

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DIEGO CERVEIRA DE SOUZA

**EXTRAÇÃO DE DNA DE PLANTAS DO CERRADO:
METODOLOGIA INÉDITA E EFICIENTE**

PATOS DE MINAS – MG

2019

DIEGO CERVEIRA DE SOUZA

**EXTRAÇÃO DE DNA DE PLANTAS DO CERRADO:
METODOLOGIA INÉDITA E EFICIENTE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientador(a): Prof(a) Dr(a) Terezinha Aparecida Teixeira.

PATOS DE MINAS – MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S729 Souza, Diego Cerveira de, 1989-
2019 Extração de DNA de plantas do cerrado [recurso eletrônico] :
metodologia inédita e eficiente / Diego Cerveira de Souza. - 2019.

Orientadora: Terezinha Aparecida Teixeira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.323>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Biotecnologia. 2. DNA. 3. Plantas dos cerrados. 4. . I. Teixeira,
Terezinha Aparecida, 1966- (Orient.) II. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU: 60

DIEGO CERVEIRA DE SOUZA

EXTRAÇÃO DE DNA DE PLANTAS DO CERRADO: METODOLOGIA INÉDITA E EFICIENTE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

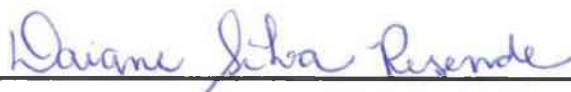
Orientador(a): Prof(a) Dr(a) Terezinha Aparecida Teixeira.

Aprovado em 15/02/19

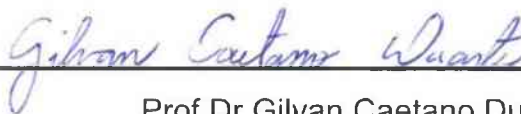
BANCA EXAMINADORA



Prof(a) Dr(a) Terezinha Aparecida Teixeira



Prof(a) Dr(a) Daiane Silva Resende



Prof Dr Gilvan Caetano Duarte

PATOS DE MINAS – MG

2019

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente minha mãe, cujo apoio é essencial para a realização de todos os meus sonhos, sendo a pessoa responsável por tudo que consegui conquistar na minha vida até hoje.

Aos colegas, técnicos e professores da Universidade Federal de Uberlândia que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho. Especialmente à Laysa, que tanto me escutou durante estes 2 anos de trabalho, e à Carol, do curso de graduação em Biotecnologia, e às técnicas Carla e Vanessa, que muito me auxiliaram nas atividades no laboratório.

À minha orientadora desta jornada, que, sempre com muita paciência, sensibilidade e sabedoria, me guiou durante estes anos de aventura na biologia molecular. Não há palavras para descrever todo o meu carinho e gratidão.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O Cerrado é a savana mais rica do planeta em biodiversidade, sendo considerado um dos 35 *hotspots* mundiais, ou seja, áreas prioritárias para conservação pela alta taxa de degradação e número de espécies endêmicas. Diversas espécies do bioma também possuem potencial para aproveitamento econômico, para fins alimentícios, madeireiros, ornamentais e medicinais. Porém, as plantas do Cerrado são geralmente ricas em metabólitos secundários, especialmente compostos fenólicos, os quais dificultam a extração de DNA em quantidade e qualidade suficiente para análises moleculares, essenciais para programas de conservação ou melhoramento. Os métodos de extração descritos até hoje muitas vezes não se adequam às características destas espécies e/ou são demorados, caros e utilizam reagentes tóxicos. Neste contexto, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento de um novo e eficiente método para extração de DNA de plantas do Cerrado, de maneira mais rápida, barata e segura, bem como a comparação do tempo e custos envolvidos no protocolo aqui descrito e naqueles já testados para espécies vegetais do bioma. Nosso método, baseado no uso conjunto de SDS e Triton X-100, dispensa a necessidade de múltiplas etapas de purificação e reduz o uso de reagentes caros e/ou tóxicos. Para os testes, foram selecionadas 10 espécies representativas do bioma Cerrado. A qualidade e quantidade do DNA extraído foram analisadas por espectrofotômetro e em gel de agarose e a sua adequabilidade para estudos moleculares avaliada através de digestão com enzima de restrição e amplificação via PCR com marcador RAPD. O DNA obtido pelo nosso método apresentou-se íntegro, livre de contaminantes e excelente para digestão e amplificação via PCR. A concentração média do DNA entre as espécies testadas variou de 156 a 1166 ng.µL⁻¹ e a relação A_{260}/A_{280} de 1,78 a 1,92. O nosso protocolo também se mostrou mais rápido e barato, quando comparado com os métodos de extração de DNA já testados para espécies do bioma. Portanto, o protocolo apresentado aqui será uma importante ferramenta para análises moleculares de espécies do Cerrado.

Palavras-chave: Diversidade genética. Metabólitos secundários. SDS. Triton X-100.

ABSTRACT

The biome Cerrado is the richest savanna in the world in biodiversity, being considered one of the 35 *hotspots* worldwide, which are priority areas for conservation by the high rate of degradation and number of endemic species. Several species of the biome also have potential for economic use, for food, wood, ornamental and medicinal purposes. However, Cerrado plants are generally rich in secondary compounds, especially phenolic compounds, which make it difficult to extract DNA in sufficient quantity and quality for molecular analyzes, essential for conservation or breeding programs. The extraction methods described to date often do not fit the characteristics of these species and/or are time consuming, expensive and use toxic reagents. So, the present study aims to develop a new and efficient method for extracting DNA from Cerrado plants, in a faster, cheaper and safer way, as well as the comparison of the time and costs involved in the protocol described here and in those already tested for Cerrado plant species. Our method, based on the combined use of SDS and Triton X-100, eliminates the need for multiple purification steps and reduces the use of expensive and/or toxic reagents. For the tests, 10 representative plant species of the Cerrado biome were selected. The quality and quantity of extracted DNA were analyzed by spectrophotometer and agarose gel and its suitability for molecular studies evaluated through restriction enzyme digestion and PCR amplification with RAPD marker. The DNA obtained by our method was intact, free of contaminants and excellent for digestion and amplification via PCR. The DNA concentration among the species tested ranged from 156 to 1166 ng.μL⁻¹ and the A₂₆₀/A₂₈₀ ratio of 1.78 to 1.92. Our protocol has also proved to be faster and cheaper compared to the DNA extraction methods already tested for Cerrado species. Therefore, the protocol presented here will be an important tool for the molecular analysis of Cerrado species.

Keywords: Genetic diversity. Secondary compounds. SDS. Triton X-100.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mapa de distribuição do Cerrado	18
Figura 2 – Fitofisionomias do Cerrado	19
Figura 3 – Distribuição geográfica (a) e representação de um indivíduo (b) de <i>A. humile</i>	21
Figura 4 – Distribuição geográfica (a) e representação de um indivíduo (b) de <i>A. falcata</i>	22
Figura 5 – Representação de um indivíduo (a) de <i>B. dracunculifolia</i> , com detalhe de suas flores (b)	23
Figura 6 – Distribuição geográfica (a) e representação de um indivíduo (b) de <i>B. gaudichaudii</i> , com destaque para os seus frutos	24
Figura 7 – Distribuição geográfica (a) e representação de um indivíduo (b) de <i>C. adamantium</i>	25
Figura 8 – Distribuição geográfica (a) e representação de um indivíduo (b) de <i>E. dysenterica</i>	26
Figura 9 – Distribuição geográfica (a) e representação de um indivíduo (b) de <i>H. stigonocarpa</i>	27
Figura 10 – Distribuição geográfica (a) e representação de um indivíduo (b) de <i>P. campestris</i>	28
Figura 11 – Distribuição geográfica (a) e representação de um indivíduo (b) de <i>S. lycocarpum</i>	29
Figura 12 – Distribuição geográfica (a) e representação de um indivíduo (b) de <i>S. adstringens</i>	20
Figure 13 – Measurement of DNA quality and quantity extracted by our protocol	36

LISTA DE TABELAS

Table 1 – List and characteristics of species used in the experiment; DNA concentration and A_{260}/A_{280} ratio	35
Tabela 2 – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas dos protocolos de extração de DNA estudados	43
Tabela 3 – Tempo gasto, em minutos, nas principais etapas dos protocolos de extração de DNA estudados.....	45
Tabela 4 – Custos dos reagentes utilizados nas principais etapas dos protocolos de extração de DNA estudados (R\$).....	45
Tabela 5 – Custos com mão de obra para realização das principais etapas dos protocolos de extração estudados (R\$).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism

CIA – Clorofórmio : álcool isoamílico 24:1 (v/v)

