

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO DE BACHARELADO EM AGRONOMIA

RENATA ADELAIDE PLUTA

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO PARA
ARAÇAZEIRO VERMELHO (*Psidium cattleianum* SABINE) VISANDO
ESTUDOS MOLECULARES**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS

2020

RENATA ADELAIDE PLUTA

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO PARA
ARAÇAZEIRO VERMELHO (*Psidium cattleianum* SABINE) VISANDO
ESTUDOS MOLECULARES**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação,
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Agronomia, da Universidade Tecnológica Federal do
Paraná, Câmpus Dois Vizinhos, como requisito
parcial à obtenção do título de Engenheira
Agrônoma.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Morini Küpper
Cardoso Perseguini

Co-orientador: Nedia De Castilhos Ghisi

Dois Vizinhos

2020



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Dois Vizinhos
Curso de Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO

TCC

ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO PARA ARAÇAZEIRO VERMELHO (*Psidium cattleianum* SABINE) VISANDO ESTUDOS MOLECULARES

Autora: Renata Adelaide Pluta

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Morini Küpper Cardoso Perseguini

Co-orientadora: Nedia de Castilhos Ghisi

TITULAÇÃO: Engenheira Agrônoma

APROVADO em 09 de dezembro de 2020.

Prof^ª Dr^ª Betty Cristiane Kuhn

UTFPR-DV

Emanoele Cristina Weiss

UTFPR-DV

Profa. Dra. Nedia De Castilhos Ghisi

Coorientadora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter sido meu alento em todos os momentos, me dando forças e não me deixando desanimar.

Aos meus pais, Roni e Lorici por sempre me incentivarem e me apoiarem em cada fase dessa jornada.

À meu irmão Róger, pelo carinho e sobretudo pela amizade e companheirismo.

Aos amigos, Ivanessa Barth, Monica Seixas, Fábio Antonello e Jhenifer Canesso pelos momentos bons, pelas risadas, pela ajuda e apoio em cada passo dado.

Um agradecimento mais que especial ao Grupo de Biologia Molecular e a Isadora Bischoff, se não fosse seu auxílio esse projeto não seria possível, gratidão.

Às minhas orientadoras Juliana Morini Küpper Cardoso Persequini e Nédia de Castilhos Guisi, por me orientarem e por todos os conhecimentos repassados.

Agradeço aos Tutores do PET Agricultura Familiar, Sergio Miguel Mazaro e Jean Carlo Possenti, vocês têm sido minha dose de inspiração diária.

Aos meus colegas do Grupo PETAF, conviver com vocês é grandioso, além de tornarem meus dias mais alegres, sempre me proporcionam um crescimento pessoal e profissional.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram em minha jornada acadêmica.

RESUMO

PLUTA, Renata A. Estabelecimento de protocolos de extração para Araçazeiro vermelho (*Psidium cattleianum* SABINE) visando estudos moleculares. Trabalho (Conclusão de Curso) – Programa de Graduação em Bacharelado em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2020.

Dentre todos os gêneros da família Myrtaceae pode-se destacar como um dos detentores de espécies com maior interesse comercial o *Psidium*, que engloba os araçazeiros. As pesquisas acerca do melhoramento genético de espécies se fazem importantes para agricultura moderna, desenvolvendo cultivares superiores, com maior produtividade e melhor adaptação. Na atualidade, são pesquisados métodos de extração de ácidos nucleicos que sejam rápidos, de baixo custo, com produtos livres de contaminação e toxicidade, além de eficientes, mesmo com pequena quantidade ou escassez da amostra. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia de três protocolos de extração de DNA com o Kit Wizard® da Promega, para trintas amostras de Araçá vermelho (*Psidium cattleianum* SABINE), dois protocolos para amostras liofilizadas e um para folhas frescas. O experimento foi realizado no laboratório de Biologia Molecular da Universidade Tecnológica Federal do Paraná-Câmpus Dois Vizinhos, PR. As dez amostras coletados na fazenda experimental da UTFPR-DV e outras dez coletadas no município de Verê-PR, foram submetidas a liofilização e em seguida testado dois protocolos para folhas liofilizadas, sendo um deles fazendo o uso de proteinase K com diferentes tempos de incubação em banho-maria; trinta e sessenta minutos. O outro protocolo utilizou folhas naturais coletadas de dez árvores no Câmpus Dois Vizinhos e levadas imediatamente para o laboratório, onde foram maceradas com auxílio de um cadinho e submetidas a extração. Os três métodos foram positivos. Sendo o mais indicado o de extração ao natural por demandar menos tempo na execução. O protocolo que indicou a melhor qualidade e o mais demorado foi o de folhas liofilizadas. O método em que se usa a proteinase K é indicado para casos onde as amostras apresentam alguma contaminação e é mais dificultosa a extração.

Palavras-chave: Myrtaceae. Biologia molecular. Extração de DNA. Toxicidade.

ABSTRACT

PLUTA, Renata A. Establishment of extraction protocols for Araçazeiro Vermelho (*Psidium cattleianum* SABINE) for molecular studies. Trabalho (Conclusão de Curso) – Programa de Graduação em Bacharelado em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2020.

Among all the genera of the Myrtaceae family, *Psidium* can be highlighted as one of the holders of species with the greatest commercial value, which includes araçazeiros. Research on the genetic improvement of species is important for modern agriculture, developing superior cultivars, with greater productivity and better adaptation. Currently, methods for extracting nucleic acids that are fast, low cost, with products free of contamination and toxicity, as well as efficiency, even with a small amount or scarcity of the sample, are being researched. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the effectiveness of three DNA extraction protocols with the Wizard® Kit from Promega, for Araçá Vermelho (*Psidium cattleianum* SABINE), two teachers for lyophilized and one for fresh leaves. The experiment was carried out in the Molecular Biology laboratory of the Federal Technological University of Paraná - Câmpus Dois Vizinhos, PR. The ten collected at the UTFPR-DV experimental farm and the other ten collected in the municipality of Verê-PR, were subjected to lyophilization and then two protocols for lyophilized leaves were tested, one of which using proteinase K with different incubation times in water bath; thirty and sixty minutes. The other protocol uses natural leaves collected from ten trees at Câmpus Dois Vizinhos and taken immediately to the laboratory, where they were macerated with the aid of a crucible and subjected to extraction. The three methods were positive. Being the most suitable or natural extraction because it requires less time in execution. The protocol that indicates the best quality and the most time consuming was that of freeze-dried leaves. The method in which a proteinase K is used is indicated for cases where the presenters present some contamination and extraction is more difficult.

Keywords: Myrtaceae. Molecular biology. DNA extraction. Toxicity.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3. REFERENCIAL TEÓRICO	11
3.1 ARAÇÁ VERMELHO	11
3.2 ASPECTOS ECONÔMICOS DA ESPÉCIE	12
3.3 IMPORTÂNCIA DA BIOLOGIA MOLECULAR PARA O MELHORAMENTO GENÉTICO DO ARAÇÁ.....	13
3.4 PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA <i>PSIDIUM</i>	14
3.5 RISCOS NO USO DE SUBSTÂNCIAS NOS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL.....	17
4.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO TOTAL.....	17
4.2.1 Protocolo de extração de folhas frescas	17
4.2.2 Protocolo de extração com material conservado em nitrogênio líquido e liofilizado	18
4.2.3 Protocolo de extração com material conservado em nitrogênio líquido liofilizado extraído com Proteínase K.....	19
4.3 ANÁLISES DA EXTRAÇÃO	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1 EXTRAÇÃO COM FOLHAS NATURAIS	21
5.2 EXTRAÇÃO COM PROTEINASE K	22
5.3 EXTRAÇÃO COM FOLHAS LIOFILIZADAS.....	23
5.4 EXTRAÇÃO DE FOLHAS LIOFILIZADAS DO MUNICÍPIO DE VERÊ, PARANÁ	25
6. CONCLUSÕES	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
ANEXO A - Protocolo de extração de folhas frescas	36
ANEXO B - Protocolo de extração de material conservado em nitrogênio líquido e liofilizado	37
ANEXO C Protocolo de extração com material conservado em nitrogênio líquido liofilizado extraído com Proteínase K	38

1. INTRODUÇÃO

Nos biomas brasileiros concentram-se parte da diversidade genética de espécies nativas com destaque especial para família Myrtaceae, no qual é composta por muitos gêneros cujas espécies apresentam potencial para exploração econômica, sendo um destes o *Psidium*, que engloba os araçazeiros e goiabeiras, estando amplamente distribuído nos Estados brasileiros (FRANZON *et al.*, 2009).

