



Extração de DNA de *Catasetum gladiatorium* K. G. Lacerda (Orchidaceae) para uso em estudos moleculares

Kelli Évelin Müller Zortéa^{1*}, Géssica Tais Zanetti¹, Marta Helena Schorn de Souza¹,
Guilherme Ferreira Pena¹ e Ana Aparecida Bandini Rossi¹

Recebido: 25 de outubro de 2018 Recebido após revisão: 5 de junho de 2019 Aceito: 15 de setembro de 2019

Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/4193>

RESUMO: (Extração de DNA de *Catasetum gladiatorium* K. G. Lacerda (Orchidaceae) para uso em estudos moleculares). *Catasetum gladiatorium* é endêmica do Brasil e localiza-se em regiões com perturbações ambientais que podem afetar sua diversidade genética. Análises de diversidade genética necessitam de DNA íntegro, obtido por meio de protocolos de extração rápidos e eficientes. Este estudo objetivou propor um protocolo eficiente para a extração de DNA de *C. gladiatorium*, para uso em futuras análises moleculares. O DNA foi extraído do tecido foliar com oito protocolos baseados no método CTAB. Testou-se o tipo de trituração do material vegetal (com tampão STE e nitrogênio líquido) e a concentração de CTAB (2% e 5%) e de β-mercaptoetanol (0% e 2%) no tampão de extração. O DNA extraído foi submetido a amplificação com dois *primers* ISSR. Os métodos de trituração do material vegetal influenciaram na qualidade e quantidade de DNA extraído de *C. gladiatorium*. A trituração com nitrogênio líquido permitiu a extração de DNA de boa qualidade em todas as demais variações dos protocolos testados, enquanto a trituração com STE possibilitou a extração de DNA com baixa concentração e alta taxa de degradação. Melhores resultados foram obtidos com CTAB à 5%. A ausência de β-mercaptoetanol não influenciou a qualidade do DNA extraído. A amplificação via PCR, demonstrou que o DNA extraído com base nos oito protocolos testados foi passível de amplificação utilizando os dois marcadores ISSR selecionados. Os oito protocolos de extração testados foram capazes de extrair DNA passível de amplificação de *C. gladiatorium*, e podem ser indicados para futuros estudos moleculares da espécie.

Palavras-chave: Orquídea, CTAB, nitrogênio líquido, STE.

ABSTRACT: (DNA extraction of *Catasetum gladiatorium* K.G.Lacerda (Orchidaceae) for use in molecular studies). *Catasetum gladiatorium* is endemic to Brazil, being usually found in areas subjected to environmental disturbances that may affect its genetic diversity. Analyses of genetic diversity require extraction of pure DNA through fast and efficient protocols. We propose here an efficient protocol to extract the DNA of *C. gladiatorium* for use in molecular analyses. DNA was extracted from leaf tissue using eight protocols based on the CTAB method. We tested: (1) two types of plant material maceration (using STE buffer and liquid nitrogen); (2) two CTAB concentrations (2% and 5%); and (3) two concentrations of β-mercaptoethanol (0% and 2%) in the extraction buffer. We performed amplification reactions with the extracted DNA using two ISSR primers. The methods of plant material maceration influenced the quality and amount of DNA extracted from *C. gladiatorium*. Maceration with liquid nitrogen allowed us to obtain high-quality DNA in all other variations of the tested protocols. On the other hand, maceration with STE yielded DNA at low concentrations and highly degraded. The best results were obtained using 5% CTAB. The absence of β-mercaptoethanol did not influence the quality of the extracted DNA. PCR demonstrated that DNA extraction using the eight tested protocols allowed for amplification with both ISSR markers. The eight protocols were able to extract amplifiable *C. gladiatorium* DNA, and may thus all be indicated for future molecular studies on the species.

Keywords: Orchid, CTAB, Liquid nitrogen, STE.