CTAB – Brometo de hexadeciltrimetilamônio

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PVP – Polivinilpirrolidona

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA

SCAR – Sequence Characterized Amplified Region

SDS – Dodecilsulfato de sódio

SNP – Single Nucleotide Polymorphism

STS – Sequence Tagged Sites

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Biologia molecular e extração de DNA de plantas	15
2.2	O Bioma Cerrado	18
2.3	Características gerais das espécies estudadas	21
2.3.1	<i>Anacardium humile</i> St. Hilaire	21
2.3.2	<i>Anadenanthera falcata</i> (Benth.) Speg	22
2.3.3	<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC.....	23
2.3.4	<i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul	24
2.3.5	<i>Campomanesia adamantium</i> (Cambess.) O. Berg.....	25
2.3.6	<i>Eugenia dysenterica</i> (Mart.) DC	26
2.3.7	<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex. Hayne	27
2.3.8	<i>Peritassa campestris</i> (Cambess.) A.C.Sm.	28
2.3.9	<i>Solanum lycocarpum</i> St. Hil	29
2.3.10	<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	30
3	A SIMPLE AND EFFECTIVE METHOD TO OBTAINHIGH DNA QUALITY AND QUANTITY FROM CERRADO PLANT SPECIES	31
3.1	Introduction.....	32
3.2	Material and methods	33
3.2.1	<i>Plant materials</i>	33
3.2.2	<i>DNA extraction protocol</i>	33

3.2.3 <i>DNA quality and quantity</i>	34
3.3 Results and discussion.....	35
3.4 Conclusions.....	38
3.5 References	39
4 COMPARAÇÃO DO TEMPO E CUSTO PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE PLANTAS DO CERRADO USANDO TRÊS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO.....	41
4.1 Introdução	41
4.2 Material e métodos.....	41
4.3 Resultados e discussão.....	43
5 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXO – NORMAS DA REVISTA <i>MOLECULAR BIOLOGY REPORTS</i>	58

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado é composto por um mosaico de formações vegetais, que formam um gradiente de áreas florestais a campestres, ocupando cerca de 25 % do território brasileiro (DURIGAN; RATTER, 2016). Mais da metade dessa área já foi desmatada para implantação de pastagens e campos agrícolas (KLINK, 2013). Estima-se que, considerando a taxa atual de degradação, o restante do bioma estará destruído até 2050 (STRASSBURG et al., 2017). O Cerrado abriga mais de 11.000 espécies vegetais, das quais mais de 4.400 são endêmicas, além de uma grande variedade de vertebrados terrestres e aquáticos e elevado número de invertebrados (MEDEIROS, 2011). Perante a sua riqueza de espécies, o seu alto grau de endemismo e a sua crescente taxa de degradação, o Cerrado é considerado como um dos 35 *hotspots* mundiais, sendo a única savana entre eles (MITTERMEIER et al., 2011). Desta forma, a adoção de estratégias de conservação do bioma é essencial para manutenção desta rica e ameaçada biodiversidade.

Muitas espécies vegetais do Cerrado também possuem elevado potencial para aproveitamento econômico, podendo ser uma alternativa econômica de aproveitamento sustentável da região (ALMEIDA et al. 1998), bem como uma forma de auxílio na conservação destes ambientes. Há espécies com potencial para uso alimentício, madeireiro, ornamental, aromático, farmacológico, entre outros.

Para conservação ou aproveitamento econômico, o conhecimento da diversidade genética da espécie de interesse é primordial (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011). Até meados da década de 60, a avaliação da diversidade genética era realizada tendo como base caracteres morfológicos, em geral, fenótipos de fácil identificação visual (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Todavia, com o desenvolvimento de novas tecnologias no campo da biologia molecular, especialmente a reação em cadeia da polimerase (PCR), foram criados diversos métodos moleculares para detecção da variabilidade existente diretamente em nível de DNA (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011).

Para o sucesso destas análises, o primeiro passo é a obtenção de DNA em quantidade suficiente e com boa qualidade, ou seja, íntegro e livre de contaminantes

(DEHESTANI; TABAR, 2007). Entretanto, as espécies vegetais do Cerrado em sua grande maioria são ricas em metabólitos secundários, especialmente compostos fenólicos, como flavonoides, polifenóis, fenóis e taninos, que dificultam a extração de DNA em quantidade e qualidade para análises moleculares (SILVA, 2010; MOREIRA; OLIVEIRA, 2011).

Os métodos tradicionais de extração de DNA são geralmente derivados do protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987), com o uso de brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB), com adaptações para diferentes espécies. Estes métodos são demorados, pois envolvem diversas etapas de purificação e precipitação, e pouco seguros, já que usam compostos tóxicos, como clorofórmio, polivinilpirrolidona (PVP) e β -mercaptoetanol (TAMARI et al., 2013). Uma alternativa ao método CTAB é o uso de kits comerciais de extração, entretanto, estes kits são caros, o que dificulta a sua utilização em laboratórios de pesquisa com poucos recursos financeiros ou mesmo para aqueles cujo número de amostras a ser analisado é elevado (AHMADI et al., 2018).

Até hoje, apenas dois estudos descreveram protocolos de extração adaptados para uma grande variedade de espécies vegetais do Cerrado, mas ambos também consistem no protocolo CTAB com modificações, ou seja, também apresentam todos os problemas já descritos do método (FALEIRO et al., 2003; SILVA, 2010). Portanto, o desenvolvimento de um método de extração de DNA eficiente, rápido, barato e seguro é essencial para que estudos com espécies vegetais do Cerrado possam ser realizados com sucesso pelos ecologistas, botânicos, geneticistas, melhoristas e outros agentes envolvidos.

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo apresentar um método rápido, eficiente, simples e menos tóxico para extração de DNA de espécies vegetais nativas do Cerrado com qualidade e em quantidade suficiente para as principais análises moleculares realizadas atualmente. O método apresentado baseia-se no uso conjunto de dodecilsulfato de sódio (SDS) e Triton X-100, eliminando a necessidade de realização de etapas de purificação pós-extração e o uso de reagentes caros e/ou altamente tóxicos, como nitrogênio líquido, clorofórmio, PVP e β -mercaptoetanol. Os custos e o tempo envolvido no respectivo método também foram comparados aos demais já testados para plantas do bioma.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biologia molecular e extração de DNA de plantas

Seja para conservação da biodiversidade, melhoramento genético, estudos filogenéticos e de hereditariedade, desenvolvimento de organismos geneticamente modificados ou para diversas outras finalidades, existem várias técnicas moleculares para auxiliar o trabalho de geneticistas, melhoristas, ecologistas e produtores.

Com o advento da amplificação do DNA, por meio do desenvolvimento da técnica de PCR, em meados da década de 1980, surgiu um grande número de marcadores moleculares, provocando um impulso na geração de dados moleculares para diversas espécies (CAIXETA et al., 2016). Os principais marcadores moleculares usados atualmente baseiam-se na técnica de PCR, tais como o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), o STS (*Sequence Tagged Sites*), o SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) e os microssatélites.

Estes marcadores possibilitam o estudo de uma maior quantidade de características; a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos; a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente; e a detecção de polimorfismos em qualquer estágio de desenvolvimento das plantas ou mesmo a partir de cultura de células ou tecidos (FALEIRO, 2007; MIRANDA, 2014).

As novas tecnologias de sequenciamento de DNA, denominadas de sequenciamento de nova geração, também representam uma importante ferramenta para a genética da conservação e para o melhoramento vegetal, por permitir o conhecimento do genoma das plantas, o estudo de variantes alélicas, o desenvolvimento de marcadores moleculares primers-específicos e a clonagem baseada em mapeamento genético (CARVALHO; SILVA, 2010; GIUSTI; KETTENER; FUCHS-FERRAZ, 2016).

Para o desenvolvimento satisfatório de todas estas técnicas, DNA em quantidade suficiente, íntegro e livre de contaminantes é essencial.

Há diversos protocolos de extração de DNA já descritos e testados para diferentes grupos de espécies, sendo que a escolha de um determinado protocolo depende da qualidade e quantidade de DNA requerida, do número de amostras e da presença e quantidade de substâncias que podem interferir no processo de extração e nas análises subsequentes (SEMAGN, 2014). A maioria dos protocolos disponíveis baseia-se no rompimento das membranas celulares por meio do uso do detergente CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987) ou, em menor frequência, do SDS (DELLAPORTA; WOOD; HICKS, 1983). Existem, ainda, vários kits comerciais para extração de DNA de plantas disponíveis no mercado, que garantem DNA em quantidade e qualidade para análises moleculares (LICKFELDT et al., 2002).

