

PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *OCHROMA PYRAMIDALE*

Géssica Tais Zanetti¹, Poliana Figueredo², Joyce Andrade³ e Eulalia Soler Sobreira Hoogerheide⁴

¹Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT, Campus de Alta Floresta/MT. E-mail: gessicabiotech@gmail.com

²Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT, Sinop/MT. E-mail: polianaeliasfigueiredo@hotmail.com

³Embrapa Agrossilvipastoril, Sinop/MT. E-mail: joyce.andrade@embrapa.br

⁴Pesquisadora da Embrapa Agrossilvipastoril, Sinop/MT. E-mail: eulalia.hoogerheide@embrapa.br

*RESUMO: A espécie *Ochroma pyramidale*, conhecida como pau-de-balsa, é utilizada na recuperação de áreas degradadas. Na análise genética de populações de plantas, são essenciais o isolamento e a purificação de ácidos nucleicos de boa qualidade. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi padronizar um protocolo para extração de DNA de folhas de *O. pyramidale*, viabilizando análises moleculares através de marcadores moleculares. Os testes de extração do DNA partiram do protocolo padrão de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), utilizando concentrações de CTAB no tampão de extração (3 e 4%), concentrações de β -mercaptoetanol (0.2, 0.5, 1 e 2%) e, a maceração do tecido vegetal manual e mecânica “fest-prep” por 1, 2 e 3 minutos. Os resultados demonstram que a maceração manual não é viável, devido à formação de consistência muito pastosa, enquanto a maceração em “fest-prep” mostrou-se eficiente extraindo DNA em boa qualidade e quantidade. A concentração de CTAB a 4% mostrou-se mais eficiente, portanto, é indicada para extração de DNA. As concentrações de β -mercaptoetanol não revelaram diferenças. Os primers ISSRs avaliados amplificaram regiões do genoma de *O. pyramidale*. Os protocolos de extração e amplificação testados foram eficientes para a espécie e podem ser utilizados em estudos de diversidade genética de *O. pyramidale*.*

PALAVRAS-CHAVE: CTAB, ISSR, pau-de-balsa.

PROTOCOL FOR EXTRACTION OF GENOMIC DNA FROM *OCHROMA PYRAMIDALE*

*ABSTRACT: The species *Ochroma pyramidale*, known as balsa wood, is used in the recovery of degraded areas. In the genetic analysis of plant populations, isolation and purification of good quality nucleic acids are essential. In this sense, the objective of this study was to standardize a protocol for extracting DNA from leaves of *O. pyramidale*, enabling molecular analyzes through molecular markers. The DNA extraction tests were based on the standard CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) protocol, using concentrations of CTAB in extraction buffer (3 and 4%), β -mercaptoethanol concentrations (0.2, 0.5, 1 and 2%) and, the maceration of the vegetable tissue manual and mechanical “fest-prep” for 1, 2 and 3 minutes. The results demonstrate that manual maceration is not feasible due to the formation of very pasty consistency, while maceration in fest-prep was efficient in extracting DNA in good quality and quantity. The concentration of 4% CTAB was more efficient, therefore, it is indicated for DNA extraction. The concentrations of β -mercaptoethanol showed no differences. Primers evaluated were amplified regions of the *O. pyramidale* genome. The extraction and amplification protocols tested were efficient for the species and can be used in *O. pyramidale* genetic diversity studies.*

KEYWORDS: CTAB, ISSR, pau-de-balsa.

INTRODUÇÃO

Ochroma pyramidale, conhecido popularmente como pau-de-balsa, pertence à família botânica Malvaceae, uma espécie rústica e de boa adaptabilidade climática (Reis e Filho, 2011). Segundo Vieira e Locatelli (2006) a espécie ocorre naturalmente no México, Venezuela e, ao longo da costa oeste da América do Sul até a Bolívia. No Brasil, a espécie está distribuída nos estados do Acre, Amazonas, Pará e Roraima (Carvalho, 2010).

O pau-de-balsa é uma espécie importante para recuperação de áreas degradadas pela elevada produção de sementes, alto poder germinativo e de colonização de suas plântulas (Bao et al., 2016). Por ser uma atividade produtiva rentável pode beneficiar famílias de pequenos e médios produtores já que é uma cultura florestal com tempo de resposta menor que as demais (Weirich, 2008).