Apesar do vasto número de espécies neste gênero e de sua ampla distribuição nos biomas, poucas coleções são conhecidas, tendo-se assim risco de perder valioso material genético na natureza. Visando evitar tal problema deve-se proceder com coletas visando a conservação de tais recursos antes que desapareçam da natureza. Algumas instituições como a EMBRAPA Clima Temperado, em Pelotas-RS, mantêm Banco Ativo de Germoplasma, tendo acessos de *Psidium* ligados ao araçá (*P. cattleianum*) conservados (FRANZON, SOUZA-SILVA, 2017).

Devido ao seu potencial tanto para consumo *in natura* como para o uso industrial, algumas fruteiras nativas vêm sendo alvo também, de estudos por sua aptidão farmacêutica, podendo passar de negligenciadas para espécies de importância comercial (FRANZON *et al.*, 2009).

Para Aquino, Walter e Ribeiro (2007) é importante aprofundar-se nos conhecimentos em relação a utilidade das plantas e assim potencializar seus usos e manejo adequados.

As análises da diversidade genética entre as espécies de potencial econômico se fazem necessárias, sobretudo quando se espera identificar possíveis combinações com maior taxa de heterozigose (FEHR, 1987). Isso possibilitaria ganhos expressivos nos programas de melhoramento e também quando relacionado ao manejo adequado da espécie bem como, sua conservação.

As pesquisas acerca do melhoramento genético de espécies são de grande importância para a agricultura moderna, desenvolvendo cultivares superiores, com maior produtividade e melhor adaptação (AMABILE; VILELA; PEIXOTO, 2018). Para que isso fosse possível o uso de novas técnicas foi imprescindível para a continuação dos trabalhos. Um dos métodos que possibilitou o avanço no ramo da Biologia Molecular foi a descoberta da PCR (*Polimerase Chain Reaction*), que permitiu a duplicação do DNA em uma reação em cadeia (RAMALHO, 2008).

Desde a década de 1960, métodos voltados para a detecção de polimorfismos passaram a ser desenvolvidos, no entanto, a expressão das enzimas era afetada pelas condições ambientais e pelos estágios de desenvolvimento da planta (BORÉM, 1998). Portanto, uma nova tecnologia baseada na detecção de polimorfismos em sequências de DNA foi desenvolvida para determinar pontos de referência nos cromossomos, que são tecnicamente chamados de marcadores moleculares (BORÉM; CAIXETA, 2008).

A PCR tornou viável a aplicação de marcadores moleculares em diversos estudos, um deles é no uso para análise de variabilidade genética, tornando possível a manipulação do DNA (LANZA; GUIMARÃES; SCHUSTER; 2000).

Para que um programa de melhoramento genético avance é de suma importância o conhecimento da variabilidade genética entre os acessos disponíveis para realizar novos cruzamentos genéticos, que visam obter maiores ganhos com a produtividade (RAMALHO, SANTOS & PINTO, 2008). A medida que se avançam as técnicas na área da biologia molecular, os programas de melhoramento e os estudos acerca da diversidade genética de populações, ganham novas alternativas de desenvolvimento.

Na atualidade, são pesquisados métodos de extração de ácidos nucleicos que sejam rápidos, de baixo custo, com produtos livres de contaminação e toxicidade, além de eficientes, mesmo com pequena quantidade ou escassez da amostra. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia de protocolos de extração de DNA para Araçá vermelho.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer protocolos de extração de DNA para Araçá vermelho (*Psidium cattleianum* SABINE).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a qualidade do DNA extraído;
- Comparar a eficiência de diferentes protocolos de extração/purificação de DNA;
- Testar a eficiência de dois tempos de incubação de banho-maria com proteinase K.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. ARAÇÁ VERMELHO

Dos mais de 100 gêneros existentes da família Myrtaceae, pode-se destacar como um dos detentores de espécies com maior valor comercial o *Psidium*, pois este abriga espécies como a goiabeira, mundialmente conhecida e consumida (LANDRUM e KAWASAKI, 1997; KAWASAKI e HOLST, 2004).

Além da goiaba outra fruteira nativa que vem se destacando por apresentar potencial para a fruticultura e exploração comercial é o Araçazeiro, cujo fruto pode apresentar epiderme vermelha ou amarela, sendo representado principalmente pelas espécies, *P. cattleyanum* Sabine e *P. guineense* Swartz (BEZERRA *et al.*, 2006).

A espécie *P. cattleyanum* Sabine é nativa do sul do Brasil (PIO CORREA, 1984). Além dos frutos e da madeira, as cascas e folhas podem ser utilizadas na forma medicinal. Distribuída geograficamente da Bahia ao Rio Grande do Sul é uma das espécies do gênero com grande interesse para exploração comercial utilizando seus frutos (BEZERRA *et al.*, 2006).

Ao testar espécies do gênero *Psidium* com potencial para o processamento, Santos *et al.* (2007), caracterizaram o suco de Araçá vermelho extraído mecanicamente e tratado enzimaticamente. Com alto valor nutricional e teor de vitamina C, o suco de Araçá vermelho tem baixo teor de açúcar elevado teor de compostos fenólicos, vitaminas e sais minerais (superior ao da maçã). Sendo que o tratamento enzimático melhorou a extração dos compostos fenólicos e elevou o rendimento em aproximadamente 50%, além de favorecer a manutenção da composição química do suco *in natura* e reduzir a viscosidade.

No sul do país a espécie *P. cattleyanum* pode ter de duas a três épocas de florescimento, sendo a mais comum de outubro a novembro (BAUER *et al.*, 2014; DANNER *et al.*, 2009; RASEIRA; RASEIRA, 1996). As flores são brancas, hermafroditas, possuindo ovário ínfero, geralmente com três a quatro lóculos, com aproximadamente 100 óvulos (SANHOTENE, 1989). A maturação dos frutos se inicia em fevereiro e pode ir até o início do inverno, sendo que estes têm alta taxa de vitamina C (FRANZON, 2004; RASEIRA; RASEIRA, 1996).

Resultados semelhantes foram encontrados por Danner *et al.* (2009) que realizou a fenologia da espécie registrando a plena floração em meados e final de

outubro e a maturação dos frutos da terceira semana de janeiro a meados de fevereiro de 2008. Houve diferenças nos períodos de floração entre os Araçazeiros, onde a terceira foi a mais precoce, o que pode indicar variabilidade genética.

O gênero *Psidium* produz frutos carnosos e muitas sementes por fruto (LANDRUM & KAWASAKI 1997), tendo ampla variedade de dispersores, como aves, peixes, mamíferos carnívoros, formigas, morcegos, macacos e ungulados (GRESSLER *et al.*, 2006).

O método mais indicado para propagação do araçazeiro é por meio de sementes (FACHINELLO *et al.*, 1994), pela facilidade de germinação e por segregação genética, o que não permite muita desuniformidade das mudas. A propagação por estaquia e enxertia não tem sido muito utilizada, pois ainda apresenta dificuldade em obter mudas (COUTINHO *et al.*, 1991; FACHINELLO *et al.*, 1994).

Devido aos fatores positivos que esta espécie apresenta, como facilidade para ser propagada por meio de sementes, ampla distribuição geográfica, proporcionando plasticidade nas condições edafoclimáticas das regiões brasileiras, proporcionando assim capacidade de se adaptar a diversos habitats e por ter frutos e folhas que podem ser exploradas economicamente a torna potencial para uso em pomar (BEZERRA *et al.*, 2006). Isso também agregará positivamente nos avanços do melhoramento genético da espécie, visando aumentar as coleções de germoplasma e protegendo os ecossistemas onde encontramos as populações naturalmente (BEZERRA *et al.*, 2006).