Estes kits comerciais apresentam alto custo, o que torna o seu uso inviável para boa parte dos laboratórios (XIN; CHEN, 2012). Já os métodos tradicionais utilizam reagentes tóxicos e possuem múltiplas etapas para a obtenção de DNA, o que aumenta o tempo de execução, os custos e as chances de erros (TAMARI et al., 2013). Com espécies ricas em polissacarídeos e metabólitos secundários, como terpenos e fenóis, estes métodos muitas vezes ainda falham 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 oxidam o DNA, deixando as amostras escuras, reduzindo a sua vida útil e tornando-as impróprias para análises moleculares (SAHU; THANGARAJ; KATHIRESAN, 2012). Para aumentar a pureza do DNA extraído, são adicionadas ao tampão diferentes concentrações de agentes antioxidantes (PVP e/ou β -mercaptoetanol) e/ou proteases, bem como são realizadas etapas de purificação com clorofórmio (ROMANO; BRASILEIRO, 1999), que são reagentes altamente tóxicos, diminuindo, assim, a segurança do método (KOTCHONI; GACHOMO, 2009).

A maioria das plantas do Cerrado possui elevados teores de metabólitos secundários, especialmente terpenos e compostos fenólicos, como taninos, flavonoides, alcaloides, cumarinas, saponinas, fenóis e ligninas (SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO, 2010), que dificultam o processo de extração e purificação de DNA e, conseqüentemente, a realização de estudos moleculares para conservação e

aproveitamento econômico destas espécies.

As condições de baixa disponibilidade de recursos dos ambientes de Cerrado explicam o fato de as plantas do bioma possuírem estes elevados teores de metabólitos secundários. Estudos mostram que existe uma relação estreita entre a disponibilidade de nutrientes minerais e a concentração de metabólitos secundários, sendo que plantas que vivem em solos com baixa fertilidade, como os do Cerrado, acumulam grandes quantidades de compostos fenólicos e terpenos, devido à abundância de compostos orgânicos, produzidos pelo metabolismo primário e à menor disponibilidade de nutrientes minerais (NOLETO, 2010).

Além disso, plantas que crescem em locais com limitações de nutrientes têm maior dificuldade em repor material vegetal perdido por herbivoria, o que as obriga a apresentarem maior investimento em compostos de defesa (COLEY; BRYANT; CHAPIN, 1985), sendo os metabólitos secundários algumas destas principais ferramentas de proteção das plantas (SANTOS, 2015).

Embora essenciais para evolução e adaptação das plantas do Cerrado às condições adversas da sua região de ocorrência, os metabólitos secundários tornam-se um empecilho à realização de estudos moleculares com as espécies do bioma, por dificultarem a extração de DNA puro, íntegro e em boa quantidade. Segundo Zhang et al. (2013), estes metabólitos atrapalham principalmente a extração de DNA daquelas plantas com usos medicinais, alimentícios, aromáticos ou madeireiros.

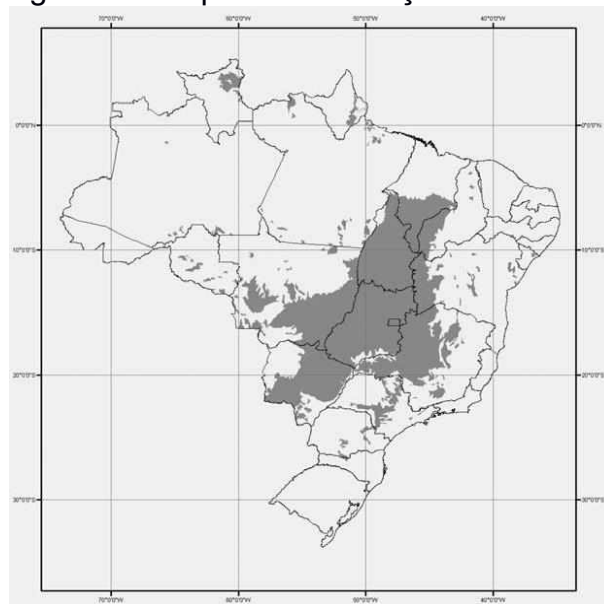
Alguns trabalhos já testaram protocolos eficientes para extração de DNA de algumas espécies vegetais do Cerrado, como Pereira et al. (2004) para *Hymenaea stigonocarpa* Mart. e *Bowdichia virgiloides* Kunth., Moreira e Oliveira (2011) e Souza et al. (2012) para *Dimorphandra mollis* Benth. e Faleiro et al. (2003) e Silva (2010) para diversas espécies de plantas do Cerrado. Porém, todos estes protocolos baseiam-se no método CTAB, com pequenas modificações. Portanto, como já descrito, todos têm em comum o fato de usarem reagentes altamente tóxicos, possuírem custo elevado, serem demorados e, pelo elevado número de etapas requeridas, estarem mais sujeitos a erros (TIBBITS et al., 2006).

2.2 O bioma Cerrado

O Cerrado ocupa cerca de 25 % do território nacional, o que representa mais de 2 milhões de km² (DURIGAN; RATTER, 2016), sendo o segundo maior bioma brasileiro em extensão geográfica, superado apenas pela Amazônia. A sua área de ocorrência abrange, continuamente, parte dos estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Piauí, São Paulo e Tocantins, além do Distrito Federal (Figura 1).

O clima do cerrado é considerado tropical estacional, com uma precipitação média anual de 1.500 mm e temperaturas geralmente amenas ao longo do ano, variando entre 22 e 27 °C (KLINK; MACHADO, 2005). Na região predominam os latossolos, que são solos profundos, de coloração homogênea, altamente intemperizados, com acidez elevada, altos teores de alumínio e baixa fertilidade natural (KER, 1997; SILVA et al., 2001; FIGUEIREDO; RAMOS; TOSTES, 2008).

Figura 1 – Mapa de distribuição do Cerrado



Fonte: Henriques (2005).

A sua vegetação é altamente variada, ocorrendo em sua área diferentes fitofisionomias, que englobam formações florestais (predomínio de espécies

arbóreas), savânicas (árvores e arbustos espalhados sobre um estrato graminoso) e campestres (predomínio de espécies herbáceas) (RIBEIRO; WALTER, 2008). Há diversas classificações para as fitofisionomias do Cerrado, sendo a apresentada por Ribeiro e Walter (2008) uma das mais utilizadas atualmente, por abranger de maneira mais efetiva a alta diversidade encontrada no bioma. Nela, o Cerrado é subdividido em 11 fitofisionomias, conforme a formação vegetal predominante: mata ciliar, mata de galeria, mata seca, cerradão, cerrado sentido restrito, campo sujo, campo limpo, campo rupestre, vereda, parque de cerrado e palmeiral (Figura 2).

Figura 2 – Fitofisionomias do Cerrado



Fonte: Ribeiro e Walter (2008).

Essa alta diversidade faz com que o Cerrado seja considerado a mais rica savana do planeta (DURIGAN; RATTER, 2016), com mais de 10.000 espécies de plantas, 837 espécies de aves, 199 espécies de mamíferos, 150 espécies de anfíbios, 180 espécies de répteis e 1.200 espécies de peixes, sendo muitas dessas raras, endêmicas e/ou ameaçadas de extinção (SILVA; BATES, 2002; KLINK; MACHADO, 2005). Porém, toda essa biodiversidade vem sendo sistematicamente destruída ao longo dos anos pela transformação das áreas naturais de Cerrado em pastagens, campos agrícolas e zonas urbanas.

Mais de 54 % da área original do Cerrado já foi desmatada (KLINK;

MACHADO, 2005). Considerando a taxa atual de desmatamento e a pressão pela expansão das fronteiras agrícolas, estima-se que o restante do bioma estará destruído até 2050 (STRASSBURG et al., 2017). Perante a sua grande riqueza de espécies, o seu alto grau de endemismo e a sua crescente taxa de degradação, o Cerrado é considerado como um dos 35 *hotspots* mundiais (áreas prioritárias para a execução de ações de conservação) sendo a única savana entre esses ambientes (MYERS et al., 2000; MITTERMEIER et al., 2011).

Portanto, é essencial a tomada de medidas que auxiliem na conservação da área remanescente do Cerrado, onde ainda existe rica biodiversidade. Para isso, é crucial a avaliação da variabilidade genética entre e dentro das populações, o que já passou a ter um papel de destaque na definição das estratégias de conservação e manejo de populações naturais (RIBEIRO; RODRIGUES, 2006). Quanto maior a variabilidade genética existente nas populações, maiores são as chances de perpetuação da espécie (RODRIGUES, 2015). Uma maior diversidade genética assegura às populações altos potenciais adaptativo e evolutivo para contrapor os efeitos gerados pelas estocasticidades ambientais, bem como permite que populações se adaptem a ambientes em transformação e indivíduos sobrevivam e se reproduzam em situações novas (MIRANDA, 2014).

Além de sua importância ambiental, o Cerrado também é fonte de diversas espécies vegetais que possuem potencial para utilização econômica, para fins madeireiros, alimentícios, ornamentais e medicinais, mas que até então vêm sendo exploradas basicamente de maneira extrativista (ALMEIDA et al., 1998). Para essa exploração passar do método extrativista para o comercial é essencial o desenvolvimento de programas de melhoramento genético destas espécies. Por sua vez, é necessário conhecer a diversidade genética existente no germoplasma a ser trabalhado, para que, através de metodologias adequadas, sejam buscados genótipos que possuam materiais genéticos superiores (PEREIRA et al., 2016).