De acordo com Reis e Filho (2011), o pau-de-balsa tem sido cultivado, em outros estados, como atividade produtiva de valor e, há alguns anos vem ganhando importância também no estado do Mato Grosso. Segundo dados da Cooperativa dos Produtores de pau-de-balsa de Mato Grosso, a espécie já possuía, em 2012 cerca de 7 mil hectares plantados (COPROMAB-MT, 2012).

Considerando o incentivo ao cultivo e a importância da espécie para o Estado do Mato Grosso, tornam-se necessários estudos moleculares para analisar a diversidade genética da cultura, pois de acordo com Silva et al. (2014), a quantificação da diversidade genética auxilia no planejamento de estratégias para maximizar a utilização dos recursos genéticos visando a conservação.

A extração e purificação de DNA, seguida de amplificação usando a reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma abordagem geral para sequenciamento de DNA, isolamento de genes em sistemática de plantas e pesquisas de biotecnologia, de acordo com Bellstedt et al. (2010). O protocolo que usa o detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) tem sido largamente utilizado na extração de DNA em plantas devido à facilidade e rapidez (Romano e Brasileiro, 1999; Doyle et al., 1987).

Faleiro et al. (2003) afirmam que os procedimentos utilizados na extração e na purificação do DNA influenciam na sua quantidade, estabilidade e qualidade. No entanto, para cada tipo de amostra, vários protocolos podem ser testados, adaptados e otimizados, visando à obtenção de padrões nítidos e reprodutíveis de bandas de DNA, conforme Ferreira e Grattapaglia, (1995). Segundo Danner et al. (2011), os ajustes de protocolo são feitos para que

a extração de DNA seja simples, rápida e de baixo custo, obtendo-se DNA de qualidade para análises moleculares.

Romato e Brasileiro (1999) afirmam que a extração de DNA é uma etapa fundamental para obtenção de alta eficiência de amplificação nos protocolos de PCR. Na PCR, o uso de marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), para a análise genética, tem-se mostrado vantajoso se comparado a outros métodos (Costa et al., 2015). Esta constitui uma técnica de menor custo, não necessitando de conhecimento prévio do genoma da espécie objeto de estudo, gerando elevado número de locos polimórficos e alta reprodutibilidade (Santos et al., 2011).

Neste contexto o presente estudo objetivou padronizar um protocolo para a extração de DNA da espécie *O. pyramidale*, visando posteriores análises moleculares por meio de marcadores moleculares.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biologia Molecular da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, localizada em Sinop, MT. Para a realização dos testes de extração de DNA foram coletadas folhas jovens de *O. pyramidale*, situado na própria área da Embrapa Agrossilvipastoril. O material coletado foi armazenado em recipiente contendo sílica gel e logo em seguida conservado em freezer (-20C).

Os testes de extração do DNA foram realizados tendo como base o protocolo de extração de tecidos vegetais CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) de (DOYLE & DOYLE, 1987). Foram avaliadas as variáveis: maceração do tecido vegetal, mecânica em Tissue Lyser com “beads” (contas de cerâmica) e manual com cadinho, pistilo e tampão STE (Tris-HCl pH 8,0 10 mM/NaCl 100 mM/ 1mM EDTA pH 8,0). A concentração do B-mercaptoetanol no tampão de extração (0.2%, 0.5%, 1% e 2%) e, a concentração de CTAB no tampão de extração (3% e 4%). As modificações no protocolo de extração foram estimadas visando à eficiência no processo de extração, bem como, redução da degradação do material genético vegetal.

Protocolo 1: Extração de DNA total através de maceração do tecido foliar de Ochroma pyramidale em tampão STE.

Para extração de DNA de folhas de pau-de-balsa, seguiu-se o protocolo de Doyle & Doyle, 1990, com modificações. O material vegetal que estava armazenado em sacos plásticos

contendo sílica em freezer à -20°C foi retirado e cerca de 150mg de folhas de cada uma das amostras foram colocadas em cadinhos. Com auxílio de pistilo e 1,5mL de solução tampão STE foram maceradas até atingir a consistência líquido-pastosa. Posteriormente, cerca de 0,5mL do líquido resultante da maceração foi transferido para microtubos de 2mL cada. Para este protocolo foram realizadas 3 repetições.