INTRODUÇÃO

O gênero *Catasetum* Rich. ex Kunth (Orchidaceae) possui um número controverso de espécies, apresentando entre 130 a 200 espécies (Engels *et al.* 2016). As espécies deste gênero estão distribuídas pelas Américas Central e do Sul e possuem grande representação no Brasil, com 113 espécies descritas, sendo a maior riqueza encontrada na Amazônia (Barros *et al.* 2010, Engels *et al.* 2016, Flora do Brasil 2018). O gênero foi registrado em diversos biomas e nas diversas fitofisionomias desses biomas (Petini-Benelli & Smidt 2017) e suas espécies possuem grande plasticidade morfológica se adaptando facilmente a novas áreas e mudanças ambientais (Petini-Benelli 2012). Recentemente, novas espécies foram descritas na Amazônia (Petini-Benelli & Soares-Lopes 2015, En-

gels *et al.* 2016), ampliando os registros de distribuição geográfica de espécies já conhecidas.

Catasetum gladiatorium K. G. Lacerda é uma espécie de orquídea epífita endêmica do Brasil, distribuída pelo planalto central brasileiro e com registro nos estados de Mato Grosso, Goiás e Tocantins (Oliveira *et al.* 2010). Indivíduos dessa espécie podem ser encontrados em áreas de cerrado, matas ciliares ou de galeria (Barros *et al.* 2015, Flora do Brasil 2018).

As regiões onde esta espécie é encontrada sofrem perturbações ambientais, tais como: queimadas, desmatamento e expansão da ocupação humana (Petini-Benelli *et al.* 2007). Devido a estas perturbações, não só esta espécie mas muitas outras espécies de orquídeas do gênero podem estar perdendo seus habitats e consequentemente

1. Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular, Universidade do Estado de Mato Grosso. Avenida Perimetral Rogério Silva, s/n, Bairro Flamboyant, CEP 78580-000, Alta Floresta, MT, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: kellimuller@hotmail.com

sua diversidade genética (Petini-Benelli *et al.* 2007).

Para auxiliar no processo de caracterização, classificação e relação filogenética das novas espécies de orquídeas descritas, bem como compreender o efeito das perturbações ambientais na diversidade genética destas espécies, podem ser realizados estudos com marcadores moleculares (Machado Neto & Vieira 2011, Abbas *et al.* 2017, Hartati 2017). No entanto, para a aplicação desses marcadores é necessário primeiramente a extração de DNA íntegro e em quantidade adequada para realização das análises (Fu *et al.* 2017).

O protocolo CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio), descrito por Doyle & Doyle (1987) vem sendo amplamente utilizado para extrair DNA de espécies vegetais, principalmente pela alta quantidade e qualidade do DNA extraído (Schmitt *et al.* 2014). Contudo, mesmo em espécies do mesmo gênero ou relacionadas, a quantidade de metabólitos secundários e polissacarídeos produzidos pode variar, fato que interfere na qualidade e na quantidade de DNA extraído, sendo necessário a realização de adaptações no protocolo de extração visando diminuir gastos e maximizar resultados (Danner *et al.* 2011, Devi *et al.* 2013).

Diante do exposto e visando futuros estudos sobre a caracterização molecular, relações filogenéticas e avaliação da diversidade genética de espécies do gênero *Catasetum*, com especial atenção para a espécie *C. gladiatorium*, este estudo objetivou estabelecer um protocolo eficiente para a extração de DNA de *C. gladiatorium* para uso em estudos moleculares.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular do CETAM (Centro de Tecnologia da Amazônia Meridional) na Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus Universitário de Alta Floresta, estado do Mato Grosso.

O material vegetal utilizado consistiu em folhas em estágio intermediário de desenvolvimento, coletadas de dois indivíduos de *C. gladiatorium*. A coleta foi realizada um dia antes da extração, no orquidário da Universidade do Estado de Mato Grosso e o material vegetal foi acondicionado em sacos plásticos estéreis e, armazenado em geladeira a 4 °C até o momento do uso.