3.2 ASPECTOS ECONÔMICOS DA ESPÉCIE

O nosso país detém a maior biodiversidade do planeta, incluindo a variabilidade genética das espécies e os recursos biológicos e genéticos que são responsáveis pelo equilíbrio dos ecossistemas, sendo constituídos de grande fonte de recursos econômicos (DIAS, 2000).

O grupo das mirtáceas tem um grande número de espécies que podem ser aproveitadas com potencialidades ornamental, medicinal e alimentar (FRANZON *et al.*, 2009). Nesse conjunto se encontram os araçazeiros, com destaque especial para o Araçá vermelho. A espécie ainda não teve seu potencial devidamente explorado. Seus frutos muito apreciados pelas populações locais podem ser consumidos *in*

natura, também servem para o preparo de diversos tipos de doces, sucos e licores (OLIVEIRA, 2011).

O sistema de produção de frutíferas nativas ainda carece de estudos, principalmente se considerarmos os primeiros anos de cultivo, já que essas plantas têm desenvolvimento lento e muitas vezes são produzidas através de sementes o que pode delongar ainda mais a produção, dificultando a comercialização das frutas (GOMES; GOMES; CUNHA, 2011).

3.3 IMPORTÂNCIA DA BIOLOGIA MOLECULAR PARA O MELHORAMENTO GENÉTICO DO ARAÇÁ

O cultivo comercial muitas vezes depende da pesquisa, pois é dela que provém dados com relação ao cultivo das plantas, como; espaçamento, adubação e a escolha da cultivar ideal para cada região e é por meio de estudos que é possível prever cruzamentos para a melhoria da espécie (AMABILE; VILELA; PEIXOTO, 2018).

Estudos de variabilidade genética entre gêneros da família Myrtaceae possibilitaram o encontro de compatibilidade para enxertia nas espécies de *Psidium* (HARTMAN *et al.*, 1997). Esses estudos fornecem informações que auxiliam, não somente na escolha de genótipos para cruzamentos, como também na busca por materiais resistentes, onde os pontos mais importantes, são resistência a pragas e doenças (SOUZA *et al.*, 2009).

Os programas de melhoramento genético das espécies passam pela busca de genótipos promissores. Com essa finalidade, Gomes Filho *et al.* (2010) avaliou a diversidade genética existente entre acessos de goiabeiras, via marcadores moleculares RAPD e descritores morfológicos. Ao compará-los, os dados moleculares promoveram a formação de 12 grupos, enquanto os morfológicos subdividiram os materiais em apenas seis grupos, confirmando que os marcadores moleculares são mais efetivos que os morfológicos.

As análises moleculares tem sido uma importante ferramenta para o melhoramento genético e na caracterização e conservação de material genético. Em seu trabalho Corrêa *et al.* (2011) estudou a variabilidade genética de acessos de

goiabeiras e araçazeiros com base no marcador AFLP, confirmando que os acessos de *Psidium* avaliados apresentaram alta variabilidade genética.

Além dessas, outras possibilidades de uso para espécies de *Psidium* são conhecidas como alternativa para superar os problemas causados por nematóides em cultivos de goiabeira (BRITO, 2015; SIQUEIRA *et al*, 2009). Danos severos em cultivos comerciais de goiabeira (*P. guajava* L.) vêm sendo causados pelo nematóide *Meloidogyne mayaguensis* em alguns estados do Brasil. Nesse sentido, espécies de araçás nativos podem ser utilizadas como porta-enxertos, necessitando de maiores estudos visando encontrar espécies resistentes ao nematóide e compatíveis para a realização da enxertia, o que é de fundamental importância para viabilizar o seu uso como alternativa no controle do nematoide (SIQUEIRA *et al*, 2009).

As pesquisas voltadas aos estudos moleculares para a espécie, fornecem uma boa base para o desenvolvimento de programas de melhoramento, auxiliando na conservação da espécie e seleção de genótipos superiores.

3.4 PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA *PSIDIUM*

O ajuste das técnicas de extração de DNA possibilita melhoras nas técnicas de biologia molecular. Os objetivos dos protocolos de extração é garantir uma obtenção de DNA de alta qualidade, de forma rápida e eficiente. Há muitos princípios que norteiam a extração, como o rendimento, tempo de execução, relação custo/benefício e a qualidade do DNA obtido. (WATSON, 2005).

Uma extração de DNA bem realizada trará resultados satisfatórios na PCR, o que torna fundamental que o DNA esteja purificado e livre de organelas celulares e proteínas. O objetivo pode ser alcançado tanto por meio de kits comerciais de extração de ácidos nucleicos, quanto por técnicas desenvolvidas em laboratório, denominadas *in house* (SILVA, 2017).

A lise e a purificação são etapas fundamentais durante a extração, pelo fato do material se encontrar protegido por estruturas biológicas como proteínas e lipídeos de membrana há dificuldades durante a liberação desse material, nesse caso são usados agentes químicos para a quebra ser feita (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Após a lise celular, ocorre a purificação, que é a separação do DNA dos componentes celulares liberados. Essa separação pode ser realizada por vários procedimentos; entre os mais

difundidos está à utilização de fenol/clorofórmio e da enzima Proteinase K (RAMOS *et al.*, 2015).

Fica claro, porém, que, o emprego de um determinado protocolo não segue um critério de escolha claramente definido e o que é válido para uma espécie nem sempre pode ser aplicado em outra (ZORZETTO *et al.*, 2015). Geralmente algumas mudanças nos protocolos se fazem necessárias dependendo da espécie em estudo. No entanto, esse perfil é parcialmente distinto no que se refere aos kits comercializados, onde na maioria das vezes o fabricante fornece indicações da amostra biológica para o qual ele é recomendado (PEREIRA; MONTEIRO, 2015).

Os Kits comerciais de extração de DNA são cada vez mais comuns em laboratórios por serem práticos e rápidos, mas muitas vezes não são eficientes e precisos, além de serem mais custosos (SILVA, 2017).

A maioria dos protocolos de extração apresentam um agente tamponante que mantém o pH em torno de 8, onde sua composição é a diferença fundamental entre os protocolos, um sal que degrada as proteínas e neutraliza a carga negativa e a dissociação das membranas é feito pelo detergente (ROSA, 2008).

O DNA é insolúvel em álcool então o mais comum a ser usado para o momento da precipitação é o etanol ou o isopropanol, mas pouco se sabe sobre as diferenças qualitativas quando se substitui esses reagentes (BONATTO & MEGIOLARO, 2012).

Geralmente, o método de extração mais comumente usados para as espécies do gênero *Psidium* é o CTAB (brometo de cetil trimetil amônio) descrito por DOYLE & DOYLE (1987). Este detergente promove a quebra da membrana, forma um complexo com o DNA e promove a precipitação subsequente (WEISING *et al.*, 1995).

3.5 RISCOS NO USO DE SUBSTÂNCIAS NOS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO

Os métodos tradicionais com proteinase K e fenol/clorofórmio têm sido amplamente utilizados e geralmente obtêm bons resultados, mas apresentam desvantagens devido à sua toxicidade ambiental e riscos operacionais (BAREA; PARDINI; GUSHIKEN, 2004).

Muitos protocolos vêm sendo modificados buscando melhoras nas técnicas de extração, bem como a diminuição dos riscos com relação ao manuseio de materiais

tóxicos. Substâncias como o fenol, devem ser abstraídas de protocolos de extração uma vez que são caras, tóxicas e corrosivas, pode causar queimaduras se inalada ou absorvida pela pele, além de potencialmente fatal se ingerida. (OLIVEIRA; CARVALHO; CARVALHO, 2012).

A maioria dos protocolos de extração de DNA, tem feito o uso de fenol/clorofórmio e estes reagentes apesar de proporcionarem uma boa qualidade do material extraído, apresentam grande toxicidade para quem manipula e para o meio ambiente (BAREA; PARDINI; GUSHIKEN, 2004; ABRÃO *et al.*, 2005). Uma alternativa para esses materiais é o uso de uma solução salina (MEDRANO; AASEN; SHARROW, 1990).

