Sandermann and H.H. Geiger. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues, *Oxford University Press* 20:6115-6116

Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Res.* 8:4321-432

Oliveira, M. C.S., L. C.A. Regitano, A. D Roese, D. G Anthonisen, E. Patrocínio, M. M. Parma, S. M. Scagliusi, W. H. B. Timoteo and S. N. J. Belicuas. 2007. Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase. São Carlos, EMPBRAPA Pecuária Sudeste. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/32770/1/LivroProtMolecular.pdf>. Acesso em: 26/11/2018.

Porebski, S., L.G. Bailey and B.R Baum.1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components molecular Biology Reporter 15:8-15

Romano, E. and , A. C. M. Brasileiro. 1999. Extração de DNA de plantas: soluções para problemas comumente encontrados. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, ano 2:40-43

Santos, A.K.A., A.B. Martins, T.R.S. Silva.2013.Two New Species of *Marcetia* (Melastomatacea) from the Chapada Diamantina, Bahia, Brazil systematic botany 38:714-722

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No fim do trabalho foi possível a extração de DNA de todas as espécies e embora não se tenha obtido um protocolo único e uniforme para todas as espécies extraídas. Isso corrobora com a ideia que trabalhos moleculares devem fazer testes para as extrações dependendo da espécie. E embora os resultados não sejam uniformes o teste melhor por assim dizer foi o III com o uso de 50mg de matéria seca uso de 2 μ L de β -mercaptoetanol e com apenas uma lavagem de clorofórmio álcool isoamílico