A extração de DNA foi realizada com base no protocolo CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987), com modificações na concentração de CTAB (2% e 5%), de β -mercaptoetanol (0% e 2%), trituração das folhas em tampão STE (130 g de sacarose, 4,5 mL de Tris HCl 1M pH 8,3, 15 mL de EDTA 0,5M, completando o volume com água destilada para 1.500 mL) (Bhattacharjee *et al.* 2009) e nitrogênio líquido. As modificações no protocolo de extração foram estimadas visando à eficiência no processo de extração, bem como, redução da degradação do material genético vegetal. Foram testados oito protocolos de extração (Tab. 1). Todos os protocolos foram aplicados em duplicatas para cada indivíduo.

Aproximadamente 200 mg de folhas foram trituradas em almofariz com auxílio de pistilo na presença de nitrogênio líquido nos protocolos 1 a 4 e na presença de 2 mL de tampão STE nos protocolos 5 a 8. Em seguida transferiu-se o material triturado para microtubos de 2 mL, nos quais foram acrescentados 800 μ L de tampão de extração CTAB (100 mM Tampão Tris-HCl pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; CTAB 2% ou 5% e PVP 1%). O β -mercaptoetanol foi adicionado proporcional ao volume de tampão CTAB de cada amostra seguindo as informações descritas na Tabela 1. Os microtubos foram agitados por um minuto em vórtex e incubados a 65 °C por 30 minutos no banho-maria. A solução foi homogeneizada uma vez após 15 minutos de incubação. Em seguida os microtubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionou-se 700 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Agitou-se novamente os microtubos em vórtex por 30 segundos, sendo em seguida centrifugados por 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo (1,5 mL), adicionou-se então 500 μ L de isopropanol gelado misturando-se levemente. As amostras foram incubadas a -20 °C por três horas.

Após a incubação, os microtubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, o líquido sobrenadante foi descartado. Foram realizadas três lavagens do precipitado sendo duas com etanol 70% e uma com etanol 95%, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por três minutos a cada lavagem. Deixou-se o pellet secar a temperatura ambiente por 1 hora.

Em seguida, o material foi ressuspenso em 40 μ L de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,3; 1 mM EDTA) contendo RNase em concentração de 40 μ g/mL. As amostras foram incubadas por mais 30 minutos a 37 °C e levadas à geladeira a 4 °C *overnight*. Em seguida, foram armazenadas a -20 °C.

A qualidade e a quantidade de DNA foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% e por comparação com marcador de DNA (100 ng/ μ L). O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador UVB LBT-20x20 STi Loccus Biotecnologia. As imagens do gel foram obtidas com fotodocumentador L-Pix STi Loccus Biotecnologia.

Para o teste de amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foram utilizados dois *primers* ISSR (Tabela 2) obtidos da Universidade de British Columbia (UBC set n° 9).

As reações foram realizadas em termociclador Aeris™ (Esco®) seguindo o protocolo descrito por Rossi *et al.* (2014) com ajustes nas concentrações dos reagentes. Cada reação foi realizada em volume final de 20 μ L contendo: 2 μ L de Tampão 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,3; 500 mM KCl; 0,1% de tween 20), 2 μ L MgCl₂ (50 mM), 4 μ L de dNTPs (1 mM), 1 μ L DMSO, 0,2 μ L de Taq polimerase (5 U), 3 μ L *primer* (2 μ M), 0,5 μ L de DNA (10 ng/ μ l) e água Milli-Q para completar o volume.

Tabela 1. Protocolos testados para extração de DNA total de *C. gladiatorium*, partindo do protocolo CTAB (Doyle e Doyle 1987), com alterações.

Protocolo	Tipo de trituração	CTAB	β -mercaptoetanol	Identificação das Amostras
1	Nitrogênio líquido	2%	0%	1 e 1'
2	Nitrogênio líquido	2%	2%	2 e 2'
3	Nitrogênio líquido	5%	0%	3 e 3'
4	Nitrogênio líquido	5%	2%	4 e 4'
5	STE	2%	0%	5 e 5'
6	STE	2%	2%	6 e 6'
7	STE	5%	0%	7 e 7'
8	STE	5%	2%	8 e 8'
				9 e 9'
				10 e 10'
				11 e 11'
				12 e 12'
				13 e 13'
				14 e 14'
				15 e 15'
				16 e 16'

