

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MARÍLIA DE LIMA GOMES

EXTRAÇÃO DE DNA DE *Coffea arabica* L.

PATOS DE MINAS - MG
DEZEMBRO DE 2019

MARÍLIA DE LIMA GOMES

EXTRAÇÃO DE DNA DE *Coffea arabica* L.

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

**Prof(a). Dr(a). Terezinha Aparecida
Teixeira**

PATOS DE MINAS - MG

DEZEMBRO DE 2019

MARÍLIA DE LIMA GOMES

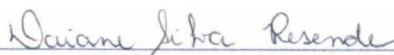
Extração de DNA de *Coffea arabica* L.

“Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia”

Banca examinadora:



Prof. Dra. Terezinha Aparecida Teixeira- IBTEC/UFU
Presidente



Prof. Dra. Daiane Silva Resende

Membro



Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas-IBTEC/UFU

Membro

Patos de Minas-MG, 09 de Dezembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Nossa Senhora por ter me concebido tantas coisas maravilhosas na vida, por ter me dado fé em minha capacidade, por ter me dado força para nunca desistir de meus sonhos, por ter me ouvido quando te pedia algo.

Agradeço aos meus pais Doralice Luiza de Lima Gomes e Carlos Cesar Gomes, pelo amor eterno, pela educação, por acreditarem no meu potencial, pelo suporte e por todos os momentos vividos até aqui. Ao meu irmão Rafael de Lima Gomes pelo companheirismo e por me amar e aguentar meus aborrecimentos. E toda a minha família e amigos que de alguma forma me apoiou nestes anos de faculdade.

Agradeço ao Guilherme Andrade que não foi só um grande amigo neste período de faculdade foi um anjo na minha vida, mesmo de longe sempre me apoiando, preocupado comigo, sempre em oração para que tudo desse certo.

Agradeço a minha amiga Camila que há vários anos está presente na minha vida escolar, sei que já brigamos muito, mas foi pra o crescimento de nós duas, sabia que foi Deus que enviou você para sempre caminhar comigo na vida escolar.

Agradeço a família EJC e o grupo de Jovens Mensageiros da Paz que eram os locais em que eu ia para esquecer um pouco dos meus problemas de faculdade.

Agradeço a todos os amigos que eu fiz nestes anos na UFU, especialmente o Marcelo que mesmo não sendo do curso, na minha volta no curso sempre estudavam junto comigo e me dava carona, o Gustavo e a Michele que sempre estavam juntos comigo nas horas de trabalhos em equipe. A Thaís, Carol e a Flávia que além de amigas fomos colegas de LAGEM. A Vanessa e a Larissa que sempre estavam no LAGEM me ajudando.

Agradeço minha orientadora e professora Dr(a). Terezinha Aparecida Teixeira, que pra mim não foi só uma orientadora foi uma segunda mãe, por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse trabalho e confiar na minha capacidade, por sempre está me apoiando no laboratório, disponibilizando seu tempo para me ajudar.

Agradeço toda a Universidade federal de Uberlândia por de alguma forma me ajudar na minha formação.

RESUMO

O cafeeiro é uma espécie conhecida no mundo todo, e o Brasil é o maior produtor de café, especialmente *Coffea arabica* L. Uma das etapas mais importantes para a realização de análises genéticas, dentro de programas melhoramento genético, é a extração de DNA. Os principais métodos para a extração de DNA de plantas têm como base o CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), entretanto, esses métodos possuem várias etapas e o custo com reagentes é alto. Este trabalho teve como objetivo avaliar um método de extração de DNA de *C. arabica*, que seja rápido, eficiente e simples. O protocolo utilizado neste trabalho tem como base SDS (dodecil sulfato de sódio) e Triton X-100. Após a extração os DNAs foram quantificados, qualificados e utilizados para corte com enzima EcoRI e amplificação da região ribossômica ITS1/ITS4. O protocolo foi eficiente para extrair grande quantidade de DNA, porém, a pureza e a qualidade não foram ideais. Nenhuma amostra teve o padrão desejado para as relações A260/280 nm e A260/230 nm, 80 % das amostras apresentaram DNA íntegro, 75 % tiveram o DNA digerido pela EcoRI e 60 % amplificaram a região ribossômica. Isto faz com que novos ajustes devam ser feitos neste protocolo para a obtenção de DNA de qualidade e pureza para ser utilizado em estudos moleculares de *C. arábica*. Conclui-se que o protocolo aqui apresentado é promissor para a extração de DNA de café, pois, os protocolos atualmente utilizados consomem muito tempo e reagentes, e alguns dos reagentes são tóxicos, tornando esses protocolos insustentáveis para análises moleculares.

Palavras-chaves: Café. SDS. Triton X-100.

ABSTRACT

Coffee is a known species worldwide, and Brazil is the largest coffee producer, especially Coffea arabica L. One of the most important steps for performing genetic analysis, within genetic improvement programs, is DNA extraction. The main methods for extracting plant DNA are based on CTAB (cetyltrimethylammoniumbromide), however, these methods are multi-step and the cost of reagents is high. The aim of this work was to evaluate a fast, efficient and simple method of DNA extraction from C. arabica. The protocol used in this work is based on SDS (sodium dodecyl sulfate) and Triton X-100. After extraction the DNAs were quantified, qualified and used for cutting with EcoRI enzyme and amplification of ribosomal region ITS1 / ITS4. The protocol was efficient for extracting large amounts of DNA, but the purity and quality were not ideal. No sample had the desired standard for the A260 / 280 nm and A260 / 230 nm ratios, 80% of the samples had intact DNA, 75% had EcoRI digested DNA and 60% amplified the ribosomal region. This means that new adjustments must be made in this protocol to obtain DNA of quality and purity to be used in molecular studies of C. arabica. It is concluded that the protocol presented here is promising for coffee DNA extraction, because the protocols currently used are very time consuming and reagents, and some of the reagents are toxic, making these protocols unsustainable for molecular analysis.