Em capela, montou-se a mistura de tampão de extração (CTAB) 3%, Polivinilpirrolidona (PVP) 1% e 2-mercaptoetanol (0.2%, 0.5%, 1% e 2%) para transferência de 800µL em cada microtubo. Após isto, os microtubos foram colocados em vórtex por 1 minuto, e em banho-maria à 65°C por 30 minutos. Adicionou-se aos tubos 500µL de clorofórmio: álcool isoamil [24:1] (CIA) e misturou-se até formar uma emulsão, levando-os até a centrífuga à 8000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, coletou-se e transferiu-se a fase aquosa superior para um novo tubo contendo 200µL de tampão de extração sem 2-mercaptoetanol e 500µL de CIA. Microcentrifugou-se por 10 minutos a 8000 rpm. Novamente coletou-se e transferiu-se a fase aquosa superior para um novo tubo contendo 200µL de tampão de extração sem 2-mercaptoetanol e 500µL de CIA. Microcentrifugou-se por 10 minutos a 8000 rpm. A fase aquosa superior contendo o DNA, cerca de 400µL de cada microtubo, foi retirada e colocada em um novo tubo onde se adicionou volume igual de isopropanol (800µL). Centrifugou-se por 10 minutos a 8000 rpm. O sobrenadante foi vertido, restando apenas o pellet, que foi lavado por duas vezes com 1mL de etanol 70%, seguido de centrifugações de 2 minutos a 8000 rpm. Despejou-se o etanol 70% na última lavagem e, deixou-se o pellet secar por 01h30min horas. Ressuspendeu-se o DNA em 50µL de tampão TE contendo ribonuclease [RNase] (10mg.ml⁻¹) e incubou-se por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, armazenaram-se os microtubos com DNA em geladeira a 4°C. Realizou-se a quantificação do DNA extraído, 24 horas após a extração, utilizando o equipamento Nanodrop (marca e modelo). Em seguida, uma eletroforese em gel de agarose a 1% caracterizou a presença e qualidade do DNA extraído das folhas da pau-de-balsa.

*Protocolo 2: Extração de DNA total através de maceração do tecido foliar *Ochroma pyramidale* em “fest-prep” (TissueLyser II, QIAGEN)*

O material vegetal que estava armazenado em sacos plásticos contendo sílica em freezer à -20°C foi retirado e cerca de 150mg de folhas de cada uma das amostras foram colocadas microtubos de 2mL. Com auxílio de 2 esferas de aço inoxidável e 800µL de CTAB 3% foram maceradas por 1 minuto atingindo consistência líquido-pastosa. Este protocolo foi

realizado em 3 repetições. Os passos seguintes do Protocolo 2 são os mesmos descritos para o Protocolo 1.

Protocolo 2.1

Seguiu-se o mesmo padrão do Protocolo 2, porém, o tempo de maceração em “fest-prep” testado foi de um e dois minutos, objetivando comparação entre os tempos de maceração e obtenção de consistência líquido-pastosa. Este protocolo foi realizado em duas repetições. Os passos seguintes do Protocolo 2.1 são os mesmos descritos para o Protocolo 1.

Protocolo 2.2

Seguiu-se o mesmo padrão do Protocolo 2, porém, utilizou-se menor quantidade de material vegetal, cerca de 50mg de folhas de cada uma das amostras. Os tempos de maceração em “fest-prep” testados foram de dois e três minutos. Este protocolo foi realizado em duas repetições. Os passos seguintes do Protocolo 2.2 são os mesmos descritos para o Protocolo 1.

Protocolo 2.3

Após a verificação de que maior quantidade e melhor qualidade de DNA foram obtidas macerando-se 50mg de material vegetal por 3 minutos, esta variável foi padronizada. Testaram-se diferentes concentrações de CTAB no tampão de extração, em 3% e 4%. Padronizou-se para este teste a concentração de 2-mercaptoetanol de 0,5%. Este protocolo foi realizado em três repetições. Os passos seguintes do Protocolo 2.3 são os mesmos descritos para o Protocolo 1.

Protocolo 2.4

Testaram-se diferentes concentrações de 2-mercaptoetanol (0,2%, 1% e 2%) no tampão de extração CTAB a 4%, buscando-se verificar se existiriam diferenças na qualidade e quantidade do DNA extraído. Este protocolo foi realizado em três repetições. Os passos seguintes do Protocolo 2.4 são os mesmos descritos para o Protocolo 1.

Tabela 1 - Resumo dos protocolos de extração de DNA genômico aplicados em folhas de *Ochroma pyramidale*.

