

**Comparação de três tampões para extração de
DNA genômico de tecidos foliares de *Eucalyptus
camaldulensis* Dehnh**

Comparison of three buffers for extraction of genomic
DNA from leaf tissues of *Eucalyptus camaldulensis*
Dehnh

Adriana Zanirato Contini da Silva¹
Reginaldo Brito da Costa²
Daniela Tiago da Silva Campos³

¹ Mestre, pesquisadora DTI - CNPq/FAPEMAT. E-mail: dricazc@hotmail.com

² Professor da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária; Programa de Mestrado em Desenvolvimento Local. E-mail: reg.brito.costa@gmail.com

³ Universidade Federal de Mato Grosso, professora do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical e Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus Cuiabá. E-mail: daniela_campos@ufmt.br

RESUMO

A obtenção de DNA genômico de qualidade e em quantidade suficiente é o primeiro passo para o desenvolvimento das diversas técnicas moleculares que avaliam o polimorfismo em sua sequência. A presença de fenóis, polissacarídeos e de outros componentes representa o principal problema na extração de DNA e na aplicação subsequente, restringindo a eficiência do processo. Este trabalho tem como objetivo comparar três tampões de extração de DNA genômico de folhas jovens, maduras de *Eucalyptus camaldulensis*, e para tanto se utilizou o protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) com as seguintes modificações: Tampão 1, seguiu-se a descrição do protocolo, sem alterações; Tampão 2, ao protocolo, adicionou-se 2% de PVP (20 ug mL⁻¹ do tampão de extração); Tampão 3, ao protocolo, adicionou-se 2% de PVP (20 ug mL⁻¹ do tampão de extração) e 50 uL de Proteinase K (20 ug mL⁻¹ do tampão de extração). A quantificação do DNA total foi realizada de três formas, eletroforese em gel de agarose [0,8%], espectrofotômetro Biospectro SP-220®, e em nano-espectrofotômetro quantificador. De maneira geral, o protocolo de extração com suas modificações permitiu a obtenção de quantidades satisfatórias e de boa qualidade de DNA, visualizadas primeiramente pelas imagens no gel de agarose, e confirmadas pela concentração calculada por absorbância nos outros dois métodos, contudo os tampões 1 e 2 proporcionaram os melhores resultados quantitativos e qualitativos.

PALAVRAS-CHAVE

análises moleculares
CTAB
proteínase K

ABSTRACT

*Obtaining genomic DNA of sufficient quality and quantity is the first step in the development of various molecular techniques that assess the polymorphism in their sequence. The presence of phenols, polysaccharides, and other components is the main problem for DNA extraction and subsequent application by restricting the process efficiency. This study aims to compare three DNA extraction buffers genomic of young leaves, mature *Eucalyptus camaldulensis* for both used the CTAB protocol (cetyltrimethylammonium bromide) with the following modifications: Cap 1, followed by the description of the protocol without change; Buffer 2, the protocol was added 2% PVP (20 ug ml-1 of extraction buffer); Cap 3, the protocol was added 2% PVP (20 ug ml-1 of extraction buffer) and 50 uL of Proteinase K (20 ug ml-1 of extraction buffer). Quantitation of total DNA was performed in three ways, agarose gel electrophoresis [0.8%] spectrophotometer Biospectro SP-220®, and nano-quantizer spectrophotometer. In general, the extraction protocol with modifications thereof allowed to obtain satisfactory amounts and good quality DNA, first displaying the images on agarose gel and the concentration confirmed by absorbance calculated for the other two methods, however, the caps 1 and 2 provided the best quantitative and qualitative results.*

KEY WORDS

*molecular analysis
CTBA
proteinase*

1 INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, que se destaca, dentre as espécies do gênero, por apresentar maior plasticidade adaptativa às condições brasileiras, pertencente à família Myrtaceae, foi introduzido no Brasil no início do século XX. Em função do seu rápido crescimento, boa adaptação às condições ambientais em diversas regiões do país e produção de madeira com boas propriedades físicas e mecânicas, tem sido utilizado em plantios de grande escala.