Isto é, independente da finalidade, para adoção de políticas e estratégias de conservação ou aproveitamento econômico sustentável de suas espécies, estudos de diversidade genética das plantas do Cerrado são precisos, principalmente com o uso das técnicas moleculares atualmente existentes.

2.3.2 *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg.

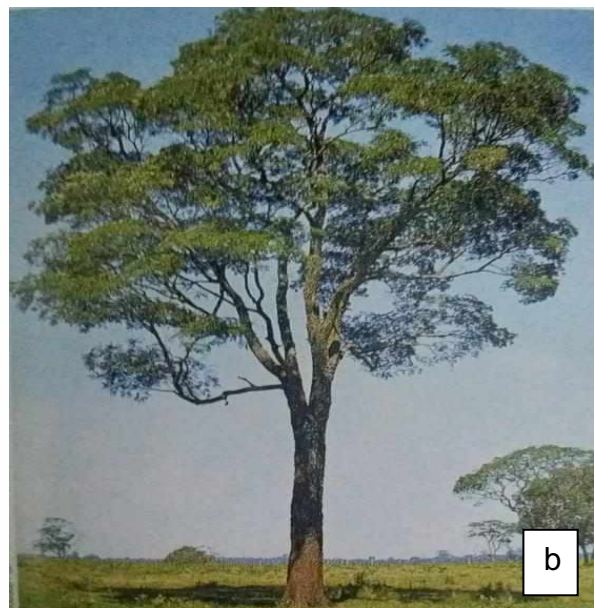
Anadenanthera falcata (Benth.) Speg., popularmente conhecida como angico-do-cerrado, angico-cascudo ou angico-do-campo, ocorre nos Estados da Bahia, Paraíba, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (Figura 4a) (MORIM, 2018), principalmente em solos arenosos (LORENZI, 2008), em fisionomias campestres, savânicas e florestais do Cerrado (DURIGAN et al., 2004). A sua madeira é adequada para construção civil e a casca é adstringente, sendo empregada no preparo de couros e para fins medicinais (LORENZI, 2008). A espécie apresenta alto potencial silvicultural, por ser de rápido crescimento e de fácil adaptação aos solos poucos férteis, sendo recomendada para recuperação de áreas degradadas (CARVALHO, 2003).

É considerada uma planta característica do Cerrado, apresentando ampla e contínua dispersão, ocorrendo geralmente em alta densidade populacional (LORENZI, 2008). Possui grande porte, podendo alcançar até 35 metros de altura (Figura 4b), casca marrom escura espessa e fendilhada (ALMEIDA et al., 1998; DURIGAN et al., 2004) e produz grande quantidade de sementes (LORENZI, 2008).

Figura 4 – Distribuição geográfica (a) e representação de um indivíduo (b) de *A. falcata*.



Fonte: Morim (2018).



Fonte: Lorenzi (2008).

2.3.3 *Baccharis dracunculifolia* DC.

Baccharis dracunculifolia DC., popularmente conhecida como alecrim, alecrim-do-campo e vassourinha, ocorre nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, principalmente na região do Cerrado, em todas as suas fisionomias, em pastagens abandonadas e em áreas perturbadas (DURIGAN et al., 2004; PARK et al., 2004). São arbustos ou arvoretas, atingindo no máximo 3 metros de altura, muito ramificadas e com ramos pubescentes (Figura 5). Seus frutos são do tipo aquênio; as flores alvas ou amareladas e pequenas; e as folhas simples, com cerca de 4 cm de comprimento e 6 mm de largura (DURIGAN et al., 2004).

A espécie tem grande uso popular, os seus ramos e folhas são utilizados para combater vários males, dentre eles: distúrbios gástricos, cansaço físico, inapetência, afecções febris e debilidade orgânica, além de ser utilizada em feridas e processos inflamatórios (MENEZES, 2005). É a principal fonte natural de própolis verde no Brasil, substância amplamente utilizada em função de suas propriedades farmacológicas (PEGORINI; MARANHO; ROCHA, 2008).

Figura 5 – Representação de um indivíduo de *B. dracunculifolia* (a), com detalhe de suas flores (b).



Fonte: Heiden e Schneider (2018).



Fonte: Costa (2009).

2.3.4 *Brosimum gaudichaudii* Trécul.

Brosimum gaudichaudii Trécul., popularmente conhecida como mama-cadela ou mamica-de-cadela, possui ampla distribuição no território brasileiro, ocorrendo praticamente em quase todos os Estados (Figura 6a) (ROMANIUC NETO et al., 2015), nas diversas fisionomias do Cerrado (DURIGAN et al., 2004). Consiste em um arbusto, árvore ou arvoreta, podendo atingir até 4 m de altura, pouco ramificada e glabra, com exceção feita aos ramos jovens, com dimorfismo acentuado (POZETTI, 2005). Os seus frutos são do tipo baga globosa, alaranjada, com cerca de 2,5 cm de diâmetro (Figura 6b), com látex abundante (DURIGAN et al., 2004).

As plantas de *B. gaudichaudii* produzem em suas cascas, raízes, folhas e frutos substâncias ativas amplamente empregadas na medicina popular em várias regiões do país contra o vitiligo e outras manchas na pele. Alguns princípios ativos das plantas da espécie foram extraídos para produção de medicamentos industrializados, como a furocumarina ou bergapteno. Também apresenta potencial para produção de madeira para marcenaria, alimentação e uso como forrageira e aromatizante (ALMEIDA et al., 1998).

Figura 6 – Distribuição geográfica (a) e representação de um indivíduo (b) de *B. gaudichaudii*, com destaque para os seus frutos.



a

Fonte: Romaniuc Neto et al. (2015).



b

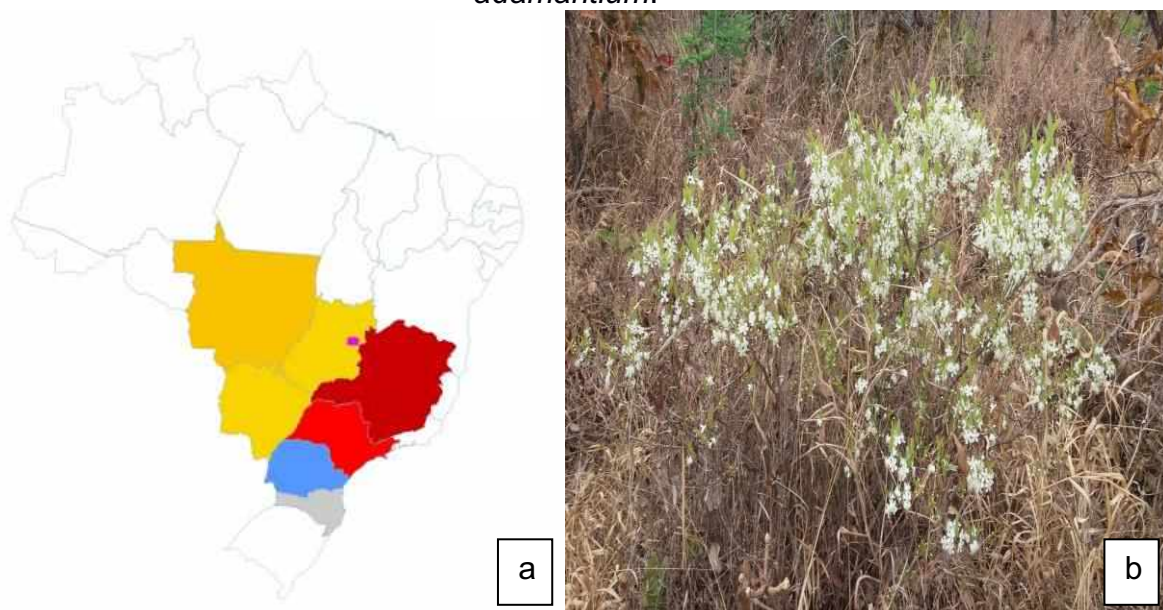
Fonte: Borges (2016).

2.3.5 *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg.

Campomanesia adamantium (Cambess.) O. Berg, popularmente conhecida como gabirobeira, guabirobeira, guaviroba ou guavira, possui ampla distribuição geográfica no território brasileiro (Figura 7a), podendo ser encontrada no Distrito Federal e nos Estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (SOBRAL et al., 2015). Os seus indivíduos se desenvolvem de forma arbustiva, com porte variando de 0,5 a 2,0 m de altura (Figura 7b) e apresentando muitas ramificações com ramos delgados (PELLOSO, 2011; MIRANDA, 2014). São plantas pouco exigentes quanto ao tipo de solo, crescendo naturalmente em solos com baixa fertilidade natural (VALLILO et al., 2006).