Protocolo	Tipo de trituração	Tempo de Trituração (minutos)	CTAB (%)	β-mercaptoetanol (%)
1	Manual	-	3%	0.2%, 0.5%, 1% e 2%
2	“fest-prep”	1	2%	0.2%, 0.5%, 1% e 2%
2.1	“fest-prep”	1 e 2	5%	0.2%, 0.5%, 1% e 2%
2.2	“fest-prep”	2 e 3	5%	0.2%, 0.5% e 1%
2.3	“fest-prep”	3	3 e 4%	0,5%
2.4	“fest-prep”	3	4%	0,2%, 1% e 2%

Para avaliar a qualidade e integridade do DNA extraído, em todos os protocolos, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1 %, à 60V e, corados com GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA). Os géis foram analisados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentados. Já para avaliar a quantidade de DNA, em nanogramas, utilizou-se o Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Foram realizadas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) para verificar a eficiência de amplificação do DNA nos protocolos. Foram utilizados sete primers ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats), ou seja, degenerados (Tabela 2). O preparo das reações consistiu em 8.8 µL de água MiliQ destilada, 2µL de Buffer, 3µL do primer (0.2mM), 4µL dNTP, 0,2 µL Taq DNA Polimerase e 2µL do DNA extraído de *O. pyramidale*, considerando um volume final de PCR de 20 µl.

Tabela 2 - Primers ISSRs testados para amplificação de DNA genômico de *O. pyramidale*.

Primers ISSR	Sequência de nucleotídeos	Temperatura Melting (C)
UBC 817 - DiCA3'A	CACACACACACACAAA	50.3
UBC 825 - DiAC3'T	ACACACACACACACT	51.4
UBC 828 - DiTG3'A	TGTGTGTGTGTGTGTGA	51.3
UBC 866 – TriCTC	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	55.7
UBC 890 - DiGT5'VHV	VHVGTTGTGTGTGTGTGT*	52.2
DiCA5'CR1	CRCACACACACACACA*	58.8
DiGA5'CR2	CRGAGAGAGAGAGAGA*	58.8

*R = (A ou G); V = (A, C ou G) e H = (A, C ou T).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Thermal Cycler, modelo T100, em um total de 35 ciclos, em três etapas: Desnaturação, Anelamento e Elongação. A desnaturação do DNA ocorreu a 94°C por quatro minutos; na etapa de anelamento, a temperatura foi generalizada para os primers escolhidos a 52°C por 35 segundos; e a etapa de elongação ocorreu a 72 °c por dois minutos. Ao final dos 35 ciclos, ocorreu a etapa de extensão final das reações, realizada a 72°C por 7 minutos.

Para avaliar a qualidade e integridade do DNA extraído, os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose á 1%, corados com GelRed, a uma voltagem de 60V por 1 hora e, posteriormente visualizados e fotografados sob luz ultravioleta para posterior análise dos géis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à forma de maceração nos Protocolos 1 e 2, os dois métodos não foram eficientes e capazes de proporcionar uma boa quantidade de DNA (Figura 1). Os DNAs extraídos pelos dois métodos apresentaram arraste vertical no gel causado por contaminação de DNAses ou por quebra mecânica durante a extração com o clorofórmio (Romano & Brasileiro, 1999).

Na maceração manual observou-se a formação de consistência muito gelatinosa e pegajosa, diferente do encontrado na maceração de outros tecidos foliares. Segundo Ivanova et al. (2008), os métodos de isolamento do DNA que dependem do etanol para precipitar o DNA dos tampões de extração são propensos a problemas, pois os polissacarídeos geralmente co-precipitam com o DNA.

Os contaminantes, ainda desconhecidos para *O. pyramidale* podem interferir direta ou indiretamente no isolamento e purificação do DNA. Os polissacarídeos podem se coprecipitar com o DNA após a adição do álcool durante a extração, resultando em solução viscosa (Sharma et al., 2002) de coloração marrom, imprópria para pesquisas que envolvem PCR. A presença de polifenóis é também problemática, sendo que esse tipo de contaminante é considerado um poderoso agente de oxidação presente em muitas espécies da planta que reduz o rendimento e a qualidade de DNA extraído (Loomis, 1974; Porebski et al., 1997).