Nesse contexto, há a necessidade de identificar características adaptativas que aumentem as chances de sobrevivência das plantas nessas condições e introduzi-las no programa de melhoramento genético do gênero.

O emprego de técnicas moleculares juntamente à genética quantitativa na condução de populações segregantes tem possibilitado a predição do desempenho de progênes, permitindo a criação e o desenvolvimento de novos genótipos, em que o potencial genético da espécie é maximizado.

Diversas técnicas moleculares desenvolvidas para o estudo com progênes estão disponíveis atualmente para a detecção da variabilidade genética em nível molecular, com a detecção de polimorfismos genéticos. Essas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo.

Para tanto, a extração de DNA aplicada às diversas análises moleculares precisa ser otimizada, proporcionando material de qualidade e em quantidade. Nesses estudos, apesar da repetibilidade, as quantidades de material necessárias para investigação são pequenas, sendo utilizados microlitros (μL), contudo a qualidade do material, expressa por sua pureza, é fundamental para proporcionar maior confiabilidade aos resultados.

Os metabólitos secundários que protegem as plantas da herbivoria e do ataque de patógenos conferem certa resistência natural a elas e, apesar de alguns compostos fenólicos serem usados na confecção de adesivos, representam um grande problema no processo de purificação de DNA vegetal.

Embora remova a maioria das proteínas, os protocolos tradicionalmente utilizados para extração de DNA vegetal apresentam falhas na

eliminação efetiva de polissacarídeos e estas substâncias interferem no rendimento e na qualidade ao final do processo de extração.

Esses aspectos evidenciam a necessidade de se testar e ajustar protocolos segundo seu propósito e espécie. O protocolo padrão utilizado em grande parte dos trabalhos utiliza o CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) com adaptações específicas. Caracteriza-se por utilizar esse detergente catiônico com capacidade de afetar a permeabilidade das membranas celulares.

O objetivo deste estudo foi comparar a qualidade e quantidade do DNA genômico extraído de folhas de *E. camaldulensis*, com protocolo que utiliza CTAB, com a adição de proteinase K e PVP, bem como avaliar a eficiência dos métodos de quantificação por eletroforese em gel e por espectrofotometria.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido com folhas jovens de *E. camaldulensis*, coletadas em setembro de 2012, em um experimento de teste de progênie de meio-irmãos, que está instalado no Instituto Federal de Mato Grosso, Campus São Vicente, no município de Santo Antônio de Leverger, MT, sob delineamento de blocos ao acaso com 132 tratamentos (progênies), cinco repetições e três plantas por parcela em linhas simples, no espaçamento 3 x 2 m.

As folhas de *E. camaldulensis* foram coletadas de 15 árvores, com as quais foram formados três grupos, compostos por cinco amostras, constituindo os grupos A, B e C. Para todas as amostras, o processo de extração foi realizado em duplicata, com o intuito de aumentar o número de repetições, garantindo a obtenção de DNA.

O material vegetal após a coleta foi envolvido em papel toalha, identificado individualmente e acondicionado em saco plástico. As amostras foram conservadas em caixa de isopor com gelo, por aproximadamente 12 horas, e conduzidas ao Laboratório de Biotecnologia Florestal, na Faculdade de Engenharia Florestal UFMT, Cuiabá, MT, onde foram lavadas em água corrente, enxugadas e armazenadas em freezer a 20°C até o momento do processamento delas.

Na primeira etapa, utilizou-se a base de um protocolo para extração de DNA genômico via CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio),

modificado a partir do processo desenvolvido por Doyle e Doyle (1990), posteriormente alterado por Ferreira e Grattapaglia (1998).