O araçá é uma planta rica em compostos fenólicos, terpenos, polissacarídeos e metabólitos secundários nas folhas e frutos (SANDRI *et al.*, 2014; SOLIMAN *et al.*, 2016; KOSMALA *et al.*, 2010; MULLER *et al.*, 2012) o que muitas vezes pode dificultar na obtenção de DNA puro, íntegro e em boa quantidade para análises moleculares (SOUZA *et al.*, 2012). Os polissacarídeos inibem a ação de enzimas de restrição e tornam a amostra de DNA excessivamente viscosa, interferindo na migração do DNA em corridas eletroforéticas (ROMANO; BRASILEIRO, 1999).

Os compostos fenólicos derivados do metabolismo secundário das plantas são essenciais para o crescimento e a reprodução, mas também respondem a condições de estresse, infecções e lesões provocados na planta (NACZK, SHAHIDI, 2004). Tais compostos oxidam o DNA, deixando as amostras escuras, reduzindo a sua vida útil e tornando-as impróprias para análises moleculares (SAHU; THANGARAJ; KATHIRESAN, 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Reprodução Animal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos (UTFPR - DV). Foram utilizadas trinta amostras de folhas de araçazeiro vermelho, vinte coletadas no interior do Câmpus Dois Vizinhos e dez no município de Verê, Paraná.

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO TOTAL

A extração de DNA foi realizada com Kits comerciais, “Wizard genomic DNA Purification kit” (Promega). Os protocolos foram testados e alterados até gerarem material de qualidade.

4.2.1 Protocolo de extração de folhas frescas

Para a padronização do protocolo para a espécie *P. Cattleyanum* SABINE foram primeiramente maceradas as folhas jovens em um cadinho com 1000 µl de *Cel Lysis Solution* até homogeneizar, adicionando mais 1000 *Cel Lysis Solution*, após misturar bem o conteúdo adicionou-se 300µl em cada eppendorf de 2 ml do homogeneizado mais 500 µl de *Cel Lysis Solution*, em seguida adicionou-se 600 µl de *Nuclei Solution* e foi levado ao vortex (modelo XH-C *Global Trade Technology*) 1-3 segundos para homogeneizar. Na sequência as amostras foram incubadas 65°C por 15 minutos em banho maria (equipamento *SolidSteel*), após o tempo de incubação foi adicionado 3µl de *RNAse Solution* e incubado por mais 15 minutos na temperatura de 37°C em banho maria (equipamento *SolidSteel*), em seguida foi deixado 5 minutos na temperatura ambiente antes de prosseguir a extração. Passado o tempo foi adicionado 200 µl de *Protein Precipitation Solution*, e levado ao vortex por 20 segundos, e posteriormente foi centrifugado por 5 minutos de 13.000- 16.000xg. onde as proteínas precipitadas formam um pelet e cuidadosamente com o auxílio de uma micropipeta foi

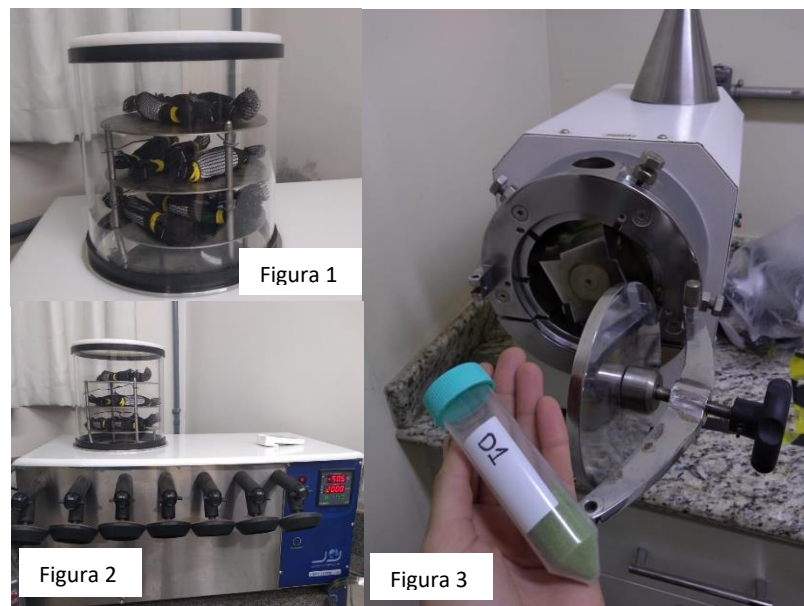
removido 200 µl do sobrenadante contendo o DNA e este sobrenadante foi transferido para um tubo 1,5 ml contendo 600 µl de isopropanol (*Biotec Reagentes Analíticos*) a temperatura ambiente, gentilmente foram invertidos os tubos até os filamentos de DNA formarem uma massa visível, em seguida foram centrifugadas a 13.000-16.000xg. por 2 minutos e descartado o sobrenadante, adicionando 600 µl de etanol absoluto (*Biotec Reagentes Analíticos*) e invertido o tubo várias vezes para que o DNA possa ser bem lavado, após o procedimento foi levado a centrifuga 13.000-16.000xg. por 1 minuto, em seguida foi aspirado com uma micropipeta e invertido o tubo sobre um papel absorvente limpo e deixado secar por 1 hora, por fim foram adicionados 100 µl de *DNA Rehydration Solution* e levado a geladeira por 1 dia e em seguida estocado na temperatura de -20°C.

4.2.2 Protocolo de extração com material conservado em nitrogênio líquido e liofilizado

Foram coletadas dez folhas de dez matrizes colocadas em caixa de isopor contendo nitrogênio líquido. As folhas foram armazenadas por dois dias no refrigerador e em seguida liofilizadas. Após três dias no liofilizador (marca JJ científica) as amostras foram moídas e armazenadas em tubo falcon.

Para a extração foram utilizadas 0,04g de folhas moídas que foram colocadas em tubo graduado de 1,5ml. Em seguida foram adicionados 600 µl de *Nuclei Lysis Solution* em seguidas homogeneizadas em Vortex por trinta segundos e incubadas a 65°C por 15 minutos em banho maria (equipamento *SolidSteel*). Após o tempo de incubação foi adicionado 3µl de *RNAse Solution* no tecido celular e incubado por mais 15 minutos na temperatura de 37°C, em seguida foi deixado 5 minutos na temperatura ambiente antes de prosseguir a extração. Passado o tempo foi adicionado 200 µl de *Protein Precipitation Solution*, e levado ao vortex por 20 segundos. Posteriormente foi centrifugado por 5 minutos de 13.000- 16.000xg, onde as proteínas precipitadas formam um *pelet*, cuidadosamente foi removido 200 µl do sobrenadante contendo o DNA com o auxílio de uma micropipeta e este conteúdo foi transferido para um novo tubo graduado livre de DNase e RNAse de 1,5 uL contendo 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente. Gentilmente foram invertidos os tubos até os filamentos de DNA formarem uma massa visível, em seguida foram centrifugadas a 13.000-

16.000xg. por 2 minutos e descartado o sobrenadante, adicionando 600 µl de etanol absoluto e invertido o tubo várias vezes para que o *DNA* possa ser bem lavado. Após o procedimento anterior, foi levado a centrifuga em uma rotação de 13.000-16.000xg. por 1 minuto, em seguida foi aspirado com uma micropipeta e invertido o tubo sobre um papel absorvente limpo e deixado secar por 1 hora, por fim foram adicionados 100 µl de *DNA Rehydration Solution* e levado a geladeira por 1 dia e em seguida estocado na temperatura de -20°C.



Figuras 1 e 2: amostras de folhas de Aracá vermelho em liofilizador. Figura 3: amostras sendo moídas e armazenadas em tubo falcon.

Fonte: O autor (2019).

4.2.3 Protocolo de extração com material conservado em nitrogênio líquido liofilizado extraído com Proteínase K

Para esse protocolo houve mudanças no início da extração. Para a extração foram utilizadas 0,04g de folhas moídas que foram colocadas em tubo graduado de 1,5ml. Depois de colocado 600 µl de *Nuclei Lysis Solution* foram adicionados 17,5 µL de proteinase K e incubados a 65°C. Foram testados dois tempos de incubação em banho-maria, 30 e 60 minutos. Os passos seguintes foram mantidos os mesmos do protocolo anterior.