Keywords: Coffee. SDS. Triton X-100.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: Graus célsius

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTps: Dexirribonucleotidio

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

HCl: Ácido clorídrico

g: Grama

Kg: Quilograma

M: Molar

mg: Miligrama

MgCl₂: Cloreto de magnésio

mL: Mililitro

mM: Milimolar

NaCl: Cloreto de sódio

ng: Nanograma

nm: Nanômetro

PCR: Reação da cadeia da polimerase

pH: Potencial hidrogeniônico

rpm: Rotações por minuto

SDS: Solução de dodecilsulfato de sódio

U: Unidade

μL: Microlitro

μg: Micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REFERENCIAL TEORICO.....	8
2.1 Características gerais do café	8
2. 2 Extração de DNA.....	9
3 OBJETIVO	11
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1 Preparação do material biológico e extração do DNA	11
4.2 Quantificação e qualificação do DNA.....	12
4.3 Restrição do DNA de café com EcoRI.....	12
4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) da região ribossômica.....	13
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5.1 Resultados da quantificação e da qualificação do DNA extraído	13
5.2 Resultado da restrição com EcoRI	17
5.3 Resultado da PCR região ribossômica.....	17
6 CONCLUSÃO.....	19
REFÊRENCIAS	20

1 INTRODUÇÃO

A agricultura no Brasil é uma das principais bases da economia no país, especialmente do café, que é um produto que se destaca, estando sempre entre os dez principais produtos de exportação. Isto faz com que o país seja referência mundial, produzindo neste ano de 2019 aproximadamente 48,99 milhões de sacas de 60 kg (EMBRAPA, 2019). A espécie mais importante do gênero *Coffea* é *C. arabica* L., sendo responsável por 70,0 % da produção mundial. Mas esta produção é influenciada por estresses bióticos e abióticos, sendo necessário o melhoramento genético para obter genótipos superiores.

A utilização da análise molecular para o melhoramento genético é de grande importância, pois, a partir da sua introdução foi possível fazer estudo de identificação, caracterização e mapeamento genético, de forma mais rápida, com eficiência e segurança. Para o sucesso dessas análises moleculares é preciso ter DNA de qualidade e em quantidade suficiente, uma vez que a partir dele que é possível utilizar marcadores moleculares dentro das etapas dos programas de melhoramento (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os principais métodos utilizados para a extração de DNA de plantas são os métodos derivados do protocolo de Doyle e Doyle (1987), entretanto, este método é muito demorado, porque consiste de várias etapas e o custo com reagentes é alto (TAMARI et al., 2013). Como o cafeeiro é uma espécie de grande interesse econômico e o uso de análises moleculares de um grande número de genótipos é essencial para os programas de melhoramento genético, torna-se necessário ter um método de extração de DNA que apresente resultados rápidos e mais baratos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar um método de extração de DNA de *C. arabica*, rápido, eficiente e com reagentes menos tóxicos, podendo ser utilizado para análises moleculares.

2 REFENCIAL TEORICO

2.1 Características gerais do café

O Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo e o segundo maior consumidor. O grão de café está entre os principais produtos agrícolas do mercado, ocupando posição de destaque nas exportações brasileiras, onde oscila entre os dez principais produtos. No

ano de 2017 o país arrecadou 5,2 bilhões de dólares provenientes da produção em aproximadamente 1.900 municípios, distribuídos em diversos estados do país (MAPA, 2018).

O cafeeiro é uma planta pertencente à família Rubiaceae, com mais de seis mil espécies, e gênero *Coffea*, com mais de 100 espécies, sendo 25 as mais importantes, e todas elas originárias da África e de algumas ilhas do Oceano Índico. Destas espécies, duas se destacam no mundo todo, tanto no quesito produção quanto no quesito consumo, *C. arabica* e *C. canephora* (ORMOND; PAULA; FAVERET FILHO, 1999).

O café é considerado uma bebida universal. Pode ser utilizado de várias formas, mas, a mais comum é na produção de bebidas (POOLE et al., 2017). Para se ter um café de qualidade e aceitação no mundo todo deve-se levar em conta alguns fatores, como o clima, o manejo da lavoura, a forma de preparo, a forma de colheita dos grãos (MESQUITA et al, 2016). O cafeeiro é considerado uma planta complexa, devido aos seus grãos ter vários constituintes, entre eles os lipídeos, proteínas e cafeína (CAFEICULTURA, 2015).

C. arabica é a única espécie alotetraplóide ($2n = 4x = 44$ cromossomos), sendo responsável por 70 % da produção mundial. A espécie produz cafés mais finos, de qualidade superior e com maior aceitação, entretanto, sua produção é afetada por pragas e doenças (LASHERMES et al., 2000).

Existem várias cultivares de *C. arabica* no Brasil e as que possuem maior destaque são as dos grupos Catuaí e Mundo Novo. As cultivares do grupo Catuaí são plantas que possuem porte baixo e grande adaptabilidade ao ambiente. As cultivares do grupo Mundo Novo são plantas com porte mais robusto, possuem boa adaptabilidade para regiões altas, são bastante rústicas, vigorosas e produtivas, com maturação precoce e uniforme (SOUZA et al., 2004).

As principais melhorias feitas no café arábica são resistência a doenças, adaptabilidade ao ambiente, e maior produtividade. Estas melhorias são feitas utilizando marcadores moleculares entre eles microssatélites, RFLP, RAPD, ISSR, SSR e AFLP. Para o sucesso da melhoria com esses marcadores deve-se fazer primeiro a extração do DNA da planta (CAIXETA et al., 2015).