O programa de amplificação seguiu as recomendações propostas por Rodrigues (2010), com modificações na extensão final e consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 90 segundos, 35 ciclos de 94 °C por 40 segundos, 48 °C por 45 segundos e 72 °C por 90 segundos e ciclo de extensão final de 72 °C por cinco minutos.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão de corrida TBE 1X (89,15 M de Tris HCl; 88,95 M de Ácido Bórico e 2,23 M de EDTA) com voltagem constante de 80 V por cerca de cinco horas, para verificação dos produtos amplificados. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador UVB LBT-20x20 STi Loccus Biotecnologia. As imagens do gel foram obtidas com fotodocumentador L-Pix STi Loccus Biotecnologia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos de trituração do material vegetal influenciaram na qualidade e quantidade de DNA extraído de *C. gladiatorium*. A trituração mecânica inicial do material vegetal tem função de facilitar a separação do material genético e seu isolamento devido à quebra das paredes e membranas celulares (Ferreira & Grattapaglia 1998, Kotchoni & Gachomo 2009), sendo, portanto, uma etapa decisiva no processo de extração de DNA.

A trituração com auxílio de nitrogênio líquido resultou em uma extração de DNA de boa qualidade e em maior quantidade. Em todos os protocolos testados com a trituração em nitrogênio líquido, obteve-se bandas de DNA definidas e ausência de arraste vertical no gel ou material retido no poço (Fig. 1). O congelamento do tecido vegetal em nitrogênio líquido e posterior trituração mecânica, com almofariz e pistilo, é comumente utilizado e permite a extração de DNA em larga escala (Romano & Brasileiro

1999). Danner *et al.* (2011), ao propor o protocolo de extração de DNA de jabuticabeira sugeriram a adição de nitrogênio líquido na maceração como necessária para otimizar a extração de DNA, assim como neste estudo.

O DNA extraído pela trituração das folhas com STE apresentou arrastes e ausência de bandas de DNA bem definidas no gel de agarose (Fig. 2), indicando que pouco DNA foi extraído e grande parte dele foi degradada durante o processo. Resultados semelhantes foram encontrados por Dalbosco *et al.* (2015) ao realizar a trituração das folhas diretamente no tampão de extração, para uma espécie da família Orchidaceae.

As duas concentrações de CTAB possibilitaram a extração de DNA de *C. gladiatorium*, sendo que, a concentração de 5% proporcionou melhores resultados. Maiores concentrações de CTAB também têm apresentado melhores resultados na extração de DNA de outras espécies (Schmitt *et al.* 2014, Silva *et al.* 2014, Zortéa *et al.* 2016, Rocha *et al.* 2017). Por ser um detergente, o CTAB tem a função de solubilizar as membranas e separar o DNA de polissacarídeos durante a extração, impedindo que as amostras fiquem excessivamente viscosas e retidas no poço do gel durante a eletroforese (Romano & Brasileiro 1999). Não se verificou retenção de DNA no poço em nenhuma das amostras extraídas, indicando, portanto, a ausência de contaminação por polissacarídeos.

Foi possível extrair DNA íntegro tanto na presença quanto na ausência de β -mercaptoetanol. Este reagente é

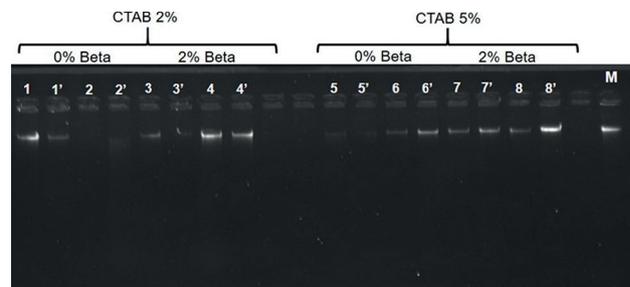


Figura 1. Gel de agarose à 1% demonstrando o padrão de extração de DNA de dois indivíduos de *C. gladiatorium* com os protocolos 1 a 4. Bandas definidas e ausência de arraste vertical. A identificação no gel está de acordo com a tabela 1. Abreviatura: M, marcador lambda 100 ng.