4.3 ANÁLISES DA EXTRAÇÃO

O DNA extraído foi submetido a eletroforese, juntamente com 2 μ L de Stop. O gel foi corado com solução de GelRed contendo 0,3 μ g/ML. Foi usado gel de agarose a 1% com tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1mM). As bandas de DNA separadas por eletroforese foram visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta utilizando o programa LPix Image STi.

Para amplificação do DNA pela técnica da PCR, utilizou-se o marcador descrito por RISTERUCCI *et al*, (2005) mPgCIR21 (F: TGCCCTTCTAAGTATAACAG R: AGCTACAAACCTTCCTAAA) e programa *touchdown* no termociclador (*SureCycler 8800 Agilent Technologies*). Usou-se os seguintes ciclos de temperatura: 95 °C/45 seg. (desnaturação); 55 °C/60 seg. (anelamento) no período de 30 ciclos; e 72 °C/60 seg. (extensão).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO COM FOLHAS NATURAIS

O protocolo original do Kit de extração foi testado e não obtivemos resultado, dessa forma foram realizadas alterações. As mudanças foram satisfatórias e apresentaram no gel de agarose uma banda completa.

A otimização dos protocolos de extração se faz necessária, pois muitas vezes a obtenção de quantidades razoáveis de DNA, nem sempre resultam em uma extração de qualidade e contém muitos restos celulares (membranas, lipídeos, etc.), o que pode comprometer o resultado das análises moleculares como é o caso da PCR (VIEIRA, 2019).

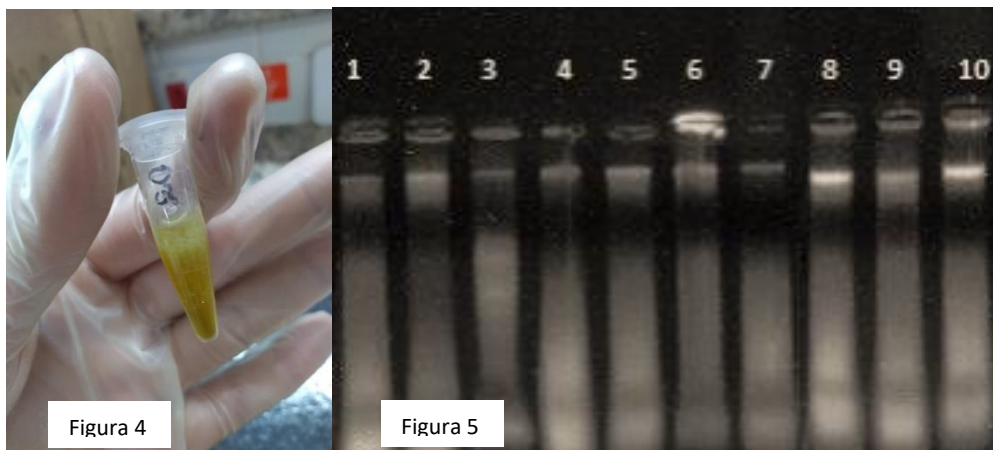


Figura 4: Eppendorf com amostra de DNA após passar por lavagem com etanol. Figura 5: imagem de eletroforese obtida através de extração de amostras naturais.

Fonte: O autor (2020)

A eletroforese indica que pode ter havido contaminação por polissacarídeos no DNA extraído pelo método usando folhas frescas. As bandas ao apresentaram forma cônica em direção ao polo positivo ou muito DNA retido no poço do gel, indica contaminação por polissacarídeos (ROMANO; BRASILEIRO, 1999).

Existem vários métodos de purificação de DNA, mas ainda existem problemas, como contaminação de DNA estranho, inibidores de PCR e sensibilidade de moléculas de DNA, que irão promover sua decomposição (COELHO *et al*, 2004). Na figura 4 podemos ver que a amostra apresenta certa viscosidade. Algumas mudanças

podem ser feitas no protocolo, como fazer mais uma lavagem com álcool visando a obtenção de um DNA mais purificado. Nunes *et al.* (2017) indica que se façam duas lavagens com etanol 70% a fim de obter um material genético com quantidade e qualidade.

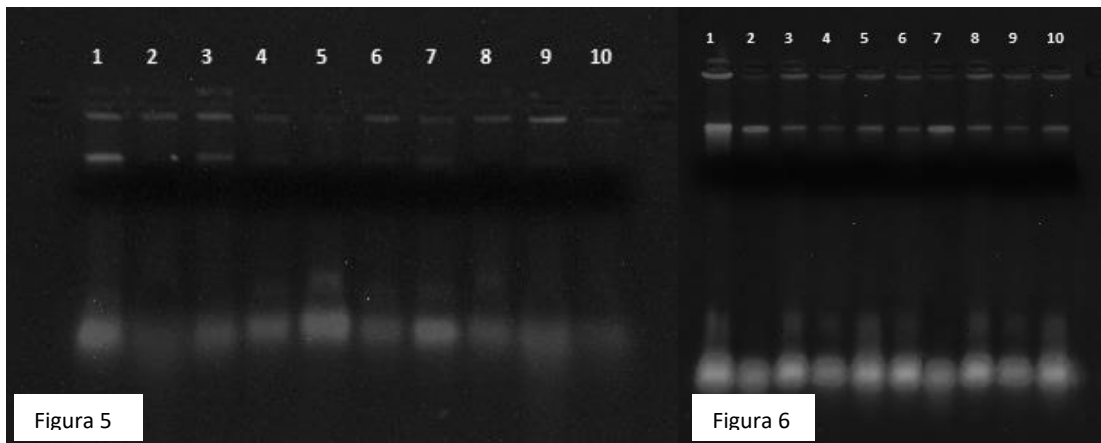
5.2 EXTRAÇÃO COM PROTEINASE K

A utilização de proteinase K no processo de desproteíntização influenciou positivamente na integridade e na qualidade do DNA. Foram testados dois tempos diferentes para a extração, trinta e sessenta minutos (Figuras 5 e 6). A diferença se deve ao tempo necessário para a digestão com Proteinase K. Santos *et al.* (2013) avaliou protocolos de extração de DNA bovino com proteinase K, e concluiu que a qualidade do DNA é suscetível a concentração de proteinase K e ao tempo no banho-maria.

Alguns problemas podem ocorrer durante a extração com o método CTAB. Quando aplicado a tecidos maduros os polissacarídeos podem se co-precipitar com o DNA após a adição do álcool durante a extração e isso pode levar à obtenção de um produto final viscoso e incerto para as reações de PCR (SHARMA *et al.*, 2002). Os polissacarídeos interferem na qualidade do DNA e os protocolos usuais nem sempre removem completamente os polissacarídeos (DESHMUKH *et al.*, 2007).

Tecidos foliares maduros de diversas espécies de plantas contêm polissacarídeos polifenóis envolvidos na defesa contra herbivoria doenças patogênicas (HARBONE *et al.*, 1991), os quais podem interferir nos procedimentos de extração de DNA.

Outra problemática enfrentada durante a extração de DNA é a oxidação das amostras devido principalmente a presença de polifenóis que estão presentes em muitas espécies de plantas, reduzindo o rendimento e a qualidade de DNA extraído (LOOMIS, 1974; POREBSKI *et al.*, 1997). A dificuldade em isolar o DNA vegetal torna a pureza das amostras muito baixas.



Figuras 5 e 6: Imagens de eletroforese do protocolo com Proteinase K utilizando diferentes tempos de banho-maria (30 minutos e 60 minutos).

Fonte: O autor (2020)

Devido a isso, algumas mudanças nos protocolos se fazem necessárias. Buscando uma maior digestão de proteínas que podem ser prejudiciais para a extração foi testado o uso da enzima proteinase K.