Dessa forma, novos testes foram realizados apenas com maceração “fest-prep”. Neste tipo de maceração, observou-se que a quantidade de material vegetal era muito elevada para o tempo de maceração e a quantidade de tampão de extração adicionado. Assim, quando se aplicou o protocolo 2.1 observou-se que a maceração por 2 minutos foi mais eficiente quando

comparada com a maceração por apenas 1 minuto, pois facilita o processo de extração. Bellstedt et al. (2010) afirmam que a maceração em TissueLyser se dá por completa quando não são visíveis partículas consideráveis.

A quantificação em Nanodrop revelou a eficiência da maceração “fest-prep” por 2 minutos, visto que a concentração de ácidos nucléicos foi aproximadamente sete vezes maior do que em relação à maceração por apenas 1 minuto.

O Protocolo 2.2 confirmou as hipóteses anteriores de que maior tempo de maceração (3 minutos) e menor quantidade de material vegetal (cerca de 50mg) geram maior quantidade de DNA extraído. A eletroforese em gel de agarose também confirma uma qualidade do DNA superior. Na análise da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro, a razão entre o comprimento de onda de 260 nm e 280 nm de todas as amostras foram superiores a 1,8. Conforme Oliveira et al., (2007), as amostras de DNA extraído cujos valores da relação DO260/DO280 são inferiores a 1,8 apresentam contaminação com proteínas.

O Protocolo 2.3 revelou as diferenças entre utilizar o CTAB a 3% ou a 4%. Considerando a média da quantificação de ácidos nucléicos de todas as repetições, as amostras que foram extraídas a 4% apresentaram concentração seis vezes maior quando em relação à extração com CTAB a 3%. O mesmo foi observado na qualidade da eletroforese em gel de agarose, pois apresentaram razão 260/280 média de 1,8.

O aumento na concentração de CTAB para 4% no tampão possibilitou a extração de um DNA de melhor integridade, menos viscoso e, portanto, mais fácil de manusear no processo de extração, sugerindo elevado efeito desse componente sobre a qualidade de extração de DNA de tecidos foliares da espécie *O. pyramidale*.

Segundo Romano & Brasileiro (1999) o CTAB é utilizado para separar os ácidos nucléicos dos polissacarídeos, já que estes possuem solubilidade diferenciada na presença deste detergente, portanto, a concentração de CTAB pode interferir na qualidade do DNA extraído de *O. pyramidale*.

O Protocolo 2.4 revelou que nas diferentes concentrações de 2-mercaptoetanol avaliadas, o tampão de extração com CTAB a 4% promove maior extração de DNA do material vegetal de *O. pyramidale*. Além disso, a eletroforese em gel de agarose apresentou a melhores definições de bandas para este teste, o que demonstra boa qualidade do DNA extraído. As médias das razões entre 260/280 em todas as amostras superaram o valor de 1,9, ou seja, de acordo com a espectrofotometria não há contaminações com proteínas.