Tabela 2. Primers ISSR testados para amplificação do DNA de *C. gladiatorium*.

Primer	Sequência 5' - 3'	TA (°C)
UBC 807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	48
UBC 842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG*	48

*Y = C ou T. Abreviatura: TA, temperatura de anelamento.

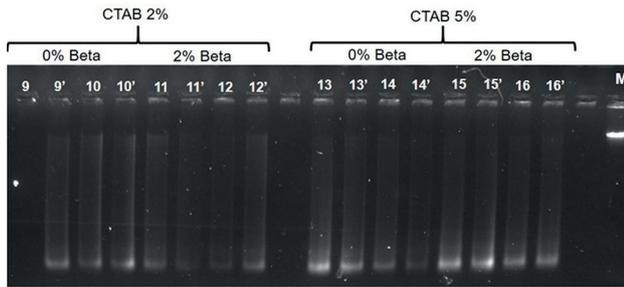


Figura 2. Gel de agarose à 1% demonstrando o padrão de extração de DNA de *C. gladiatorium* com os protocolos 5 a 8. Ausência de bandas definidas e presença de arraste vertical. A identificação no gel está de acordo com a tabela 1. Abreviatura: M, marcador lambda 100 ng.

utilizado no tampão de extração com função antioxidativa, assim como o polivinilpirolidona (PVP) (Romano & Brasileiro 1999). Em um teste de protocolo de extração de DNA de seis espécies de *Catasetum*, Rossi *et al.* (2014) conseguiram extrair DNA utilizando menor concentração de β -mercaptoetanol (0,25%). Assim, sugere-se que apenas o uso do PVP pode ser suficiente para evitar a oxidação do DNA durante o processo de extração. Desse modo, recomenda-se, sempre que possível, evitar o uso de β -mercaptoetanol na extração de DNA de *C. gladiatorium*, a fim de evitar possíveis contaminações dos usuários e diminuir os custos da extração, sem que haja prejuízo na qualidade do DNA extraído.

O resultado do teste de amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) mostrou que o DNA extraído com base nos oito protocolos foi passível de amplificação (Fig. 3). Verificou-se também que os dois marcadores ISSR foram eficazes, podendo ser utilizados em estudos de diversidade genética da espécie.

Embora o DNA extraído com tampão STE não tenha apresentado uma boa qualidade no gel de agarose, e baixa concentração, foi possível amplificá-lo utilizando os dois marcadores ISSR selecionados. As amostras de DNA com baixa concentração não inviabilizam a reprodutibilidade nas reações de PCR (Murray & Thompson 1980, Faleiro *et al.* 1996), contudo, nos casos em que se obtêm amostras com baixa concentração de DNA, recomenda-se nova tentativa de extração para melhor aproveitamento do tempo e diminuição de custos com futuras extrações e replicações por PCR (Silva *et al.* 2015). Sendo assim, a escolha do método de extração dependerá da disponibilidade de recursos e da estrutura dos laboratórios. Na ausência de nitrogênio líquido ou de β -mercaptoetanol, a extração de DNA de *C. gladiatorium* poderá ser realizada sem prejuízo das análises moleculares com PCR.

CONCLUSÃO

Todos os protocolos testados possibilitaram a extração de DNA de *C. gladiatorium* para uso em análises moleculares. A maceração do material vegetal de *C. gladiatorium* com STE não gerou DNA com bandas definidas e apresentou grande quantidade de arraste no gel de agarose. Porém, foi possível obter o DNA adequado para realizar

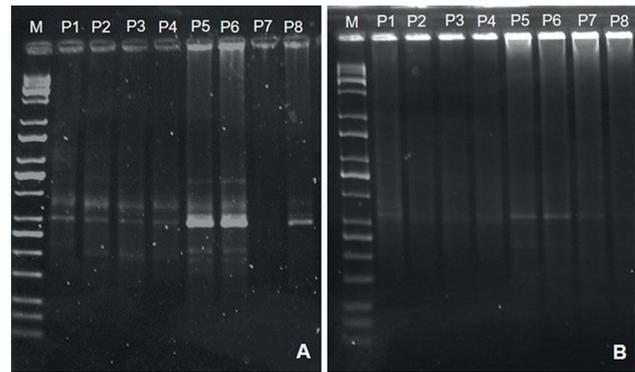


Figura 3. Padrão de amplificação de primers ISSR no DNA de *C. gladiatorium* extraído com diferentes protocolos. A. Padrão de amplificação do primer UBC 842. B. Padrão de amplificação do primer UBC 807. P1 a P8 indicam o protocolo pelo qual o DNA foi extraído. Abreviatura: M, marcador 100 pb DNA ladder.