Na maioria dos protocolos para a família Myrtaceae a adição de proteinase K afeta negativamente o resultado da extração, produzindo bandas de má qualidade e degradando algumas amostras (SHI *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2013). Nesse protocolo pode-se perceber que o processo de extração pode ser afetado pelo tempo de incubação em banho-maria.

5.3 EXTRAÇÃO COM FOLHAS LIOFILIZADAS

A extração de amostras naturais foi satisfatória e ao se realizar a PCR para comprovar a qualidade da extração foram testadas duas quantidades diferentes, uma de 3 μ L e outra de 5 μ L. A quantidade de DNA molde deve ser adequada às condições da reação. A amplificação de diferentes genes geralmente exige otimização e padronização das quantidades adequadas de DNA requeridas nas análises moleculares (SHEIKH & LAZARUS, 1997).

Em trabalhos relacionados a extração de DNA a partir de tecido foliar, os autores aconselham que sejam priorizadas folhas jovens, tenras e com bom aspecto

físico, a fim de, evitar a maiores concentrações de fenóis e polissacarídeos, que interferem negativamente no processo de isolamento do DNA (MITTON *et al.*, 1979).

Para uso no protocolo com amostras liofilizadas, foram escolhidas folhas sem danos físicos. Mesmo com os devidos cuidados de coleta e armazenamento, em algumas amostras não foi possível realizar a extração.

Um método semelhante de extração foi descrito por Mazza e Bittencourt (2000), otimizado para *A. angustifolia* este protocolo apresenta uma etapa de liofilização do material por um período de 72 horas, o que pode ser um problema, uma vez que estudos da diversidade genética de populações naturais utilizam-se de um grande número de plantas amostradas, um protocolo de extração que proporcione uma rápida obtenção de DNA é desejável, para a otimização do processo de análise.

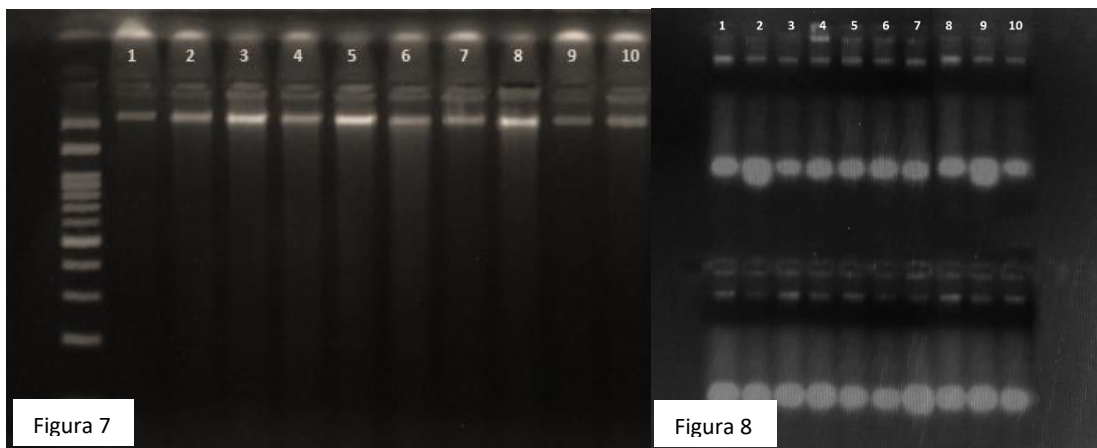


Figura 7: imagem de eletroforese com amostras liofilizadas de Araçá vermelho.

Figura 8: imagem de eletroforese de PCR utilizando duas quantidades diferentes de DNA; 3 e 4 μ L de DNA.

Fonte: O autor (2020).

Em seu trabalho FREITAS-LIDANI *et al.* (2019) concluiu que menores quantidades de DNA genômico isoladas a partir de microbiota ruminal geraram um produto amplificado de interesse com maior especificidade e intensidade de sinal em comparação a ausência ou baixa eficiência de amplificação, quando empregadas quantidades de DNA genômico estabelecidas nos protocolos convencionais.

O processo de liofilização pode ser positivo quando buscamos conservar as amostras para uso superior. Essa prática é comum para conservação de materiais de plantas, mas como a grande maioria, no momento da extração o método mais escolhido é o CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987) e geralmente usa-se amostras naturais. Por ser pouco seguro a busca por alternativas é necessária.

5.4 EXTRAÇÃO DE FOLHAS LIOFILIZADAS COLETADAS EM PLANTAS NO MUNICÍPIO DE VERÊ, PARANÁ

A extração dos materiais coletados no município de Verê não foi eficiente para a maioria das dez amostras. Isso pode ter ocorrido devido a diferença de compostos fenólicos nas amostras. As espécies do gênero *Psidium* são compostas por grande quantidade de metabólitos secundários (SANDRI *et al.*, 2014).

A concentração de compostos fenólicos pode variar de acordo com os tecidos vegetais, a idade e o tamanho da planta, a época e parte da planta coletada e, ainda, o ambiente onde é realizada a coleta para a extração de DNA (MONTEIRO *et al.*, 2005). Outro fator determinante são os níveis de poluição atmosférica que também podem interferir nos compostos fenólicos das folhas, uma diminuição nesses compostos pode ser devido à baixa absorção de carbono (MONTEIRO *et al.*, 2005).

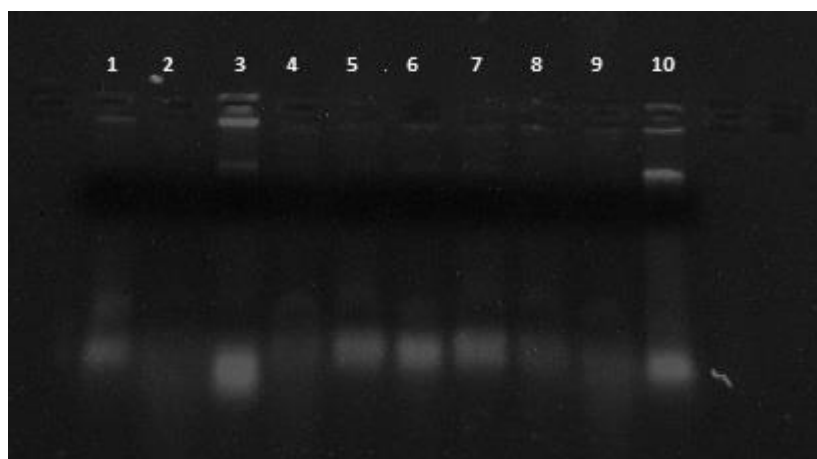


Figura 9: imagem de eletroforese de extração de DNA das amostras coletas no município de Verê, Paraná.

Fonte: O autor (2020).

Para Lewis (1972) e Taiz e Zeiger (2006) os diferentes tipos de ambientes podem afetar nas características de uma planta, tais condições envolvem intensidade luminosa, temperaturas altas, tipos de solos como os arenosos ou bem drenados e disponibilidade de água no solo. Ao se desenvolverem em solos com condições adversas os tecidos foliares apresentam alta concentração de compostos fenólicos nos tecidos foliares (TURNER, 2001).

Como já foi abordado, o conteúdo de polissacarídeos, polifenóis e outros metabólitos secundários nos tecidos foliares das plantas é diferente (SHARMA *et al.*, 2002). E isso representa o principal problema encontrado na purificação do DNA de plantas.

6. CONCLUSÕES

Os três protocolos geraram pellet de DNA ao final da extração, entretanto o protocolo com Proteinase K não apresentou bom resultado quanto ao tempo de banho-maria quando testado o tempo de trinta minutos. Nesse caso o mais indicado é deixar sessenta minutos incubado em banho-maria. Seu uso se faz necessário em algumas amostras que apresentam componentes que atrapalham a extração.

A liofilização do material garante a conservação dele por mais tempo podendo ser usado a longo prazo se bem conservado.

A extração de DNA com folhas naturais é o mais indicado por ser mais o rápido de ser realizado. Nesse protocolo elimina-se o tempo de três dias de liofilização e o processo de moer as amostras de folhas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMABILE, R. F.; VILELA, M. S.; PEIXOTO, J. R. **Melhoramento de plantas: variabilidade genética, ferramentas e mercado**. SBMP Brasília, Distrito Federal 2018.