Avaliaram-se três diferentes tampões, que diferiram pela composição do tampão de extração (TE), que é a primeira solução empregada no processo de extração de DNA. No tampão 1, não se utilizou a proteinase K nem o PVP; no tampão 2, utilizou-se apenas o PVP; e no tampão 3, utilizou-se o PVP (Polyvinylpyrrolidone) e a proteinase K; os tampões estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Componentes do tampão de extração (TE) para *Eucalyptus camaldulensis* com PVP e proteinase K e respectivas concentrações.

Componentes do tampão	Tampão 1 (T1)	Tampão 2 (T2)	Tampão 3 (T3)	[Final]
CTAB 10%	2,0 ml	2,0 mL	2,0 mL	2%
NaCl 5 M	2,8 mL	2,8 mL	2,8 mL	1,4 M
Tris-HCl 1M (pH 8)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	100 mM
EDTA 0,5 M (pH 8)	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	20 mM
β -mercaptoetanol	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	1%
PVP [2,0%] (20 μ g/mL)	-	1 g \pm 0,1 mL	1 g \pm 0,1 mL	2%
Proteinase K (20 μ g/mL)	-	-	0,05 mL	20 μ g/mL
Água destilada autoclavada (q.s.p.)	3,7 mL	3,6 mL	3,55 mL	10 mL

As porções de 3 g das amostras de folhas picadas foram maceradas em cadinho com pistilo de cerâmica, após o congelamento por nitrogênio líquido. Alíquotas médias de 1 g do material pulverizado foram colocadas em microtubos de 2 mL, até ocuparem 50 % de seu volume, onde foi adicionado o TE .

Para a digestão das proteínas e lise da membrana celular, as amostras foram levadas à incubação no Thermo-Shaker (Agimaxx[®]) a 65°C por 32 minutos, agitadas em intervalos de 10 minutos a 250 rpm. Ao atingir a temperatura ambiente, foram adicionados às amostras 400 μ L do composto clorofórmio + álcool isoamílico (24:1), seguido de centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm, a 4°C. Após esse procedimento, retirou-se todo o sobrenadante (fase aquosa) que foi transferido para um novo microtubo, onde foram adicionados 54 μ L de CTAB [10%].

O extrato foi agitado suavemente durante 5 minutos. Em seguida, repetiu-se o processo adicionando-se 200 μ L de clorofórmio + álcool

isoamflico (24:1), seguido de nova agitação e centrifugação por 5 minutos, 10.000 rpm, 4°C. A etapa seguinte consistiu na adição de 600 µL de isopropanol gelado, agitando suavemente por inversão. As amostras foram deixadas em incubação por uma noite a -20°C.

Transcorrido o período de 12 horas, os microtubos contendo o material em estudo foram centrifugados por 10 minutos a 12.000 rpm, a 4°C. O sobrenadante resultante foi descartado, deixando-se somente o precipitado de DNA no fundo do microtubo.

Procedeu-se à lavagem de sais do precipitado com 500 µL de Álcool 70%, mantendo-os imersos por aproximadamente 8 minutos, secando-os em temperatura ambiente. O precipitado seco foi diluído em 100 µL de TE, onde se adicionou 1 µL de RNase a cada microtubo. A solução formada foi agitada a 1.500 rpm (1 minuto) e colocada em incubação no Thermo-Shaker por 30 minutos a 37°C, para ativação enzimática. Após esses procedimentos, os tubos foram levados à geladeira por duas horas.

Na comparação dos métodos para quantificação e avaliação da qualidade, cada repetição foi assumida como uma amostra independente. Na segunda etapa, a quantificação, o primeiro método empregado foi a eletroforese horizontal em gel de agarose [0,8%], corado com brometo de etídio (0,02 µL mL⁻¹). Submerso em tampão Tris-Borato-EDTA [1X] (TEB), a cada poço do gel foram aplicadas alíquotas de 4 µL de cada amostra, coradas com tampão de carregamento Blue Loading Dye 6X. Para a comparação das bandas, no primeiro poço de cada linha, aplicou-se o marcador de peso molecular conhecido High Mass DNA Ladder (Invitrogen®) em seguida, o sistema foi exposto a uma corrente elétrica com voltagem constante de 60 V, 300 mA, por 60 minutos. Após eletroforese, o gel foi visualizado no sistema de aquisição de imagens Gel Doc EZ (Bio-Rad).