as amplificações via PCR. O uso do tampão STE para trituração do material vegetal facilita e diminui os custos de extração, sendo uma boa alternativa para laboratórios que não dispõem de muitos recursos.

Os resultados deste estudo sugerem que os marcadores ISSR podem ser utilizados em futuros estudos de caracterização e análise de diversidade genética de *C. gladiatorium*.

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem à Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, B., DAILAMI, M. & LISTYORINI, F. H. 2017. Genetic Variations and Relationships of Papua's Endemic Orchids Based on RAPD Markers. *Natural Science*, 9(11): 377-385.
- BARROS, F., VINHOS, F., RODRIGUES, V. T., BARBERENA, F. F. V. A. & FRAGA, C. N. 2010. Orchidaceae. In: FORZZA, R. C., *et al.* (org.). Catálogo de plantas e Fungos do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. v.2, p. 1344-1426.
- BARROS, F., VINHOS, F., RODRIGUES, V. T., BABERENA, F. F. V. A., FRAGA, C. N., PESSOA, E. M., FOSTER, W., MENINI NETO, L., FURTADO, S. G., NARDY, C., AZEVEDO, C. O. & GUIMARÃES, L. R. S. 2015. Orchidaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179> >. Acesso em: 06 abr. 2018.
- BHATTACHARJEE, A., MAJUMDAR, U., MAITY, D., SARKAR, T. S., GOSWAMI, A. M., SAHOO, R. & GHOSH, S. 2009. *In vivo* protein tyrosine nitration in *S. cerevisiae*: Identification of tyrosine-nitrated proteins in mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388(3): 612-617.
- DALBOSCO, E. Z., SILVA, C. G., MELHORANÇA, E. A. L., MIRANDA, A. F. & SILVA, C. A. 2015. Otimização do protocolo para extração de DNA genômico de *Epidendrum viviparum* Lindl. (Orchidaceae). *Enciclopédia Biosfera*, 11(21): 3236-3243.
- DANNER, M. A., ZOLET SASSO S. A. Z., BITTENCOURT, J. V. M., CITADIN, I. & SACHET, M. R. 2011. Proposta de protocolo para extração de DNA de jabuticabeira. *Ciência Florestal*, 21(2): 363-367.