AQUINO, F.G.; WALTER, B.M.T. & RIBEIRO, J.F. **Espécies Vegetais de Uso Múltiplo em Reservas Legais de Cerrado - Balsas, MA**. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, 2007.

BARATTO, C.M. & MEGIOLARO, F. **Comparação de diferentes protocolos de extração de dna de bactérias para utilização em RAPD-PCR**. Unoesc & Ciência, 2012.

BAUER, D.; MÜLER, A.; GOETZ, M.N.B.; SCHMITT, J.L. **Fenologia de Ocotea pulchella, Myrcia brasiliensis e Psidium cattleyanum, em floresta semidecídua do sul do Brasil**. Floresta, Curitiba, v. 44, 2014.

BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; SILVA JUNIOR, J. F.; PROENÇA **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006.

BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. 2. ed. Universidade Federal de Viçosa, 1998.

BRITO, Rosemary Cordeiro Tôrres. **Recuperação de área degradada por mineração a partir do uso de seu rejeito**. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

COELHO, E.G.A. *et al.* **Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pêlos e entre técnicas de extração.**

Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., Belo Horizonte, 2004. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352004000100017&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 11 de novembro 2020.

CORRÊA *et al.* **Similaridade genética entre acessos de goiabeiras e araçazeiros baseada em marcadores moleculares AFLP.** Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, 2011.

COUTINHO, E.F.; MIELKE, M.S.; ROCHA, M.S.; DUARTE, OR. **Enraizamento de estacas semi-lenhosas de fruteiras nativas da família Mirtaceae com o uso do ácido indolbutírico.** Revista Brasileira de Fruticultura, 1991.

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; SASSO, S. A. Z.; SACHET, M. R. 2010. AMBRÓSIO, R. **Fenologia da floração e frutificação de mirtáceas nativas da floresta com Araucária.** Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.32, 2009.

DA SILVA, L. E, DOS SANTOS SILVA, D. B., CRISPIM, B. A., VAINI, J. O.; GRISOLIA, A. B.; SENO, L. O.; **Variação de concentração de proteinase k em protocolos de extração de dna de bovino.** Archives of Veterinary Science, 2013. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/26151>>. Acesso em: 21 nov. 2020. doi:<http://dx.doi.org/10.5380/avs.v18i2.26151>.

DESHMUKH, V. P. **A simple method for isolation of genomic DNA from fresh and dry leaves of Terminalia arjuna (Roxb.) Wight and Argot.** Electronic Journal of Biotechnology, v.10, 2007.

DIAS, B. F. de S. **A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades.** Disponível em:

<<http://www.iea.usp.br/publicacoes/textos/a-implementacao-da-convencao-sobre->

[diversidade-biologica-no-brasil-desafios-e-oportunidades>](#). Acesso em: 15 out. 2018, 17:35:05.

DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. Focus 12:13-15. 1987.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R.L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: Universitária, 1994.

FEHR, W. R. **Principles of cultivar development**. New York: Macmillan, 1987.

FRANZON, R. **Frutíferas nativas do Sul do Brasil**. In: Simpósio Nacional do morango, 2.; Encontro de pequenas frutas e frutas nativas do Mercosul, 1., Pelotas, RS. Anais. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004.

FRANZON, R. C.; CAMPOS, L. Z. de O.; PROENÇA, C. E. B.; SOUSA-SILVA, J. C.: **Araças do gênero psidium: Principais espécies, ocorrência, descrição e usos**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2009.

FRANZON, R. C.; SOUZA-SILVA, J. C. **Araçá: Psidium spp**. Argentina: IICA/PROCISUR. Na publicação: Cezar Rodrigo Franzon. Editores técnicos: Marília Lobo Burle e Fábio Gelape Faleiro. Biblioteca(s): Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2017.

GOMES FILHO, Aroldo *et al.* **Marcadores moleculares RAPD e descritores morfológicos na avaliação da diversidade genética de goiabeiras (*Psidium guajava L.*)**. Acta Sci., Agron. (Online), Maringá, 2010. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-86212010000400009&lng=en&nrm=iso. Acesso em 25 de novembro de 2020.

GOMES, G. C.; GOMES, J. C. C.; CUNHA, L. F. **Produtividade do araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* L.) em pomar de seis anos sob manejo ecológico**. 2011 Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/47605/1/030.pdf> Acesso em: 12 de out. 2020.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. **Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil**. Revista Brasileira de Botânica, 2006.

HARBONE, J. B.; PALO, R. T.; ROBBINS, C. T. **Plant defenses against mammalian herbivore**. Boca Raton: CRC Press LLC, 1991.

KOSMALA, M. **Co-products of black-currant and apple juice production: Hydration properties and polysaccharide composition**. LWT - Food Science and Technology, v. 43, pág. 173–180, 2010.

LANDRUM, L.R. & KAWASAKI, M.L. **The genera of Myrtaceae in Brazil – an illustrated synoptic treatment and identification keys**. Brittonia, 1997.

LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T. SCHUSTER, I. **Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético**. Biotecnologia, 2000.

LEWIS, M. G. **The physiological significance of variation in leaf structure**. Science Progress, Northwood, 1972.

LOOMIS, M. D. **Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles.** *Methods Enzymology*, v.31, 1974.

MAZZA, M. C. M.; BITTENCOURT, J. V. M. **Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae).** *Boletim de Pesquisas Florestais Colombo*, 2000.

MITTON, J.B.; LINHART, Y.B.; STURGEON, K.B.; HAMRICK, J.L. **Allozyme polymorphism detected in mature needle tissue of Ponderosa pine.** *Journal of Heredity*, v.70, 1979.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P. DE, ARAÚJO.; LIMA, E. & AMORIM, ELBA L C DE. **Taninos: uma abordagem da química à ecologia.** *Química Nova*, 2005.

SANDRI, Ivana G. *et al.* **Application of enzymatic preparations to produce araçá pulp and juice.** *Food Science and Technology, Campinas*, v. 34, 2014.

OLIVEIRA, D. L. **Viabilidade econômica de algumas espécies medicinais nativas do cerrado.** *Goiânia*, v. 38, 2011.

OLIVEIRA, J. S. F; CARVALHO, K. B. A.; CARVALHO, E, A. **Protocolo modificado para extração de DNA do gênero *Pestalotiopsis*.** II Congresso Brasileiro de Recursos Genético. Belém, Pará, 2012.

PIO CÔRREA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1984.

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, 1997.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. dos; PINTO, C.A.B.P. **Genética na Agropecuária, Lavras.** Ed UFLA., 2008.

RASEIRA, M. do C. B.; RASEIRA, A. **Contribuição ao estudo do araçazeiro, *Psidium cattleianum*.** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 1996.

RISTERUCCI, A. M.; DUVAL, M. F.; ROHDE, W. and BILLOTTE, N. **Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L.** CIRAD (Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement), UMR 1096 Polymorphismes d'Intérêt Agronomique, Avenue Agropolis, Montpellier Cedex 5, France, MPIZ (Max-Planck-Institut für Zuechtungsforschung), Carl-von-Linne-Weg 10 D 50829 Köln, Germany, 2005.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. **Extração de DNA de plantas.** *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n.2, 1999.

ROSA, D. D. **Método rápido de extração de DNA de bactérias.** *Summa phytopathol.* 2008.

SANCHOTENE, M. C. C. **Fruteiras nativas úteis a fauna na arborização urbana.** 2 ed. Porto Alegre: Sagra. 1989.

SANTOS, M. S.; PETKOWICZ, C. L. O.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; CARNEIRO, E. B. B. **Caracterização do suco de araçá vermelho (*Psidium***

cattleianum Sabine) extraído mecanicamente e tratado enzimaticamente. Acta Sci. Agron. Maringá, v. 29, 2007.

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, 2002.

SHEIKH SN, LAZARUS L. **Reusable DNA template for the polymerase chain reaction (PCR).** Nucleic Acids Research, 1997.