No espectrofotômetro Biospectro SP-220® (A), foram realizadas leituras da DO 260 nm e 280 nm, para tal, seguindo orientações do fabricante, as amostras foram diluídas na proporção de 1:100, em água estéril autoclavada. No nano-espectrofotômetro L-Quant® (B), foram feitas medições em DO 230, 260 e 280 nm. As concentrações de DNA foram estimadas a partir das seguintes equações:

$$(A) [DNA] = 50 \mu\text{g/mL} \times DO_{260} \times \text{fator de diluição}$$

sendo: 1 DO = 50 µg/mL de DNA (SAMBROOCK et al., 1989), e para

$$(B) [DNA] = 50 \text{ ng}/\mu\text{L} \times DO_{260}$$

Na estimativa da pureza das amostras, utilizou-se a razão $DO_{A_{260}}/A_{280}$ (A e B), para verificar contaminação por proteínas/fenóis, e as razões $DO_{A_{230}}/A_{260}$ (B) para mensurar possível contaminação por carboidratos. Os parâmetros adotados para a determinação do grau de pureza estão na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros indicados na literatura para determinar contaminação de amostras de DNA de acordo com a absorbância das substâncias contaminantes em solução.

Taxa	Parâmetro	Interpretação	Referência
	< 1,8	Contaminação por proteínas e fenóis	
A260/280	1,8 ≈ 2,0	Ideal para amostra pura	Mazza e Bittencourt (2000)
	> 2,0	Contaminação por RNA	Turner et al. (1997)
A230/260	2,0 ≈ 2,2	Ideal para amostra pura	Fang et al. (1992)
	> 2,2	Contaminação por polissacarídeos, sais ou solventes orgânicos.	Pandey et al. (1996)

3 RESULTADOS

Obteve-se sucesso na extração de DNA da maioria das amostras de folhas de *E. camaldulensis*, o que é facilmente visualizável no gel de agarose apresentados na Figura 1. Os melhores resultados foram obtidos com os tampões de extração 1 e 2 respectivamente, que apresentaram bandas mais largas, de maior intensidade e nitidez.

No T1 utilizou-se apenas β -mercaptoetanol [1%], um composto antioxidante, que protegeu o DNA da ação de compostos secundários.