2. 2 Extração de DNA

Nos últimos anos estão sendo muito utilizados os marcadores moleculares para análises genéticas de vegetais. Para o sucesso destes marcadores moleculares é preciso fazer a extração de DNA, que precisa estar em quantidade e qualidade suficientes para garantir resultados confiáveis. Além da qualidade e quantidade de DNA, o tempo e o custo também

são importantes na escolha do protocolo de extração. Os protocolos mais utilizados para a extração de DNA de plantas têm como base o detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). Esse detergente tem como objetivo romper a membrana celular facilitando a liberação do DNA (MOLINARI; CROCHEMORE, 2001). Esses métodos de extração são muito demorados, pois, envolvem várias etapas, entre elas estão as etapas de purificação e de precipitação do DNA, além de utilizarem reagentes tóxicos como clorofórmio e β -mercaptoetanol. Uma alternativa para substituir esses métodos é a utilização de kits comerciais para a extração, mas, esses kits são muito caros. Como muitos laboratórios de pesquisa possuem poucos recursos financeiros e as análises moleculares em programas de melhoramento são realizadas utilizando muitas amostras, os kits comerciais tornam-se inviáveis (AHMADI et al., 2018).

A extração de DNA vegetal é uma importante etapa para a análise da estrutura e organização do material genético, e independentemente do método escolhido deve-se seguir dois passos para obter DNA de qualidade. Primeiro, as paredes celulares devem ser rompidas, com o objetivo de liberar os constituintes celulares, e segundo, as membranas celulares devem ser rompidas, para a liberação do DNA (BRASILEIRO; ROMANO, 1999).

A extração de DNA do cafeeiro é considerada difícil e complexa, pois, a espécie está sujeita a muita oxidação, especialmente em suas folhas e frutos. O composto fenólico ácido 5-cafeoilquínico, também conhecido como ácido clorogênico (CGA), principal substrato da polifenoloxidase (PFO) está presente em quantidades expressivas nesses tecidos. Este composto, no organismo da planta, tem função de defesa contra predadores, mas a oxidação deste composto é um grande problema para de extração de DNA (PEREIRA et al., 2009).

Os principais problemas enfrentados para a extração de DNA que são utilizados é conseguir obter um DNA em grande quantidade e qualidade é devido sua folha possui grande quantidade de fenóis fazendo assim esses métodos utilizados não sejam falhados para fazer a extração. Pois estes compostos faz a amostra ficar escura e com um aspecto viscoso, e fazendo a amostra tem uma vida útil muito pequena, e não conseguindo fazer as próximas etapas de análises moleculares. Mas se propormos um novo método mesmo a amostra as vezes oxida, mas como a extração será rápida e não utilizará reagentes tóxicos, eu vou conseguir proceder as próximas etapas (TIBBITS et al., 2006).

3 OBJETIVO

Avaliar um método de extração de DNA de *C. arabica*, rápido, eficiente e com reagentes menos tóxicos, podendo ser utilizado para análises moleculares.

4 MATERIAL E METÓDOS

4.1 Preparação do material biológico e extração do DNA

Foram coletadas folhas jovens de cinco plantas das cultivares Acauã Novo, Bourbon J10, Catuaí IAC 99 e Topázio, sendo todas da espécie *C. arabica* L. As amostras de folhas coletadas foram levadas para o Laboratório de Genética Molecular (LAGEM), da Universidade Federal de Uberlândia, campus Patos de Minas, onde foram armazenadas durante 24 horas em ultrafreezer (CL520-86v, Cold Lab) a -80 °C e posteriormente liofilizadas (Liofilizador L101, Liotop) por 48 horas.

As amostras de folhas liofilizadas foram trituradas em almofariz e o pó armazenado em temperatura ambiente para extração de DNA. A extração do DNA seguiu o protocolo descrito por Souza e Teixeira (2019), com modificação do volume de solução de extração e quantidade de amostra. A extração foi feita em duplicata, em que 0,05 g de cada amostra foi colocada em microtubo de 2 mL, devidamente identificado. Em seguida acrescentou-se 1,8 mL de solução de extração [1,4 M NaCl (Dinamica), 100 mM Tris-HCl (Vetec) pH 8, 5 % EDTA (Dinamica), 5 % Triton X 100 (Dinamica), 5 % SDS (Nech). Os tubos foram agitados no vórtex (AP59, Phoenix Luferco, Brasil)] por 30 segundos e colocados em banho-maria (SL 154/22, Solab) a 65 °C por 15 minutos.

Após 15 minutos, os tubos foram passados rapidamente no vórtex e deixados descansar por cinco minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para outros microtubos e em seguida foram centrifugados (NI1801, Nova instrumente) a 13.000 rpm durante 7 minutos. Posteriormente os sobrenadantes foram coletados, transferidos para outros microtubos de 2 mL e acrescentado igual volume de isopropanol (Proquímicos) gelado. A solução foi misturada por inversão, até acabar com as bolhas, e os tubos foram imediatamente colocados novamente na centrifuga por 7 minutos a 13.000 rpm. O líquido foi descartado, as bocas dos

microtubos foram secadas com papel toalha e o pellet formado foi diluído em 100 μ L de água ultrapura.

De posse do DNA extraído, em uma amostra de cada duplicada, adicionou-se 400 μ L de Tris HCl 10 mM e 500 μ L de acetato de amônio (Vetec) 7,5 M. Em seguida, após a homogeneização, as amostras foram colocadas no gelo por 15 minutos.

Em seguida foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 30 minutos e os sobrenadantes transferidos para outros microtubos de 2 mL. Aos sobrenadantes foram adicionados iguais volumes de isopropanol gelado. Deixou-se o material no freezer durante 3 horas, após foram submetidos a outra centrifugação a 12.000 rpm durante 15 minutos, descartou o sobrenadante, lavou os pellets com 500 μ L de álcool 70 % e o pellet foi ressuspensionado em 100 μ L de água ultrapura. As amostras foram estocadas no freezer a -20 °C.

4.2 Quantificação e qualificação do DNA

O DNA extraído, com e sem limpeza, foi quantificado em espectrofotômetro de microvolume (L-Quant®, Loccus Biotecnologia), nas faixas de 230, 260 e 280 nm. Para a qualificação 4 μ L de cada amostra de DNA foi preparada com a adição de 2 μ L de azul de bromofenol e 2 μ L do corante GelRed (Uniscience do Brasil Ltda). As amostras de DNA preparadas e o marcador de peso molecular de 1 Kb foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8 % e corrida a 80 volts por uma hora. Os resultados foram visualizados em luz ultravioleta e documentados em fotodocumentador (L.PIX, Loccus Biotecnologia).