O seu florescimento ocorre nos meses de setembro a novembro e os frutos, do tipo baga, amadurecem de novembro a dezembro, podendo ser consumidos *in natura* e na forma de sucos, sorvetes, geleias, licores, vinhos e bolos (MARTINS et al., 2015). Também podem ser utilizados na indústria de alimentos e como flavorizantes na indústria de bebidas, devido aos seus atributos de qualidade (VALLILO; BUSTILLOS; AGUIAR, 2006).

Figura 7 – Distribuição geográfica (a) e representação de um indivíduo (b) de *C. adamantium*.



Fonte: Sobral et al. (2015).

Fonte: autor.

2.3.6 *Eugenia dysenterica* (Mart.) DC.

Eugenia dysenterica (Mart.) DC., popularmente conhecida como cagaiteira ou cagaita, ocorre em diversos estados brasileiros (Figura 8a) (SOBRAL et al., 2015), nas diferentes fisionomias do Cerrado (DURIGAN et al., 2004). Constitui-se em uma árvore de porte médio, possuindo de 4 a 10 m de altura (Figura 8b), tronco tortuoso e cilíndrico, com 20 a 40 cm de diâmetro e uma casca suberosa e fendada bem característica (MARTINOTTO et al., 2008). Floresce de agosto a setembro, com frutificação de setembro a outubro (ALMEIDA et al., 1998).

Os seus frutos são do tipo baga globosa-achatada, amarelo-pálida, de 2 a 3 cm de diâmetro, apresentando uma polpa levemente ácida (MARTINOTTO et al., 2008), podendo ser consumidos *in natura* ou na produção de licor, sorvete, suco e geleia. Além disso, a espécie faz parte da flora apícola do Cerrado e suas folhas e cascas são utilizadas na medicina popular como antidiarreico, para diabetes e icterícia (SILVA; CHAVES; NAVES, 2001). Também possui uso ornamental, fornece madeira e pode ser usada na indústria de curtume (ALMEIDA et al., 1998).

Figura 8 – Distribuição geográfica (a) e representação de um indivíduo (b) de *E. dysenterica*.



Fonte: Sobral et al. (2015).



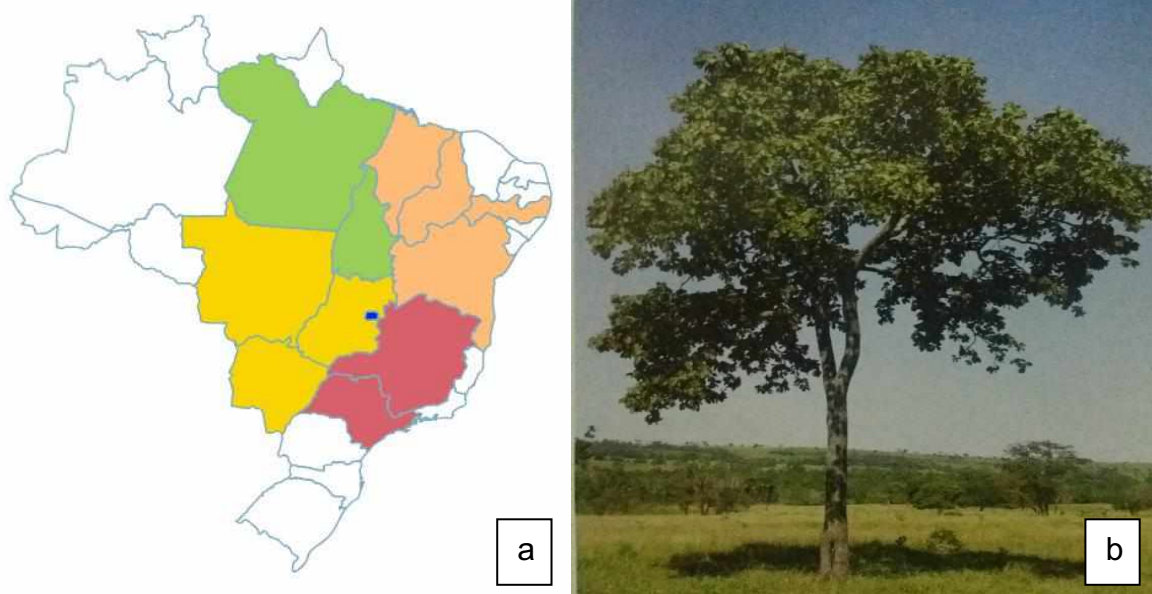
Fonte: Oliveira (2010).

2.3.7 *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne

Hymenaea stigonocarpa Mart. ex Hayne, popularmente conhecida como jatobá-do-cerrado, jataí-do-campo ou jataí, ocorre em diversos estados brasileiros (Figura 9a) (PINTO; TOZZI; MANSANO, 2018), principalmente em área de cerrado típico e de cerradão (DURIGAN et al., 2004). A espécie se desenvolve naturalmente em solos de fertilidade química baixa (CIPRIANO et al., 2014), atingindo até 4 a 6 m de altura (Figura 9b) e produzindo frutos com comprimento entre 6 e 18 cm e diâmetro de 3 a 6 cm (MATUDA; MARIA NETTO, 2005).

Sua madeira é muito apreciada para construção civil e naval, pode ser usada na ornamentação de espaços públicos devido à forma característica de sua copa e seus frutos são comestíveis e muito apreciados pelas populações rurais na forma de farinhas *in natura* ou na elaboração de mingau, bolos, pães e biscoitos (LORENZI, 2008). O líquido venoso e a resina extraída dos seus troncos também podem ser utilizados para fins medicinais (ALMEIDA et al., 1998).

Figura 9 – Distribuição geográfica (a) e representação de um indivíduo de *H. stigonocarpa*.



Fonte: Pinto, Tozzi e Mansano (2018).

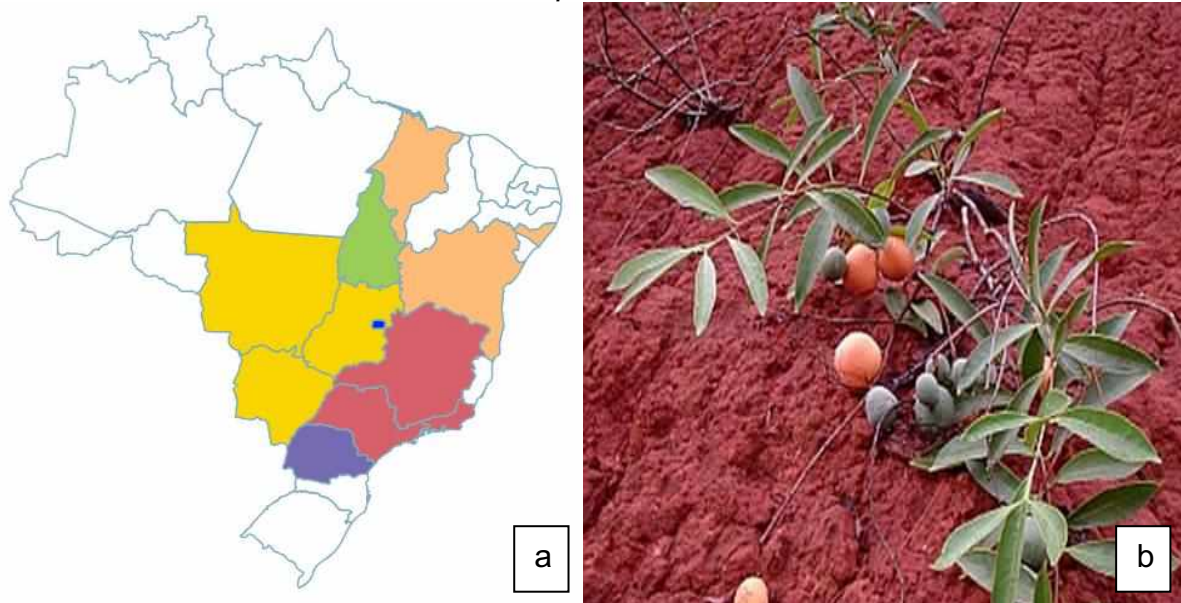
Fonte: Lorenzi (2008).

2.3.8 *Peritassa campestris* (Cambess.) A.C.Sm.

Peritassa campestris (Cambess.) A.C.Sm., popularmente conhecida como bacupari, bacupari-do-cerrado, rufão, tapicuru, japicuru, saputá, manguinha, laranjinha ou capicuru, ocorre em diversos estados brasileiros (Figura 10a) (BIRAL; LOMBARDI, 2018), principalmente nas fisionomias campestres de cerrado e em cerrado típico (DURIGAN et al., 2004). Consiste em arbustos baixos e lenhosos, com ramos flexuosos, delgados e glabros, alcançando até 1,7 m de altura (Figura 10b). Floresce de julho a setembro, frutificando logo após a floração. Produz frutos do tipo baga, de coloração alaranjada, redondos ou piriformes, com cerca de 2,5 a 3,5 cm de diâmetro, com 1 a 3 sementes (ALMEIDA et al., 1998; DURIGAN et al., 2004).