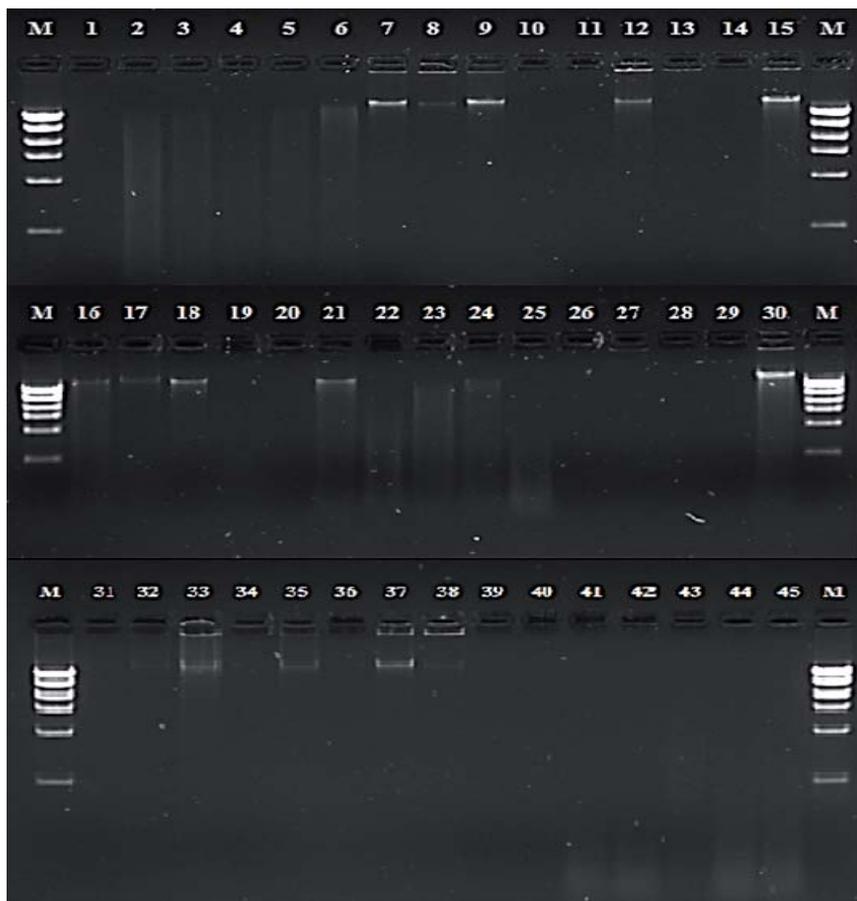


Figura 1 – Quantificação de DNA genômico em gel de agarose [1%], corado com brometo de etídio. Amostras 1 a 45 com DNA de *E. camaldulensis*, sendo: M – DNA de padrão conhecido – High Mass DNA Ladder (Invitrogen®); 1 – 15: amostras tratadas com Tampão 1; 16 – 30: amostras tratadas com Tampão 2; 31 – 45: amostras tratadas com Tampão 3.

No T2, além do β -mercaptoetanol, adicionou-se ao TEx a polivinil-pirrolidona (PVP), substância também com função antioxidante que auxiliou na manutenção da integridade do DNA.

O emprego do β -mercaptoetanol e da PVP, em conjunto, apresentou menor contaminação por proteínas e outras moléculas, para o *E. camaldulensis*, contudo observou-se que a combinação de componentes

com mesma função ou funções semelhantes (PVP e proteinase K) prejudicou a integridade do DNA ao invés de preservá-lo.

A análise preliminar do aspecto qualidade foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (Figura 1). Após a migração eletroforética, o DNA extraído apresentou-se no gel de agarose sob a forma de bandas com fluorescência mediana, bem delineadas, decorrente do bom desempenho dos protocolos de extração, para a maioria das amostras. A imagem evidenciou, ainda, boa quantidade de DNA expressa pelas bandas situadas acima dos 1000 pares de base (em comparação com padrão do marcador High Mass DNA Ladder), e qualidade satisfatória, demonstrada pela nitidez e falta de resíduos no canal de migração.

Quando analisadas separadamente, contudo, as imagens apontam o Tampão 2 com melhor aproveitamento (100%), seguido pelo Tampão 1 (80%). O Tampão 3 apresentou pior resultado, com apenas 4 amostras mostrando bandas visíveis, que representaram 40% do total.

Apesar das amostras 1 e 36 não terem apresentado bandas bem visíveis no gel após a eletroforese, e as amostras 31, 32, 33, 37 e 38 terem exibido sinais de degradação do DNA, com bandas pouco visíveis, através da espectrofotometria foi possível verificar que há presença de material genético nessas amostras a partir do valor de concentração obtido (165, 340, 270, 245, 220, 210, 290 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). As leituras e a concentração de DNA nas amostras, bem como a razão A_{260}/A_{280} são apresentadas nas Tabelas 3 e 4, em que os dados espectrofotométricos apontam material genético em todas as mostras, porém, em concentrações variadas.