4.3 Restrição do DNA de café com EcoRI

Diluiu-se o DNA para 50 ng/ μ L e após a diluição foram transferidos 5 μ L, totalizando 250 ng, do DNA de cada amostra para microtubos. Em seguida foi preparado um mix contendo 1X o tampão da enzima, 1,5 U da enzima EcoRI, e o volume completado para 12,5 μ L com água ultrapura.

Os microtubos foram levados ao banho-maria, aquecido a 37 °C, por seis horas e a cada uma hora passados no vórtex. Em seguida foram colocados em outro banho-maria a 70 °C, por 15 minutos, para inativar a enzima. Retirados do banho-maria foram rapidamente colocados em gelo, obtendo o material genético devidamente digerido.

Para conferir a digestão 4 µL de cada amostra de DNA foi preparada com a adição de 2 µL de azul de bromofenol e 2 µL do corante GelRed. As amostras de DNA preparadas e o marcador de peso molecular de 1 Kb foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8 % e corrida a 80 volts por três horas. Os resultados foram visualizados em luz ultravioleta e documentados em fotodocumentador.

4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) da região ribossômica

Para avaliar a qualidade do DNA foi realizada PCR utilizando primers específicos para o espaçador interno transcrito (ITS) do DNA ribossômico 18S-25S (ITS1-18S: 5'-CGT AAC AAG GTT TCC GTA GG-3'; ITS4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (WHITE et al, 1990). Foi preparado um mix contendo 0,2 µM de primer, 1X tampão da enzima, 1,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de dNTPs, 1 U de taq DNA polimerase e o volume foi completado para 18 µL com água ultrapura. O mix foi distribuído nos tubos para PCR contendo 2 µL do DNA na concentração de 12,5 ng/µL. Portanto, cada tubo de PCR continha 2 µL de DNA e 18 µL de mix, totalizando 20 µL.

Os tubos foram colocados no termociclador (TX96, Amplitherm) e submetidos a PCR primeiramente a 94 °C por 3 minutos (desnaturação do DNA) e depois 35 ciclos de: 94 °C por 30 segundos (desnaturação do DNA), 58 °C por 1 minuto (anelamento do primer) e 72 °C por 1 minuto (extensão do DNA). Terminando com 72 °C por 7 minutos (extensão do DNA).

Os produtos da amplificação (4 µL) foram preparados com a adição de 2 µL de azul de bromofenol e 2 µL do corante GelRed. As amostras de DNA preparadas e o marcador de peso molecular de 100 pb foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5 % e corrida a 100 volts por uma hora. Os resultados foram visualizados em luz ultravioleta e documentados em fotodocumentador.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados da quantificação e da qualificação do DNA extraído

Os ácidos nucleicos possuem absorvência máxima no comprimento de onda de 260 nm, portanto, a concentração de DNA é diretamente proporcional a absorvência nesse comprimento de onda e os resultados médios de duplicatas de cinco plantas de cada cultivar obtidos da quantificação em espectrofotômetro são apresentados na Tabela 1. A concentração de DNA variou de 738,93 ng/ μ L (14,78 μ g/g de tecido seco) (Bourbon) a 1300,74 ng/ μ L (26,01 μ g/g de tecido seco) (Topázio), com média geral de 1044,51 ng/ μ L (20,89 μ g/g de tecido seco), desvio padrão geral de 504,73 ng/ μ L (10,09 μ g/g de tecido seco) e coeficiente de variação de 48,3 %. Isso mostra que, a variação na quantidade de DNA extraído foi alta, mas, em todas as amostras a quantidade foi suficiente para análises moleculares. Considerando a concentração de DNA por tecido seco verifica-se que a quantidade de DNA obtida foi alta quando comparada com a quantidade obtida por Souza e Teixeira (2019), utilizando o mesmo protocolo, porém em volume de tampão de extração de 5 mL e 0,1 g de tecido seco, por amostra. Os autores obtiveram concentrações entre 1,56 e 11,66 μ g/g de tecido seco.

As proteínas possuem absorvência em 280 nm, e carboidratos, EDTA e fenóis absorvem no comprimento de 230 nm. Sendo assim, as razões A260/280 nm (DNA / proteínas) e A260/230 nm (DNA / metabolitos secundários e componentes do tampão) podem ser utilizadas para determinar a pureza do DNA. As relações A260/280 nm, obtidas para o DNA no presente trabalho, ficaram entre 1,086 (Acauã) e 1,218 (Catuaí), com média 1,169, desvio padrão 0,14 e coeficiente de variação de 12,0 % (Tabela 1). Para as razões A260/230 nm os resultados variaram entre 1,057 (Acauã) e 1,251 (Catuaí), com média 1,167, desvio padrão 0,14 e coeficiente de variação de 12,0 % (Tabela 1).

O padrão desejado para a relação A260/280 nm está entre 1,8 e 2,2 (BROWN, 2003) e para a relação A260/230 nm o desejado está entre 2,0 e 2,2 (FANG et al., 1992). Entretanto, Martínez-González e colaboradores (2017) afirmam que dependendo da composição de bases do DNA, a leitura da razão A260/280 nm entre 1,6 e 1,9 é indicativa de DNA de alta pureza. Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989) sugeriram que as taxas de absorvências ideais para A260/A280 devem estar entre 1,6 e 1,9 e para A260/A230 entre 2,0 e 2,2. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho, quanto a pureza do DNA, mostram que há contaminação por proteínas, polissacarídeos, compostos fenólicos e/ou componentes do tampão.