A espécie possui grande potencial de aproveitamento frutífero pelo seu hábito arbustivo, que facilita a colheita, pela boa produção de frutos e pela aceitação popular. Os seus frutos são consumidos *in natura*, sendo a parte comestível do fruto o arilo adocicado, levemente ácido e de sabor agradável que envolve as sementes (ALMEIDA et al., 1998).

Figura 10 – Distribuição geográfica (a) e representação de um indivíduo (b) de *P. campestris*.



Fonte: Biral e Lombardi (2018).

Fonte: <http://www.colecionandofrutas.org/peritassacampestris.htm>.

2.3.9 *Solanum lycocarpum* St. Hil.

Solanum lycocarpum A.St.-Hil., popularmente conhecida como lobeira ou fruta-do-lobo, ocorre em diversos estados brasileiros (Figura 11a) (STEHMANN et al., 2015), principalmente em fisionomias campestres de cerrado e cerrado típico, mas também em áreas de cerradão, em bordas de fragmentos e em áreas perturbadas (DURIGAN et al., 2004). Produzem flores durante o ano todo, principalmente de março a novembro, com frutificação de março a julho (ALMEIDA et al., 1998; DURIGAN et al., 2004). Cresce e se desenvolve em condições ambientais desfavoráveis (Figura 11b), tais como solos ácidos e pobres em nutrientes (PASCOAL, 2014).

Os seus frutos são do tipo baga globosa, tomentosa, de cor verde amarelada mesmo quando madura, de 8 a 15 cm de diâmetro, com polpa carnosa e succulenta, sendo utilizados como alimento para pássaros e mamíferos de pequeno e médio porte (LORENZI, 1998). Na alimentação humana, a utilização da fruta é controversa, mas a espécie possui usos medicinais e ornamentais, bem como é uma forrageira valiosa e pode ser usada para tinturaria (ALMEIDA et al., 1998).

Figura 11 – Distribuição geográfica (a) e representação de um indivíduo (b) de *S. lycocarpum*.



Fonte: Solanum (2018).



Fonte: Silva Júnior (2005).

2.3.10 *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville

Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville, popularmente conhecida como barbatimão ou barbatimão-verdadeiro, ocorre principalmente na região sudeste e centro-oeste do Brasil (Figura 12a) (SOUZA; GIBAU, 2018), em fisionomias campestres de cerrado e em cerrado típico (DURIGAN et al., 2004). Atinge 4 a 5 m de altura (Figura 12b), com tronco de 20 a 30 cm de diâmetro, revestido por casca com ritidoma suberoso, escamoso, por vezes com cristas agudas (LORENZI, 2008).

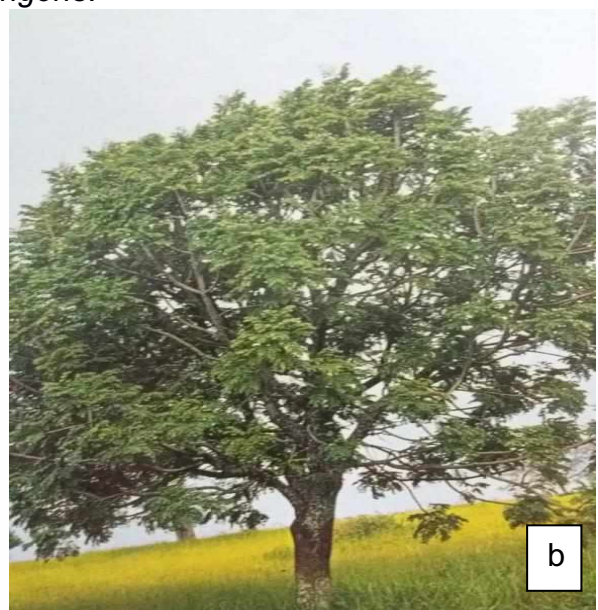
Fornece madeira de cerne vermelho, duro, com fibras muito reversas, própria para construção civil, obras expostas, marcenaria e torno. A casca é importante fonte de tanino, utilizada no curtume de couro, sendo também usada para fins medicinais, devido as suas propriedades cicatrizante e adstringente (ALMEIDA et al., 1998). Até 40 e 30 % de suas cascas e folhas, respectivamente, são compostas de taninos (ALMEIDA et al., 2010). É bastante ornamental, podendo ser utilizada no paisagismo e na arborização urbana, também sendo recomendada para plantio em áreas degradadas (LORENZI, 2008).

Figura 12 – Distribuição geográfica (a) e representação de um indivíduo (b) de *S. adstringens*.



a

Fonte: Souza e Gibau (2018).



b

Fonte: Lorenzi (2008).

3 A SIMPLE AND EFFECTIVE METHOD TO OBTAIN HIGH DNA QUALITY AND QUANTITY FROM CERRADO PLANT SPECIES¹

Diego Cerveira de Souza^{ab} and Terezinha Aparecida Teixeira^a

^a Laboratory of Molecular Genetics, Federal University of Uberlandia (UFU), Campus Patos de Minas, 38700-128, Patos de Minas, MG, Brazil

^b Corresponding author e-mail: diegocerveira@hotmail.com

Abstract – Despite the importance in conservation and breeding purposes, molecular studies using Cerrado plant species are still rare, mainly because of their high amounts of secondary compounds, impeding DNA extraction to downstream applications, such as PCR amplification. To date, the DNA extraction methods described are mostly inadequate for these species, expensive, time-intensive and/or use very toxic reagents. Here, we present a simple and effective method, based on SDS and Triton X-100, to obtain high DNA quality and quantity from Cerrado plant species for molecular biological techniques. The DNA obtained by our protocol was free of contaminants and excellent for enzymatic restriction and PCR amplification. The concentration of extracted DNA ranged from 156 to 1,166 ng.µL⁻¹, with an A₂₆₀/A₂₈₀ ratio from 1.78 to 1.92. Thus, the use of the method presented here will allow ecologists, geneticists and breeders to rapidly obtain high-quality and -quantity DNA from Cerrado plant species for any molecular biology study.

Key words: DNA extraction, SDS, Triton X-100, PCR amplification, enzymatic restriction.

¹ Artigo submetido à revista *Molecular Biology Reports*.

3.1 Introduction

The Brazilian Cerrado comprises a mosaic of vegetation types forming a structural gradient from grasslands through savanna woodland to forests, representing about 25% of the country [1]. More than half of this area has already been cleared for grazing and agricultural fields [2]. It is estimated that, considering the current rate of degradation, the remainder of the biome will be destroyed by 2050 [3]. Due to its great species richness, its high degree of endemism and its increasing rate of degradation, the Cerrado is considered one of the 35 hotspots in the world, being the only savanna among them [4].

Molecular biological studies of Cerrado plants are essential for conservation genetics purposes or even to use its germplasm in breeding programs, since several species have potential for food, timber and medicinal use. However, the extraction of good-quality DNA with a high yield is difficult from Cerrado plant species due to the presence of high amounts of secondary compounds, such as polyphenols [5,6]. These compounds hinder the extraction of high-quality DNA for subsequent molecular analyses based on enzymatic digestion, PCR amplification or next-generation sequencing [7].

Traditional methods of DNA extraction, generally derived from the original hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) based method, described by Doyle and Doyle [8], involve multiple time-consuming steps and require highly toxic solvents, such as chloroform or phenol [9]. An alternative are commercially available DNA extraction kits, but they have a high cost per sample ratio [10]. To date, only two studies tested DNA protocols in a wide range of Cerrado plant species, but both are modifications of the original CTAB protocol, with the full range of limitations cited above [11,5]. Thus, an easy, fast, efficient and less time-consuming and toxic method for DNA extraction from Cerrado plant species is urgently needed for genetic and molecular analyses.

In this report, we present a quickly and simple method for DNA extraction from Cerrado plant species that provides sufficient quality and quantity of DNA for PCR amplification and enzymatic digestion without long incubations and multiple DNA

washes and purifications and without using liquid nitrogen and toxic reagents, such as chloroform, β -mercaptoethanol and polyvinylpyrrolidone (PVP).

3.2 Material and methods

3.2.1 *Plant materials*

Our study was conducted at the Laboratory of Molecular Genetics, Federal University of Uberlândia, MG, Brazil. We selected 10 plant species, representing a functionally diverse sample of the Cerrado biome (Table 1). From each species, three young, fresh and healthy leaf samples of four plants were collected in a natural Cerrado area at the Lagoa Formosa municipality in the state of Minas Gerais, Brazil (18°40'23''S 46°26'59''O). After collection, the samples were stored at -80°C for 24 hours and subsequently lyophilised for 48 hours. The dried leaf tissue was triturated to a fine powder in a mortar and stored at room temperature until extraction.