Tabela 3 – Análise de pureza e quantificação dos DNAs extraídos com os Tampões 1 (β -mercaptoetanol), 2 (β -mercaptoetanol + PVP) e 3 (β -mercaptoetanol + PVP + Proteinase K), a partir de amostras de tecido foliar de 10 acessos de *E. camaldulensis*, utilizando leituras de absorbância a 260 e 280 nm, obtidas pelo espectrofotômetro SP-220, Biospectro®. As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si a $p \geq 0.05$, pelo teste de Tukey.

Tampão	A260/A280	Concentração de DNA (ng/mL)
1	1,748 a	306,66 a
2	1,793 a	320,83 a
3	1,598 b	275,00 a
CV (%)	7,25	24,61

Tabela 4 - Análise de pureza e quantificação dos DNAs extraídos com os Tampões 1 (β -mercaptoetanol), 2 (β -mercaptoetanol + PVP) e 3 (β -mercaptoetanol + PVP + Proteinase K), a partir de amostras de tecido foliar de 10 acessos de *E. camaldulensis*, utilizando leituras de absorbância a 230, 260 e 280 nm, obtidas pelo nano espectrofotômetro L-Quant. As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si a $p \geq 0.05$, pelo teste de Tukey.

Tampão	A230/A260	A260/A280	Concentração de DNA (ng/mL)
1	1,5348a	1,8478a	518,38a
2	1,4694a	1,7628a	545,46a
3	1,6442a	1,8086a	681,56a
CV (%)	8,71	3,76	24,71

O valor mínimo aceitável, encontrado na literatura, para a equação de absorbância (260nm/280nm) é 1.70, ou seja, valores abaixo indicam o grau de contaminação da amostra por outros compostos, principalmente proteínas e fenóis. As parcelas 1, 31, 36 e 38 obtiveram valores mais baixos para a razão: 1,43; 1,46; 1,43; e 1,45, respectivamente, o que pode indicar maior teor de moléculas indesejáveis em meio às de DNA.

Diante do exposto, pelos resultados da razão da absorbância de 260nm/280nm, o material genético obtido revelou-se em padrões aceitáveis de contaminações por compostos secundários e com integridade

preservada, apresentando presença de proteínas e RNA em quantidades aumentadas, em 40% das amostras.

No contexto apresentado, tais índices não inviabilizam a obtenção de padrões nítidos e reprodutíveis de produtos de amplificação por PCR para o material em estudo.

Apesar das amostras 1 e 36 não terem apresentado bandas bem visíveis no gel após a eletroforese, e as amostras 31, 32, 33, 37 e 38 terem exibido bandas pouco visíveis e sinais de degradação, através da espectrofotometria foi possível verificar haver presença de DNA nessas amostras a partir do valor de concentração obtido.

A quantificação por espectrofotometria mostrou que as concentrações do material variaram de 165 µg/mL a 500 µg/mL e, quando comparadas aos resultados de literatura pertinente (MAZZA; BITTENCOURT, 2000; FALEIRO et al., 2003; LIMA et al., 2006), as estimativas de DNA obtidas estão de acordo com os apresentados nesses trabalhos, sugerindo que as amostras de DNA extraídas podem ser usadas para estudos moleculares.

4 DISCUSSÃO

No auxílio à integridade do DNA, Feres et al. (2005), em estudos com plantas de savanas neotropicais, apontam que o uso de PVP no processo de extração contribuiu tanto na obtenção de DNA livre de contaminações, quanto na sua capacidade de replicação em testes de PCR (Polymerase Chain Reaction).

Apesar do uso da proteinase K estar associado à digestão de proteínas ligadas ao DNA (BRONDANI et al., 2007), sua adição ao TEx no T3 afetou negativamente o produto da extração, produzindo bandas tênues e estreitas, além da degradação completa do DNA de algumas amostras.