O protocolo utilizado foi eficiente para extrair DNA, pois, a concentração foi alta, entretanto, a pureza não foi adequada. Uma possível causa pode ser a quantidade insuficiente de tampão de extração para a quantidade de tecido seco. No trabalho de Souza e Teixeira (2019), os autores utilizaram 100 mg de tecido seco e 5 mL de tampão de extração. No

presente trabalho foram utilizados 1,8 mL de tampão de extração e 50 mg de tecido seco, sendo que, com essa quantidade de tampão deveriam ser utilizados no máximo 36 mg de tecido seco. Sendo assim, a solução ficou muito concentrada e não foi possível fazer a separação adequada do DNA dos outros constituintes celulares.

Tabela 1 - Resultado da quantificação de DNA em espectrofotômetro, média de duplicata de cinco plantas de quatro cultivares de *Coffea arabica*, apresentando as razões 260/280 nm e 260/230 nm e concentrações de DNA, em ng/ μ L e μ g/g de tecido seco, das amostras antes do processo de limpeza.

Amostras	Razão 260/280 nm ^a	Razão 260/230 nm ^a	Concentração ^a	
			ng. μ L ⁻¹	μ g. g ⁻¹ tecido seco
Acauã	1,086 $\pm$ 0,11	1,057 $\pm$ 0,18	853,40 $\pm$ 556,11	17,07 $\pm$ 11,12
Bourbon	1,164 $\pm$ 0,14	1,181 $\pm$ 0,11	738,93 $\pm$ 491,28	14,78 $\pm$ 9,83
Catuaí	1,218 $\pm$ 0,19	1,251 $\pm$ 0,08	1284,95 $\pm$ 269,16	25,7 $\pm$ 5,38
Topázio	1,209 $\pm$ 0,10	1,178 $\pm$ 0,09	1300,74 $\pm$ 446,46	26,01 $\pm$ 8,93
Geral	1,169 $\pm$ 0,14	1,167 $\pm$ 0,14	1044,51 $\pm$ 504,73	20,89 $\pm$ 10,09

^aMédia $\pm$ desvio padrão

As folhas do cafeeiro são ricas em polissacarídeos e compostos fenólicos, tornando o processo de extração de DNA mais laborioso. Os polissacarídeos, devido às suas propriedades químicas, co-precipitam com o DNA, dando viscosidade às soluções e aparência de cola. Os compostos fenólicos, como terpenóides e taninos, sofrem rápida oxidação após a liberação do tecido da folha e se ligam irreversivelmente ao esqueleto fosfato do DNA, caracterizando pelo escurecimento da solução durante o processo de extração. Ambos os contaminantes podem impedir o uso de DNA para fins de análises moleculares, inibindo a ação da polimerase ou endonucleases (HEALEY et al., 2014).

Comparando as cultivares, quanto a concentração e pureza do DNA, as cultivares Acauã e Bourbon apresentaram menores valores de concentração e pureza, quando comparadas com Catuaí e Topázio. Geneticamente Catuaí e Topázio são mais próximas, pois, Topázio é resultado do cruzamento de Catuaí com Mundo Novo e Catuaí é oriunda do cruzamento de Caturra com Mundo Novo. A cultivar Acauã também é resultado do cruzamento com Mundo Novo, porém, com a cultivar Sarchimor, que é descendente do Híbrido de Timor, portanto, mais distante de Catuaí e Topázio e, provavelmente, possui constituintes celulares diferentes. A cultivar Bourbon é uma cultivar muito antiga e foi introduzida no Brasil em 1859, sendo bem distante geneticamente das outras cultivares (CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ, 2011). Durante o processo de extração as amostras de Acauã e Bourbon ficaram mais escuras, o que demonstra que houve oxidação, devido a

presença de compostos fenólicos. Portanto, embora as diferenças não sejam muito grandes, o protocolo foi mais eficiente para extrair DNA das cultivares Catuaí e Topázio.

Como a concentração de DNA foi alta, mas, o DNA possuía contaminações, procedeu-se a limpeza do DNA com acetato de amônio. Na Tabela 2 são apresentados os resultados médios de cinco plantas de cada cultivar da quantificação do DNA após a etapa de limpeza. Comparando as concentrações de DNA antes e depois da limpeza verifica-se que houve uma grande diminuição após a limpeza. Comparando as razões A260/A280 e A260/A230 antes e depois da limpeza verifica-se que houve pouca melhora na pureza, pois, as razões depois da limpeza ficaram entre 1,469 (Acauã) e 1,700 (Bourbon) e entre 1,230 (Acauã) e 1,513 (Bourbon), respectivamente. Porém, a média geral melhorou, atingindo 1,608 para A260/A280 e 1,358 para A260/A230, mas, houve aumento do desvio padrão e do coeficiente de variação, demonstrando que os resultados não foram homogêneos.

Tabela 2 - Resultado da quantificação de DNA em espectrofotômetro, média de cinco plantas de quatro cultivares de *C. arabica*, apresentando as razões 260/280 nm e 260/230 nm e concentração do DNA, em ng/ μ L e μ g/g de tecido seco, após o processo de limpeza.