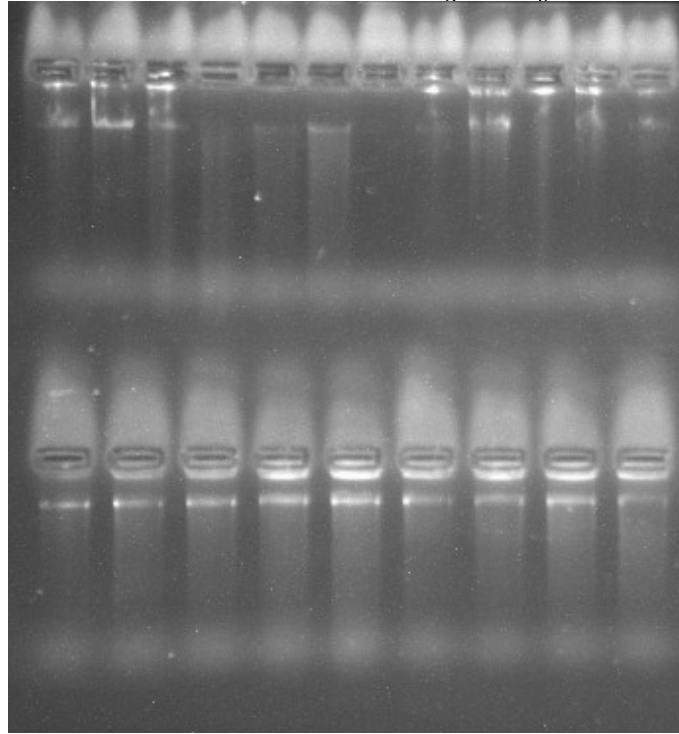


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose a 1%. Legenda: Be: Beads (maceração “fresp-prep” por 1, 2 ou 3 minutos), C: Maceração em cadinho. 3% e 4%: Concentração do CTAB. 0,2%, 0,5%, 1% e 2%: Concentração do 2-mercaptoetanol. **Superior:** Be+0,2%, Be+1%, Be+2%, C+0,2%, C+1%, C+2%, Be1 e 0,2%, Be1 e 0,5%, Be1 e 1%, Be2 e 0,2%, Be2 e 0,5%, Be2 e 1%. **Inferior:** Be2, 3% e 0,2%, Be2, 3% e 0,5%, Be2, 3% e 1%, Be3 e 0,2%, Be3 e 0,5%, Be3 e 1%, Be3, 4% e 0,5%, Be3, 4% e 0,2%, Be3, 4% e 1%.

Para a espécie em estudo, conforme resultado obtido pode-se afirmar que as concentrações de 2-mercaptoetanol no tampão de extração de DNA não interferiram na quantidade do DNA extraído com o CTAB na concentração de 3% e 4% em ambos os tipos de maceração.

O β -mercaptoetanol é um dos antioxidantes utilizado para neutralizar a ação dos polissacarídeos, polifenóis e outros metabólitos secundários no processo de isolamento de DNA (Dehestani & Tabar, 2007). Para a espécie em estudo, foram avaliadas três concentrações de β -mercaptoetanol no tampão de extração de DNA, e conforme resultados obtidos, a concentração de 2-mercaptoetanol não interferiu na quantidade e qualidade do DNA extraído com o CTAB na concentração de 5% (Figura 2).

A extração do DNA genômico do tecido vegetal de *O. pyramidale* foi satisfatória para a realização da PCR (Figura 2). Houve amplificação do material genético extraído através dos primers ISSR testados (Tabela 2).

Pela visualização dos produtos da PCR e com a utilização de um marcador de 100 pb no gel de agarose, pode-se observar alta concentração do DNA. Foi verificado um perfil homogêneo e constante de amplificação do DNA genômico resultante do DNA extraído.

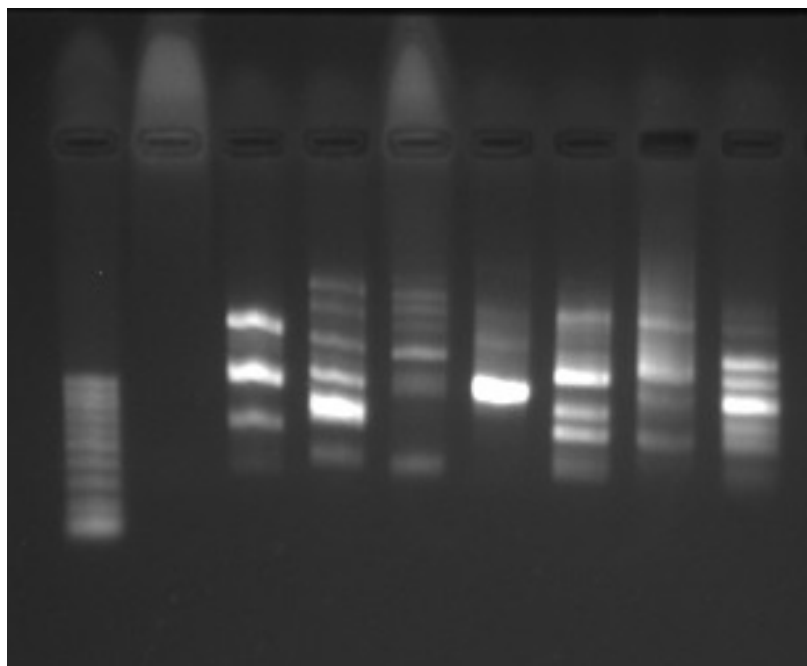


Figura 2 - Gel de agarose à 1%, com teste de amplificação de DNA extraído de *Ochroma pyramidale*, com 7 primers. 1. Marcador de peso molecular de 100pb. 2 Solução Branco. 3-9 Primers ISSR: UBC 817, UBC 825, UBC 828, UBC 866, UBC 890, DiCA5'CR1, DiCA5'CR2.

CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que a extração de DNA de *Ochroma pyramidale* via cadinho, pistilo e tampão STE não são viáveis. A maceração em “fest-prep” mostrou-se eficiente para extrair DNA de *Ochroma pyramidale* em boa qualidade e quantidade. Recomenda-se três minutos de maceração para melhores resultados. Além disso, uma alteração no protocolo viável é o uso de menor quantidade de material vegetal para se obter DNA de boa qualidade.

A concentração de CTAB no tampão de extração a 4% mostrou-se mais eficiente que a concentração de 3%, sendo, portanto, indicada para obter maiores quantidade de DNA e maior qualidade do mesmo.

Quanto às concentrações de 2-mercaptoetanol no tampão de extração, indica-se a menor concentração 0,2%, visando economia do reagente.

REFERÊNCIAS

- BAO, F; ROCHA, M DA; OLIVEIRA, MT DE; BAMBIL, D E LUZ, PB. Superação de dormência e estabelecimento de plântulas normais e anormais para produção de mudas de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. Iheringia, **Série Botânica**, Porto Alegre, 71(3):269-276, 2016.
- BELLSTEDT, DU; PIRIE, MD; VISSER, JC; VILLIERS, MJ DE; GEHRKE, B. Um método rápido e barato para a amplificação por PCR direta do DNA das plantas. **American Journal of Botany**, vol. 97, 2010.
- CARVALHO, PER. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 644p. 2010.
- COPROMAB-MT, Cooperativa de Produtores de Pau-de-Balsa de Mato Grosso. **Pau-de-balsa: aptidões e desafios**. 2012. Disponível em <www.embrapa.br>
- COSTA, D.F.DA; VIEIRA, F.DE A.; FAJARDO, C.G.; CHAGAS, K.P.T.DAS. Diversidade Genética e Seleção de Iniciadores ISSRS em uma População Natural de Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (APOCYNACEAE). **Revista Brasileira de Fruticultura**, 37(4), 970-976, 2015.
- DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z.; BITTENCOURT, J. V. M.; CITADIN, I.; SACHET, M. R. Proposta de protocolo para extração de DNA de jaboticabeira. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 363-367, 2011.
- DEHESTANI, A.; TABAR S. K. K. A rapid efficient method for DNA isolation from plants with high levels of secondary metabolites. **Asian Journal of Plant Sciences**, v.6, n.6, p.977-981, 2007.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L.; HORTORIUM, L.H.B. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p.13-15, 1987.
- 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**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 6 p. (Comunicado Técnico, 92).
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 1995. 220 p.
- IVANOVA, NV; FAZEKAS, AJ e HEBERT, PDN. Semi-automated, Membrane-Based Protocol for DNA Isolation from Plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, (2008) 26: 186.
- LOOMIS, M. D. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. **Methods Enzymology**, v.31, p.528-544, 1974
- OLIVEIRA, M.C. DE S.; REGITANO, L.C. DE A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D.G.; PATROCÍNIO, E.DO; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S.M.M.; TIMÓTEO, W.H.B.; JARDIM, S.N. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de

- DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, 38p., 2007.
- POREBSKI, S.; BAILEY, L. G.; BAUM, B. R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.15, p.8-15, 1997.
- REIS, CAF; FILHO, EP. Estado de arte de plantios com espécies florestais de interesse para Mato Grosso. Colombo. **Embrapa Florestas**, 2011.
- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia**, v.2, n.9, p.40-43, 1999.
- SANTOS, L. F.; OLIVEIRA, E. J.; SILVA, A. S. ISSR Markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*. **Biochemical Genetics**, Dordrecht, n. 49, p. 540–554, 2011.
- SHARMA, A. D.; GILL, P. K.; SINGH, P. DNA Isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. **Pant Molecular Biology Reporter**, v.20, p.415a-415f, 2002.
- SILVA, B.M. DA; DALBOSCO, E.Z.; BOTINI, N.; FARIA, R.B. DE; ROSSI, A.A.B. Protocolo para extração de DNA genômico de *Anacardium Giganteum* W. hancock ex engl. (anacardiaceae). **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.19; p. 2401-2407, 2014.
- VIEIRA, AH; LOCATELLI, M. Pau-de-balsa (*Ochroma pyramidale*) fam. Bombacaceae. **Agrofloresta**. Porto Velho: EMBRAPA, 2006.
- WEIRICH, N. E. **Diretrizes técnicas para o cultivo do pau-de-balsa (*Ochroma pyramidale*) no Estado de Mato Grosso**. Cuiabá: SEDER-MT, 2008. 22 p.