SHI, S. R.; DATAR, R; LIU, C; WU, L; ZHANG, Z.; COTE, R. J.; TAYLOR, C. R. **DNA extraction from archival formalina-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution.** Histochem cell Biology, 2004.

SILVA; A. O. **Avaliação de protocolos de extração e purificação de DNA alvo da reação em cadeia da polimerase na detecção de Leishmania (Viannia) spp.** Dissertação de mestrado. Recife, 2017.

SILVA, L. A.; SILVA, D. B. S.; CRISPIM, B. A.; VAINI, J. O.; GRISOLIA, A. B.; SENO, L. O. **Variação de concentração de proteinase k em protocolos de extração de DNA de bovino.** Archives of Veterinary Science, V18, 2013.

SIQUEIRA, K M.S. DE, FREITAS, V M., ALMEIDA, SANTOS, MARCILENE F.A. DOS, CARES, JUVENIL A., TIGANO, MYRIAN S., & CARNEIRO, REGINA M.D.G.. **Deteção de Meloidogyne mayaguensis em goiabeira e mamoeiro no estado de Goiás, usando marcadores moleculares.** Tropical Plant Pathology, 2009.

SOLIMAN, F.M.; FATHY, M.M.; SALAMA, M.M.; SABER, F.R. **Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of Psidium guajava L. and**

Psidium cattleianum Sabine leaves. Bulletin of Faculty of Pharmacy Cairo University. 2016.

SOUZA, H.A.V.; MULLER, L.A.C.; BRANDÃO, R.L.; LOVATO, M.B. **Isolation of highquality and polysaccharide-free DNA from leaves of Dimorphandra mollis (Leguminosae), a tree from the Brazilian Cerrado.** Genetics and Molecular Research, v. 11, 2012.

SOUZA, A. G.; RESENDE, L. V.; LIMA, I. P.; SANTOS, R. M.; CHALFUN, N. N. J. **Variabilidade genética de acessos de araçazeiro e goiabeira suscetíveis e resistentes a *Meloidogyne enterolobii*.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 44, n. 5, p. 822–829, 2014.

SOUZA, *et al.* **Ao analisar materiais resistentes alguns pontos são importantes, como resistência a pragas e doenças.** Cruz das Almas, BA, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 3. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

TAMARI, F.; HINKLEY, C.S.; RAMPRASHAD, N. **A comparison of DNA extraction methods using *Petunia hybrida* tissues.** Journal of Biomolecular Techniques, v. 24, 2013.

TURNER, I. M. **The ecology of trees in the tropical rain forest.** Cambridge: Cambridge University, 2001.

WEISING K, NYBOM H, WOLFF K, MEYER W. **DNA fingerprinting in plants and fungi.** CRC Press, Boca Raton, 1995.

ANEXO A - Protocolo de extração de folhas frescas

1. Macerar as folhas jovens em um cadinho com 1000 µl de *Cel Lysis Solution* até homogeneizar;
2. Adicionar mais 1000 µl *Cel Lysis Solution*, após misturar bem o conteúdo adicionar 300µl em cada eppendorf de 2 ml do homogeneizado mais 500 µl de *Cel Lysis Solution*;
3. Adicionar 600 µl de *Nuclei Solution* e levar ao vortex por 30 segundos para homogeneizar. Na sequência incubar à 65°C por 15 minutos em banho-maria;
4. Após o tempo de incubação adicionar 3µl de *RNAse Solution* e incubar por mais 15 minutos na temperatura de 37°C em banho-maria, em seguida deixar 5 minutos na temperatura ambiente antes de prosseguir a extração.
5. Passado o tempo adicionar 200 µl de *Protein Precipitation Solution*, e levar ao vortex por 20 segundos, e posteriormente centrifugar por 5 minutos de 13.000-16.000xg;
6. As proteínas precipitadas formam um pelet e cuidadosamente com o auxílio de uma micropipeta devem ser removidos 200 µl do sobrenadante contendo o DNA e este sobrenadante ser transferido para um tubo 1,5 ml contendo 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente, gentilmente foram invertidos os tubos até os filamentos de DNA formarem uma massa visível;
7. Em seguida centrifugar a 13.000-16.000xg. por 2 minutos e descartar o sobrenadante, adicionando 600 µl de etanol absoluto e inverter o tubo várias vezes para que o DNA possa ser bem lavado, após o procedimento levar a centrifuga 13.000-16.000xg. por 15 minutos, em seguida aspirar com uma micropipeta e inverter o tubo sobre um papel absorvente limpo e deixado secar por 15 minutos;
8. Por fim adicionar 100 µl de *DNA Rehydration Solution* e levar a geladeira por 1 dia e em seguida estocar na temperatura de -20°C.

ANEXO B - Protocolo de extração de material conservado em nitrogênio líquido e liofilizado

1. Para a extração utilizar 0,04g do pó que foi macerado e colocar em tubo graduado de 1,5ml. Em seguida adicionar 600 µl de *Nuclei Lysis Solution* e homogeneizar em Vortex por trinta segundos. Na sequência incubar à 65°C por 15 minutos em banho-maria;
2. Após o tempo de incubação adicionar 3µl de *RNAse Solution* e incubar por mais 15 minutos na temperatura de 37°C em banho-maria, em seguida deixar 5 minutos na temperatura ambiente antes de prosseguir a extração.
3. Passado o tempo adicionar 200 µl de *Protein Precipitation Solution*, e levar ao vortex por 20 segundos, e posteriormente centrifugar por 5 minutos de 13.000-16.000xg;
4. As proteínas precipitadas formam um pelet e cuidadosamente com o auxílio de uma micropipeta devem ser removidos 200 µl do sobrenadante contendo o DNA e este sobrenadante ser transferido para um tubo 1,5 ml contendo 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente, gentilmente foram invertidos os tubos até os filamentos de DNA formarem uma massa visível;
5. Em seguida centrifugar a 13.000-16.000xg. por 2 minutos e descartar o sobrenadante, adicionando 600 µl de etanol absoluto e inverter o tubo várias vezes para que o DNA possa ser bem lavado, após o procedimento levar a centrifuga 13.000-16.000xg. por 15 minutos, em seguida aspirar com uma micropipeta e inverter o tubo sobre um papel absorvente limpo e deixado secar por 15 minutos;
6. Por fim adicionar 100 µl de *DNA Rehydration Solution* e deixar a temperatura ambiente por 1 dia e em seguida estocar na temperatura de -20°C.

ANEXO C - Protocolo de extração com material conservado em nitrogênio líquido liofilizado extraído com Proteínase K

1. Para a extração utilizar 0,04g de folhas moídas e colocá-las em tubo graduado de 1,5ml. Depois de colocado 600 µl de *Nuclei Lysis Solution* adicionar 17,5 µL de proteinase K. Na sequência incubar à 65°C por 60 minutos em banho-maria;
2. Após o tempo de incubação adicionar 3µl de *RNAse Solution* e incubar por mais 15 minutos na temperatura de 37°C em banho-maria, em seguida deixar 5 minutos na temperatura ambiente antes de prosseguir a extração.
3. Passado o tempo adicionar 200 µl de *Protein Precipitation Solution*, e levar ao vortex por 20 segundos, e posteriormente centrifugar por 5 minutos de 13.000-16.000xg;
4. As proteínas precipitadas formam um pelet e cuidadosamente com o auxílio de uma micropipeta devem ser removidos 200 µl do sobrenadante contendo o DNA e este sobrenadante ser transferido para um tubo 1,5 ml contendo 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente, gentilmente foram invertidos os tubos até os filamentos de DNA formarem uma massa visível;
5. Em seguida centrifugar a 13.000-16.000xg. por 2 minutos e descartar o sobrenadante, adicionando 600 µl de etanol absoluto e inverter o tubo várias vezes para que o DNA possa ser bem lavado, após o procedimento levar a centrifuga 13.000-16.000xg. por 15 minutos, em seguida aspirar com uma micropipeta e inverter o tubo sobre um papel absorvente limpo e deixado secar por 15 minutos;
6. Por fim adicionar 100 µl de *DNA Rehydration Solution* e deixar a temperatura ambiente por 1 dia e em seguida estocar na temperatura de -20°C.