3.2.2 *DNA extraction protocol*

a. Place approximately 100 mg of triturated leaf tissue into a 15 mL polypropylene tube, add the extraction buffer preheated in a 65°C water bath (1.4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 8.0; 20 mM EDTA; 5 % Triton X-100; 5 % SDS) until approximately 5 mL, vortex for 30 s and incubate at 65°C for 15 min in an incubator of the water bath.

b. Vortex the tube very quickly (less than 30 s), transfer the supernatant (approximately 2 mL) to a 2 mL microfuge tube and centrifuge at 13,000 rpm for 7 min.

c. Transfer the supernatant (approximately 1 mL) to a new 2 mL microfuge tube, add the same volume of cold 99% ethanol (stored at -20°C), gently mix by inverting the tube and centrifuge at 13,000 rpm for 7 min to pellet the DNA.

d. Carefully decant the supernatant, taking care to not disturb the pellet, dry the DNA pellet at room temperature for at least 30 min to remove residual ethanol and then resuspend the pellet in 100 µL Tris-HCl buffer; finally, store the extract at -4°C for immediate use or at -20°C for long-term storage.

3.2.3 DNA quality and quantity

The concentrations and absorbance ratios (A_{260}/A_{280}) of 12 DNA samples of each species were measured with an L-QUANTTM Spectrophotometer (Loccus, Brazil), using 2 µL of each sample. The DNA quality was also analysed on 0.8% agarose gel run at 80 V for 60 min. Consecutively, to check the efficiency and reliability of the method, the extracted DNA was digested with EcoRI restriction enzyme (1.5 U per 250 ng of DNA) at 37°C for 3 h, followed by enzyme inactivation for 15 min at 70°C. The digested DNA was resolved on 1.0% agarose gel at 80 V for 3 h for adequate separation of digested DNA.

Extraction efficacy was also tested for PCR amplification via the RAPD technique, using a final volume of 25 µL, consisting of 25 ng of template DNA, 100 µM of dNTPs, 2 mM of MgCl₂, 0.2 µM of primer OPA-02 of the Operon Technologies Inc. (5'TGCCGAGCTG3'), 1 unit of Taq DNA polymerase and 1 X of PCR buffer. The conditions of the PCR amplification were as follows: denaturation at 95°C for 1 min, followed by 39 cycles of 94°C for 15 s, 35°C for 30 s, 72°C for 60 s, followed by final extension at 72°C for 7 min. The PCR products were analysed by electrophoresis on 1.4% agarose gel.

All agarose gels were stained using Gel RedTM and examined on a gel documentation system under UV light.

3.3 Results and discussion

The Cerrado biome is still poorly studied molecularly due to great difficulties in obtaining DNA reliable to downstream applications, since its species have high amounts of secondary compounds. Before this described protocol, we unsuccessfully tested several procedures in our laboratory, especially based on the CTAB method, for DNA extraction of Cerrado plant species; however, all methods failed in achieving DNA with a high quality and quantity. We tested different β -mercaptoethanol and PVP concentrations and more than one DNA purification step with chloroform: isoamyl alcohol, but the DNA obtained was always of low quality and/or quantity, and the procedures were not time-efficient. This problem was only solved by the new protocol described here.

Our protocol yielded a mean DNA concentration across all tested species of 156 to 1,166 ng. μ L⁻¹, which is a sufficient amount for most molecular applications. The agarose gel electrophoresis of DNA obtained showed the presence of large quantities of DNA with more than 10 kb and free of contaminants (Fig. 13a). The A_{260}/A_{280} ratio ranged 1.78 to 1.92, which indicated insignificant levels of contaminating proteins and phenols (Table 1). The ideal A_{260}/A_{280} is 1.8 to high-purity DNA; however, depending on the base composition of DNA, readings for the A_{260}/A_{280} ratio between 1.6 and 1.9 are already an indicative of high-quality DNA [12].

Table 1 – List and characteristics of species used in the experiment; DNA concentration and A_{260}/A_{280} ratio.

Scientific name	Common name	Family	Life-form	DNA concentration (ng/ μ L)*	A_{260}/A_{280} ratio*
<i>Anacardium humile</i> St. Hilaire	Cajuzinho-do-cerrado	Anacardiaceae	Shrub	855 \pm 266	1.82 \pm 0.18
<i>Anadenanthera falcata</i> (Benth.) Speg.	Angico-do-cerrado	Fabaceae (Mimosoideae)	Tree	248 \pm 114	1.88 \pm 0.25
<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC	Alecrim-do-campo	Asteraceae	Shrub	763 \pm 213	1.78 \pm 0.08
<i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul	Mama-cadela	Moraceae	Tree	1050 \pm 198	1.78 \pm 0.10
<i>Campomanesia adamantium</i> (Cambess.)	Gabirobeira	Myrtaceae	Shrub	453 \pm 173	1.81 \pm 0.08

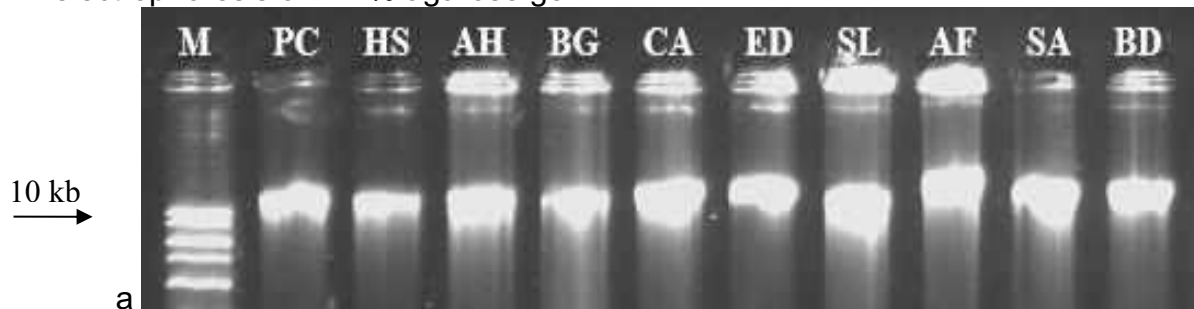
O. Berg

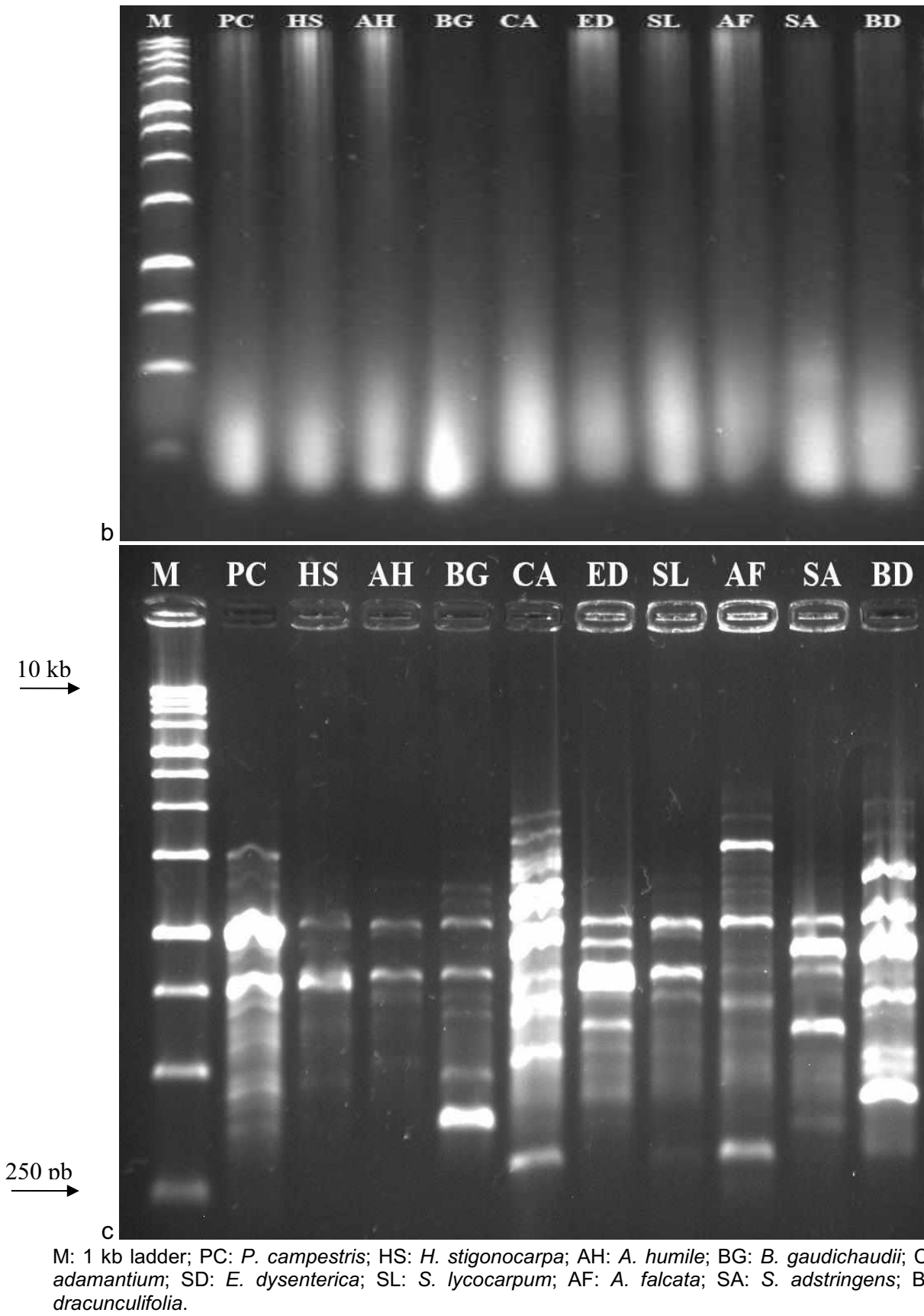
<i>Eugenia dysenterica</i> (Mart.) DC.	Cagaiteira	Myrtaceae	Tree	156 \pm 33	1.81 \pm 0.08
<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne	Jatobá-do- cerrado	Fabaceae (Faboideae)	Tree	579 \pm 211	1.82 \pm 0.14
<i>Peritassa campestris</i> (Cambess.) A.C.Sm.	Bacupari	Celastraceae	Shrub	828 \pm 342	1.90 \pm 0.05
<i>Solanum lycocarpum</i> St. Hil.	Lobeira	Solanaceae	Tree	1166 \pm 154	1.78 \pm 0.08
<i>Stryphnodendron</i> <i>adstringens</i> (Mart.) Coville	Barbatimão	Fabaceae (Mimosoideae)	Tree	712 \pm 231	1.92 \pm 0.02