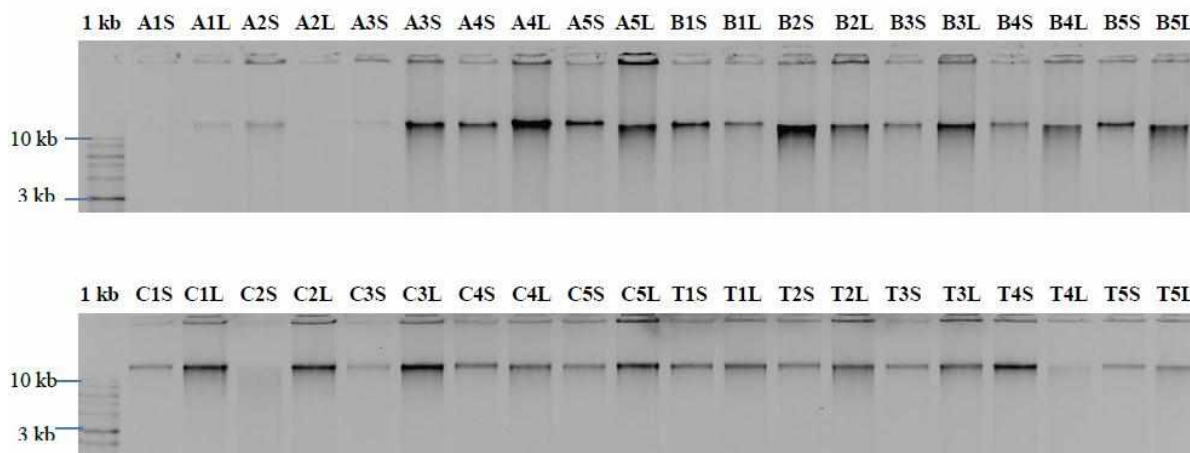
Amostras	Razão 260/280 nm ^a	Razão 260/230 nm ^a	Concentração ^a	
			ng. μ L ⁻¹	μ g. g ⁻¹ tecido seco
Acauã	1,469 $\pm$ 0,38	1,230 $\pm$ 0,17	113,65 $\pm$ 91,58	2,27 $\pm$ 1,83
Bourbon	1,700 $\pm$ 0,46	1,513 $\pm$ 0,10	221,10 $\pm$ 79,45	4,42 $\pm$ 1,59
Catuaí	1,650 $\pm$ 0,11	1,367 $\pm$ 0,11	262,91 $\pm$ 135,68	5,26 $\pm$ 2,71
Topázio	1,611 $\pm$ 0,28	1,323 $\pm$ 0,33	224,21 $\pm$ 119,97	4,48 $\pm$ 2,40
Geral	1,608 $\pm$ 0,32	1,358 $\pm$ 0,21	205,47 $\pm$ 115,08	4,11 $\pm$ 2,30

^aMédia $\pm$ desvio padrão

A qualidade do DNA pode ser visualizada na Figura 1, em que, 50 ng de DNA de cada amostra foram resolvidos em gel de agarose 0,8 %. Das 40 amostras 32 (80 %) apresentaram DNA íntegro, ou seja, DNA com peso molecular maior do que 10000 pb (comparando com o marcador de peso molecular) e sem arraste. Essa característica é importante, pois, é ela que dará reprodutibilidade e intensidade em amplificações de PCR (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Na Figura 1, além da integridade do DNA, é possível verificar também a pureza do DNA. A presença de polissacarídeos pode ser visualizada quando há retenção de DNA no poço e na imagem várias amostras (como é o caso da amostra A5L) apresentam essa característica, demonstrando assim, que essas amostras estão contaminadas com polissacarídeos.

Figura 1 – Medida da qualidade do DNA resolvido em gel de agarose 0.8 %. 1 Kb: marcador de peso molecular; A: cultivar Acauã; B: cultivar Bourbon; C: cultivar Catuaí; T: cultivar Topázio; S: sem a etapa de limpeza; L: com a etapa de limpeza.



5.2 Resultado da restrição com EcoRI

A digestão com a enzima EcoRI foi verificada com a eletroforese em gel de agarose 0.8 % (Figura 2) e a análise do gel mostrou que 75,0 % (30 das 40 amostras) das amostras de DNA foram digeridas, pois, não apresentam DNA inteiro e mostra o arraste. As amostras em que o DNA foi adequadamente digerido coincidem com as amostras em que o DNA se mostrava íntegro, quando analisado no gel de qualidade, e apresentavam valores das razões 260/280 nm e 260/230 nm próximos ao ideal. A integridade e pureza do DNA para a restrição é de grande importância, pois, a enzima pode não reconhecer o local de fazer os cortes ou os contaminantes podem dificultar a ação da enzima (HEALEY et al., 2014).

5.3 Resultado da PCR região ribossômica

A Figura 3 apresenta o resultado da amplificação das regiões ITS1/ITS4. Das 40 amostras 24 amplificaram (60 %) e correspondem as amostras com as melhores relações A260/280 e A260/230. O primers ITS1/ITS4 são considerados primers universais, pois, amplificam regiões dos genes do rRNA nuclear de eucariotos. Portanto, a extração de DNA de qualidade é importante para obter DNA íntegro, com a região de anelamento do primer, e puro, sem contaminantes que interfiram na ação da polimerase. Sendo assim, só com DNA em quantidade, qualidade e pureza haverá amplificação bem-sucedida da região ITS1/ITS4.

Como algumas amostras amplificaram bandas diferentes, mesmo sendo da mesma planta, é provável que houve amplificação de segmento de DNA não íntegro.

Figura 2 – Digestão do DNA com EcoRI resolvido em gel de agarose 0.8 %. 1 Kb: marcador de peso molecular; A: cultivar Acauã; B: cultivar Bourbon; C: cultivar Catuaí; T: cultivar Topázio; S: sem a etapa de limpeza; L: com a etapa de limpeza.