- DEVI, K. D., PUNYARANI, K., SINGH, N. S. & DEVI, H. S. 2013. An efficient protocol for total DNA extraction from the members of order Zingiberales- suitable for diverse PCR based downstream applications. *SpringerPlus*, 2:669.
- DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1): 11-15.
- ENGELS, M. E., FRENEDA-ROCHA, L. C. & PETINI-BENELLI, A. 2016. A new species of *Catasetum* (Orchidaceae, Epidendroideae, Cymbidieae) from the southern Brazilian Amazon. *Lankesteriana*, 16(3): 329-333.
- FALEIRO, F. G., BARROS, E. G., VILARINHOS, A. D., CORRÊA, R. X., PAULA JÚNIOR, T. J. & MOREIRA, M. A. 1996. Otimização da extração de DNA de esporos de *Uromyces appendiculatus*. *Fitopatologia Brasileira*, 21(2): 304-307.
- FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares*. 3 ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN. 220 p.
- FLORA DO BRASIL. 2018. *Catasetum*. In: Flora do Brasil 2020 em construção. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB11312>>. Acesso em: 25 jul. 2018.
- FU, Z. Y., SONG J. & JAMESON, P. 2017. A rapid and cost effective protocol for plant genomic DNA isolation using regenerated silica columns in combination with CTAB extraction. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(8): 1682-1688.
- HARTATI, S. 2017. Study of diversity genetic on six species of Indonesian *Coelogyne* spp. based on ISSR markers. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 20(11): 577-583.
- KOTCHONI, S. O. & GACHOMO, E. W. 2009. A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plants. *Molecular Biology Reports*, 36(6): 1633-1636.
- MURRAY, M. G. & THOMPSON, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19): 4321-4325.
- MACHADO NETO, N. B. & VIEIRA, G. E. 2011. Assessment of genetic diversity in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae). *Brazilian Archives Biology Technology*, 54(5): 939-946.
- OLIVEIRA, L. DO V. R., FÁRIA, R. T., RUAS, C. F., RUAS, P. M., SANTOS, M. O. & CARVALHO, V. P. 2010. Genetic analysis of species in the genus *Catasetum* (Orchidaceae) using RAPD markers. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(2): 375-387.
- PETINI-BENELLI, A. 2012. *Orquídeas de Mato Grosso: Gênero Catasetum L. C. Rich ex Kunth*. Rio de Janeiro: PoD. 130 p.
- PETINI-BENELLI, A., FERNANDES, E. R. & MACEDO, M. 2007. O gênero *Catasetum* em Mato Grosso, Brasil. *Orchidstudium - International Journal of Orchid Study*, 2(1): 23-36.
- PETINI-BENELLI, A. & SMIDT, E. C. 2017. New distribution records of *Catasetum confusum* G. A. Romero-González (Cymbidieae, Epidendroideae, Orchidaceae) from Brazil. *Check List*, 13(3): 2148.
- PETINI-BENELLI, A. & SOARES-LOPES, C. R. A. 2015. A new species of *Catasetum* (Cymbidieae, Epidendroideae, Orchidaceae) from the Southern region of the Brazilian Amazon. *Phytotaxa*, 204(1): 75-79.
- ROCHA, V. D., ZORTÉA, K. E. M., CARDOSO, E. S., BISPO, R. B., TIAGO, A. V. E ROSSI, A. A. B. 2017. Efeito da idade da folha na qualidade do DNA extraído de *Piper aduncum* L. *Revista de Ciências Agroambientais*, 15(2): 218-222.
- RODRIGUES, J. F. 2010. Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. C. mantiqueirae (Fowlie) Van Den Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR. 81f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2010.
- ROMANO, E. & BRASILEIRO, A. C. M. 1999. Extração de DNA de plantas. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 9: 40-43.
- ROSSI, A. P. B., DA SILVA, I. V., LAVEZO, A., DARDENGO, J. F. E., EBURNEO, L. & BONFANTE, L. V. 2014. Extração e amplificação de DNA de seis espécies de *Catasetum* nativas da Amazônia Meridional. *Revista de Ciências Agroambientais*, 12(2): 133-137.
- SCHIMITT, K. F. M., SILVA, B. M., ROSSI, A. A. B., SANDER, N. & SILVA, C. J. 2014. Estabelecimento e otimização de protocolo para extração e amplificação de DNA em tecido foliar de *Curcuma longa* (L.). *Enciclopédia Biosfera*, 10(19): 1560-1568.
- SILVA, B. M., DALBOSCO, E. Z., BOTINI, N., FÁRIA, R. B. & ROSSI, A. A. B. 2014. Protocolo para extração de DNA genômico de *Anacardium giganteum* W. Hancock ex Engl. (Anacardiaceae). *Enciclopédia Biosfera*, 10(19): 2401-2407.
- SILVA, A. Z. C., BRITO, R. B. & CAMPOS, D. T. S. 2015. Comparação de três tampões para extração de DNA genômico de tecidos foliares de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. *Multitemas*, 48: 179-193.
- ZORTÉA, K. É. M., MIKOVISKI, A. I., CASTRILLON, R. G., RUZZA, D. A. C. & ROSSI, A. A. B. 2016. Estabelecimento de protocolo de extração de DNA para *Eugenia stipitata* Mc. Vaung., visando estudos moleculares. *Enciclopédia Biosfera*, 13(24): 495-502.