Segundo Shi et al. (2004), apesar da maioria dos protocolos incorporarem a proteinase K para digestão das proteínas, Angel et al. (2012), Nagarajan et al. (2011), Campos et al. (2010), Santalla et al. (2010), entre outros, em protocolos publicados recentemente, mostram que a adição desta pode ser desnecessária para a maioria das espécies.

As bandas visíveis, com boa fluorescência, nítidas e que não apresentam resíduos no canal de migração indicam a eficiência no conjunto

de procedimentos para a extração do DNA. Tais características são desejáveis e fundamentais para a reprodutibilidade dos produtos de amplificação via PCR (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A eletroforese, *per si*, aponta a eficiência dos protocolos de extração de modo geral. Segundo Nagarajan et al. (2011), o método empregado para a extração do material genético tem uma influência significativa na quantidade e na qualidade do DNA obtido.

As amostras de DNA com baixa concentração não inviabilizam a reprodutibilidade nas reações de PCR, contudo podem dificultar o balanceamento do mix (FALEIRO et al., 1996; MURRAY; THOMPSON, 1980). 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 as replicações por PCR.

A adequação da concentração de DNA é muito importante, uma vez que seu excesso pode implicar na falha completa da reação devido à alta concentração de impurezas agregadas, ou na obtenção de perfis eletroforéticos com arraste e bandas pouco definidas (ALFENAS, 2006). Por outro lado, baixa concentração de DNA resulta em amplificação errática ou não amplificação de certos fragmentos com perfis de eletroforese não reproduzíveis (HARBONE et al., 1991; DEMEK; ADAMS et al., 1992; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; QUEIROZ et al., 2002; VITAL et al., 2004).

Nesse contexto, aliar as pesquisas a nível molecular aos estudos em genética quantitativa, especialmente na condução de populações segregantes, possibilitará a predição do desempenho de progênies, permitindo, com maior rapidez e acurácia, a criação e o desenvolvimento de genótipos mais adaptados, em que o potencial genético da espécie será maximizado (BERED et al., 1997; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; GOLLE et al., 2009).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O uso combinado de β -mercaptoetanol e da PVP resultou em produtos da extração de menor contaminação por compostos secundários, confirmados pelo padrão das bandas visualizadas no gel.

- O uso de PVP não melhorou a quantidade e qualidade do DNA extraído das folhas de *Eucalyptus camaldulensis*.

- A adição de proteinase K ao tampão de extração provocou a diminuição do produto final, oxidando as moléculas de DNA junto com os compostos secundários extraídos.

- O protocolo de extração CTAB permitiu a obtenção de quantidades satisfatórias de DNA de boa qualidade a partir de amostras obtidas de folhas de *Eucalyptus camaldulensis*, podendo ser indicada como base para o estudo genético da população.

- Os resultados obtidos através da eletroforese em gel de agarose permitiu a visualização prévia da integridade do DNA extraído das folhas de *E. camaldulensis*.

- O uso do espectrofotômetro é uma alternativa importante a ser considerada para a mensuração através da absorção óptica de amostras com baixa concentração, utilizando-se pequenos volumes do material dissolvido.

- O emprego de volumes menores das amostras no processo de quantificação, possíveis através do nano-quantificador é importante, especialmente em casos de se trabalhar com material raro ou escasso.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. *Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos*. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2006. 627p.

ANGEL, R.; CLAUS, P.; CONRAD, R. Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions. *The ISME Journal*, v. 6, p. 847-62, 2012.

BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. *Ciência Rural*, Santa Maria, RS, v. 27, n. 3, ago. 1997.

BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. *Manual prático para o desenvolvimento de marcadores microssatélites em plantas*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. 111p.

CAMPOS, T.; OBLESSUC, P. R.; SFORÇA, D. A.; CARDOSO, J. M. K.; BARONI, R. M.; SOUSA, A. C. B.; CARBONELL, S. A. M.; CHIORATTO, A. F.; GARCIA, A. A. F.; RUBIANO, L. B. Inheritance of growth habit detected by genetic linkage analysis using microsatellites in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Breeding*, v. 27, n. 4, p. 549-60, 2010.