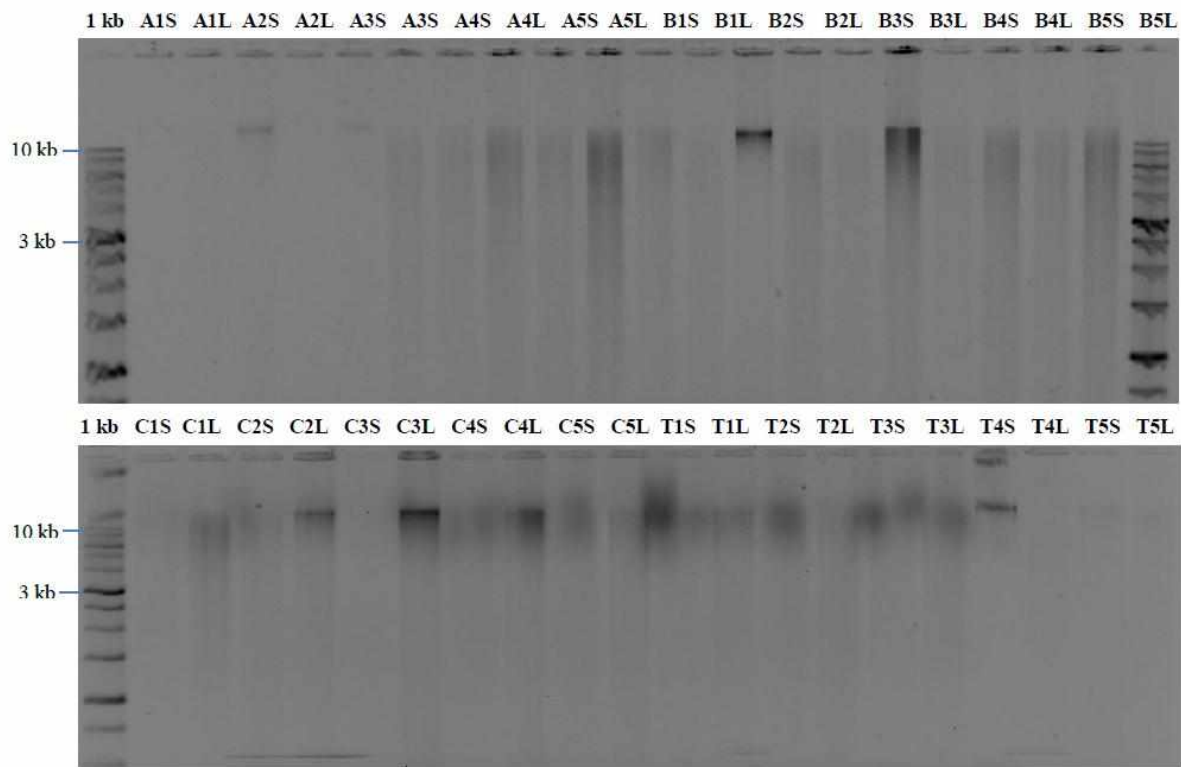
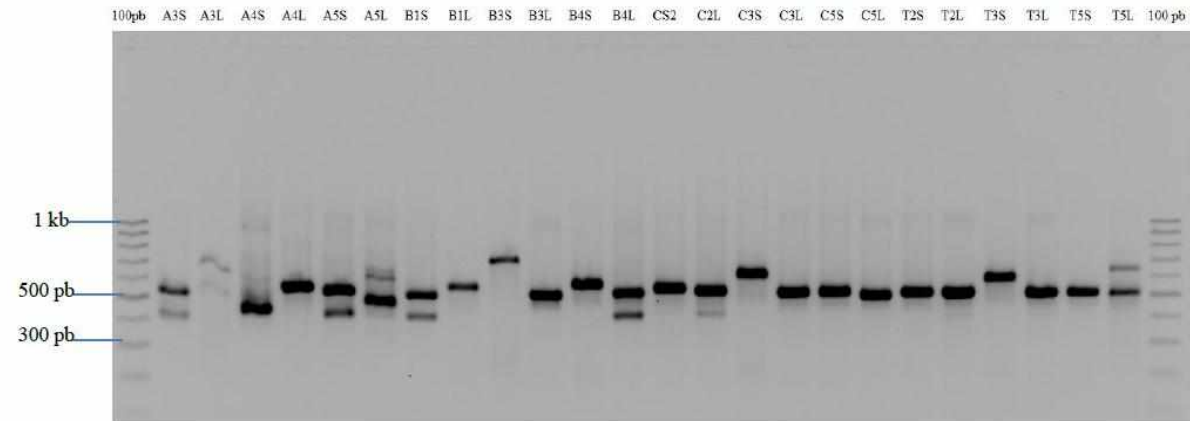


Figura 3 – Perfil de DNA obtido da amplificação da região ITS1/ITS4 resolvido por eletroforese em gel de agarose 1.5 %. 100 pb: marcador de peso molecular A: cultivar Acauã; B: cultivar Bourbon; C: cultivar Catuaí; T: cultivar Topázio; S: sem a etapa de limpeza; L: com a etapa de limpeza.



Atualmente, os protocolos mais utilizados para a extração de DNA de café foram descritos por Ky et al. (2000), Diniz et al. (2005) e Healey et al. (2014). O tempo gasto para extrair DNA de café utilizando esses protocolos varia de 150 min (DINIZ et al., 2005) a 464 min (KY et al., 2000). O tempo gasto para protocolo aqui apresentado, sem a etapa de limpeza, considerando que a etapa de limpeza não foi eficiente, é de 59 min.

Além do tempo, os outros protocolos utilizam muito mais reagentes e entre esses reagentes alguns são tóxicos, como β -mercaptoetanol e clorofórmio, portanto, são protocolos não sustentáveis. Essa questão é particularmente importante, pois, quando se pensa em análises moleculares em programas de melhoramento, o número indivíduos de cada população é muito alto.

Outro ponto favorável ao protocolo deste trabalho é a quantidade de solução extratora e quantidade de tecido foliar. O protocolo descrito por Ky et al. (2000) utiliza 100 mL de solução extratora e 1 g de tecido seco. Já o protocolo de Healey et al. (2014) utiliza 10 mL da solução extratora e 1 g de tecido foliar congelado. No presente trabalho foram utilizados 1,8 mL de tampão de extração e 0,05 g de tecido foliar seco. Sendo assim, esse protocolo economiza muito reagente, sendo bastante favorável à sua utilização em análises genéticas para programas de melhoramento.

Entretanto, a pureza e a qualidade do DNA não foram adequadas para análises moleculares, pois, nenhuma amostra teve o padrão desejado para a relação A260/280 nm e para a relação A260/230 nm, 20,0 % das amostras não apresentaram DNA íntegro, 25,0 % não tiveram o DNA digerido pela EcoRI e 40,0 % não amplificaram a região ribossômica. Isto faz com que novos ajustes devam ser feitos neste protocolo para a obtenção de DNA de qualidade e pureza para ser utilizado em estudos moleculares de *C. arábica*.

6 CONCLUSÃO

O protocolo de extração de DNA foi eficiente para extrair DNA de diferentes cultivares de *C. arábica*, com a obtenção de grande quantidade de DNA.

Quando comparado com outros protocolos utilizados para a extração de DNA de café, o protocolo aqui apresentado mostrou-se simples e rápido. Entretanto, o DNA obtido não apresentou qualidade e pureza para análises moleculares, sendo necessários novos ajustes.

O protocolo aqui apresentado é promissor para a extração de DNA de café, considerando que, os protocolos atualmente utilizados consomem muito tempo e reagentes, e que alguns dos reagentes são tóxicos, tornando esses protocolos insustentáveis para análises moleculares de grande número de plantas.

REFÊRENCIAS

BRASILEIRO. A.C.M; ROMANO. E. **Extração de dna de plantas**. Disponível em: <<http://www1.uefs.br/disciplinas/bot859/extra.pdf>>. Acesso em: 28 ago. 2019.

BROWN. T.A. Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução. 4 e d. Porto Alegre: **Artmed**, 376p. 2003.

CAIXETA, E. T.; PESTANA, K. N.; PESTANA, R. K. N. Melhoramento do cafeeiro: ênfase na aplicação dos marcadores moleculares. In: GARCIA, G. de O.; REIS, E. F. dos; LIMA, J. S. de S.; XAVIER, A. C.; RODRIGUES, W. N. (Org.). Tópicos Especiais em produção vegetal V. Alegre: CCAUFES, 2015, v. 1.

CAFEICULTURA. **Composição química do café**. Disponível em: <https://revistacafeicultura.com.br/?mat=3407>. Acesso em: 6 nov. 2019.

CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ. **Cultivares de café**. 2011. Disponível em: <http://www.consorcioquisacafe.com.br/index.php/tecnologias/cultivares>. Acesso em: 24 nov. 2019.

DINIZ, L.E.C. et al. Analysis of AFLP markers associated to the Mex-1 resistance locus in Icatu progenies. **Cropp Breeding and Applied Biotechnology**, v.5, n. 4, p. 387 ,2005.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. 12:13-15, 1990.

EMBRAPA. **Café arábica corresponde a 70% e café conilon a 30% da produção dos Cafés do Brasil em 2019**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/47028493/cafe-arabica-corresponde-a-70-e-cafe-conilon-a-30-da-producao-dos-cafes-do-brasil-em-2019>. Acesso em: 14 out. 2019.

FANG, G.; HAMMAR, S.; GRUMET, R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genome DNA. **BioTechniques**, v. 13, p. 52- 54, 1992.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. **Brasília: Embrapa-Cenargen**. p.220. 1998.

HEALEY, A.; FURTADO, A.; COOPER, T.; HENRY, R. J. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. **Plant Methods**, v.10, n.21, 2014.

KY et al. Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea sp.*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, n. 4, p. 669-676, 2000.

LASHERMES, P. et al. Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica L.*). **Theor. Appl. Genet.**, v.100, p.139-146,2000

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Café no Brasil**. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/assuntos/política-agricola/cafe/cafeicu Ltura-brasileira](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/política-agricola/cafe/cafeicu/Ltura-brasileira)>. Acesso em: 10 out. 2019.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, C.R.; RAMÍREZ-MENDOZA, R.; JIMÉNEZ-RAMÍREZ, J.; GALLEGOS-VÁZQUEZ, C.; LUNA-VEJA, I. Improved method for genomic DNA extraction for *Opuntia* Mill. (Cactaceae). **Plant Methods**, 13, 82, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0234-y>.

MESQUITA. C. M. et al. Manual do café: colheita e preparo (*Coffea arabica L.*). **Belo Horizonte: EMATER-MG. 2016**. 52 p. il.

MOLINARI. H. B; CROCHEMORE. M. L. **Extração de DNA de genômico de *Passiflora spp.* para análise PCR-RAPD**. Revista Brasileira de Fruticultura. Jaboticabal-SP, v. 23, n. 2., p. 447-450. ago. 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v23n2/8001.pdf>>. Acesso em: 01 set. 2019.

ORMOND. J.G.P.; PAULA. S.R. L.; FAVERET FILHO. P.S. Ca. Café: (re)conquista dos mercados. **BNDES Setorial**. Rio de Janeiro. n. 10, p. 3-55, set. 1999.

PEREIRA. G.S.; PINHO. E.V.R.V.; PADILHA. L.; VILELA. L.R.; CARVALHO. B.L.; PINHO. I.V.V. **Coleta de folhas do cafeeiro e extração de DNA genômico de alta qualidade**. VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. 2009. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/44122/1/Coleta-de-folhas-docafeeiro.pdf>>. Acesso em: 01 out.2019.

POOLE. R. et al. Coffee consumption and health: umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes. **BMJ**, p. j5024, 22 nov. 2017.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. Nova York: Cold Spring Harbor, 1989.

SOUZA, D.C; TEIXEIRA, T.A. A simple and effective method to obtain high DNA quality and quantity from Cerrado plant species. **Molecular Biology Reports**, v.46, ed.4, p.4611-4615, 2019.

SOUZA, F.F. et al. Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia. **Porto Velho: Embrapa Rondônia.2004**.

TAMARI, F.; HINKLEY, C.S.; RAMPRASHAD, N. A comparison of DNA extraction methods using *Petunia hybrida* tissues. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 24, p. 113-118, 2013. <https://doi.org/10.7171/jbt.13-2403-001>.

TIBBITS, J.F.G.; MCMANUS, L.J.; SPOKEVIVIUS, A.V.; BOSSINGER, G. A rapid method for tissue collection and high-throughput isolation of genomic DNA from mature trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 24, p. 81-91, 2006. <https://doi.org/10.1007/BF02914048>.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. Academic Press, New York, pp 315–322, 1990.