- DEMEK, T.; ADAMS, R. P. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotecnologia*, v. 12, n. 3, p. 333-4, 1992.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, p. 13-15. 1990.
- FALEIRO, F. G.; BARROS, E. G.; VILARINHOS, A. D.; CORRÊA, R. X.; PAULA JÚNIOR, T. J.; MOREIRA, M. A. Otimização da extração de DNA de esporos de *Uromyces appendiculatus*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 21, n. 2, p. 304-307, jun. 1996.
- FALEIRO, F. G.; FALEIRO, A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R.; KARIA, C. T. *Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado visando a análises moleculares*. Comunicado Técnico, 92. Planaltina, DF: EMBRAPA CERRADOS, abr. 2003.
- FANG, G.; HAMMAR, S.; GRUMET, R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genome DNA. *Biofeedback*, v. 1, p. 52-54, 1992.
- FERES, F.; SOUZA, A. P.; AMARAL, M. C. E.; BITTRICH, V. Avaliação de métodos de preservação de amostras de plantas de savanas neotropicais para a obtenção de DNA de alta qualidade para estudos moleculares. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 28, n. 2, jun. 2005.
- FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*. 1. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; BEVILACQUA, C. B. Melhoria florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. *Ciência Rural*, Santa Maria, RS, v. 39, n. 5, p. 1606-13, ago. 2009.
- HARBONE, J. B.; PALO, R. T.; ROBBINS, C. T. *Plant defenses against mammalian herbivore*. Boca Raton: CRC Press LLC, 1991. 192p.
- LIMA, R. S. N.; LEÃO, P. C. S.; SANTOS, C. A. F. Quantificação e Pureza do DNA de Videira por Meio de Espectrofotometria. JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMI-ÁRIDO, 1., 2006, Petrolina. *Anais...* Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2006. p. 219-223.
- MAZZA, M. C. M.; BITTENCOURT, V. M. 12. Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). *Boletim de Pesquisas Florestais*, Colombo, PR, n. 41, p. 12-17, jul./dez. 2000.
- MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, n. 8, p. 4321-5, 1980.

NAGARAJAN, S.; STEEPHEN, K. M.; NAIR, R. R.; SETHURAMAN, T.; ALAGAR, P.; GANESH, D. Improved protocol for isolation of genomic DNA from leaf tissues of *Phyllanthus emblica* Gaertn. *Iranian Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 4, out. 2011.

PANDEY, V. N. et al. Role of methionine 184 of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase in the polymerase function and fidelity of DNA synthesis. *Biochemistry*, 35(7): 2168-2179, 1996.

QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). *Revista Árvore*, v. 26, n. 4, p. 485-492, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3 v. : ill.

SANTALLA, M.; DE RON, A. M.; DE LA FUENTE, M. Integration of genome and phenotypic scanning gives evidence of genetic structure in Mesoamerican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from the southwest of Europe. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 120, n. 8, p. 1635-51, maio 2010.

SHI, S.R.; DATAR, R.; LIU, C.; WU, L.; ZHANG, Z.; COTE, R.J.; TAYLOR, C.R. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution. *Histochem Cell Biology*, Los Angeles, v. 122, n. 3, p. 211-8. 2004.

TURNER, P. C.; MCLENNAN, A. G.; BATES, A. D.; WHITE, M. R. H. *Instant notes in molecular biology*. Guildford Biddles, UK: [s.n.], 1997. 307p.

VITAL, B. R.; CARNEIRO, A. C. O.; PIMENTA, A. S.; DELLA LUCIA, R. M. Adesivos à base de taninos das cascas de duas espécies de eucalipto para produção de chapas de flocos. *Revista Árvore*, v. 28, n. 4, p. 571-82, 2004.