* Mean \pm standard deviation

Restriction digestion with EcoRI enzyme demonstrated that the DNA was free from interfering substances (Fig. 13b). Similarly, PCR amplification also showed reproducible, sharp and clear banding patterns, ranging between 300 bp and 2 kb (Fig. 13c).

Figure 13 – Measurement of DNA quality and quantity extracted by our protocol. a) 500 ng of DNA isolated resolved by electrophoresis on 0.8% agarose gel. b) Restriction digestion of DNA with EcoRI resolved by electrophoresis on 1.0% agarose gel. c) Amplification profile of DNA isolated by RAPD technique resolved by electrophoresis on 1.4% agarose gel.





Most DNA extraction reports published nowadays basically represent the CTAB method with modifications to particular species; they are thus time-consuming, use toxic reagents, rely on long incubation steps and require multiple DNA washes and precipitation [13]. However, our protocol allowed high-quality and -quantity DNA extraction of Cerrado plant species by combining the detergents Triton X-100 and SDS, without any problems cited above.

The original SDS-based DNA extraction protocol, described by Dellaporta et al. [14], uses β -mercaptoethanol in the extraction buffer and has a purification step with potassium acetate, which is not necessary in our method due to the use of Triton X-100 and high-salt buffer. Usually, in DNA extraction protocols, the disruption of the cell membrane to release the DNA into the extraction buffer is achieved by the detergents CTAB or SDS. On the other hand, Triton X-100 and SDS lyses, when used combined, lead proteins and polysaccharides to get trapped in large complexes coated with SDS, which reduces contamination [15]. Moreover, the addition of higher salt amounts (1.0 to 2.5 M NaCl) to the extraction buffer also helps to obtain high-quality DNA, since when DNA is precipitated with ethanol, the contaminants remain in solution with the ethanol rather than precipitating with the DNA [16].

This protocol has successfully been used in our laboratory to extract DNA from other plant species, such as *Coffea arabica*, *Lactuca sativa* and *Zea mays*, which shows that the DNA extraction protocol presented here is reproducible and can be applied in any plant molecular biology study.

3.4 Conclusions

Based on our results, the DNA isolated with the help of the described protocol had a good quality and was suitable for molecular analyses such as restriction digestion, PCR amplification and other similar methods. This high-quality DNA was obtained in a safer, faster and simpler way, eliminating the main CTAB method problems. Thus, it will be an important tool for genetic and molecular studies with Cerrado plant species for conservation or breeding purposes and can also be applied to other plant species.

Author contribution statement – DS and TT conceived and designed the research and wrote the manuscript.

3.5 References

- ¹ Durigan G, Ratter JA (2016) The need for a consistent fire policy for Cerrado conservation. *J Appl Ecol* 53:11-15.
- ² Klink CA (2013) Policy intervention in the Cerrado savannas of Brazil: changes in land-use and effects on conservation. In: Consorte-McCrea AG, Santos EF (eds). *Ecology and conservation of the maned wolf: multidisciplinary perspectives*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp 293-308.
- ³ Strassburg BBN, Brooks T, Feltran-Barbieri R et al (2017) Moment of truth for the Cerrado hotspot. *Nat Ecol Evol*, 1:1-3.
- ⁴ Mittermeier CG, Turner WR, Larsen FW, Brooks TM, Gascon C (2011) Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots. In: Zachos FE, Habel JC (eds). *Biodiversity hotspots: distribution and protection of priority conservation areas*. Springer-Verlag, Berlin, pp 3-22.
- ⁵ Silva MN (2010) Extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do cerrado. *Rev Arvore* 34(6):973-978.
- ⁶ Moreira PA, Oliveira DA (2011) Leaf age affects the quality of DNA extracted from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), a tropical tree species from the Cerrado region of Brazil. *Genet Mol Res* 10(1):353-358.
- ⁷ Bressan EA, Rossi ML, Gerald LTS, Figueira A (2014) Extraction of high-quality DNA from ethanol-preserved tropical plant tissues. *BMC Res Notes* 7:268.

- ⁸ Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull* 19:11–15.
- ⁹ Tamari F, Hinkley CS, Ramprashad N (2013) A comparison of DNA extraction methods using *Petunia hybrida* tissues. *J Biomol Tech* 24:113-118.
- ¹⁰ Ahmed I, Islam M, Arshad W, Mannan A, Ahmad W, Mirza B (2009) High-quality plant DNA extraction for PCR: an easy approach. *J Appl Genet* 50(2):105-107.
- ¹¹ Faleiro FG, Faleiro ASG, Cordeiro MCR, Karia CT (2003) Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do Cerrado visando a análises moleculares. Embrapa, Planaltina.
- ¹² Martínez-González CR, Ramírez-Mendoza R, Jiménez-Ramírez J, Gallegos-Vázquez C, Luna-Veja I (2017) Improved method for genomic DNA extraction for *Opuntia* Mill. (Cactaceae). *Plant Methods* 13:82.
- ¹³ Healey A, Furtado A, Cooper T, Henry RJ (2014) Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods* 10:21.
- ¹⁴ Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* 1(4):19-21.
- ¹⁵ Jhala VM, Mandaliya VB, Thaker V (2015) Simple and efficient protocol for RNA and DNA extraction from rice (*Oryza sativa* L.) for downstream applications. *Int Res J of Biol Sci* 4(2):62-67.
- ¹⁶ Fang GH, Hammar S, Grumet R (1992) A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques* 13(1):52-56.

4 COMPARAÇÃO DO TEMPO E CUSTO PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE PLANTAS DO CERRADO USANDO TRÊS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO

4.1 Introdução

Em estudos moleculares com espécies vegetais, geralmente é necessária a avaliação de um grande número de indivíduos, muitas vezes em laboratórios que não possuem mão de obra e recursos financeiros abundantes, nem mesmo estrutura básica que garanta a segurança dos trabalhadores. Portanto, um bom protocolo de extração de DNA, além de ser capaz de extrair DNA puro, íntegro e em boa quantidade, deve ser seguro, rápido e barato (ANTANAVICIUTE et al., 2015).

No Capítulo 3 foi apresentado um novo método de extração de DNA, que garante DNA íntegro, puro e em quantidade suficiente para as principais análises moleculares de plantas do Cerrado. Já neste capítulo, realizamos uma análise do tempo, dos custos e dos reagentes utilizados no nosso método, comparando-os com aqueles descritos nas metodologias apresentados por Faleiros et al. 2003 e Silva 2010, que testaram diferentes protocolos para extração de DNA de 10 e 5 espécies vegetais do Cerrado, respectivamente.

4.2 Material e métodos

Os protocolos utilizados para comparação com o protocolo apresentado no Capítulo 3 estão descritos a seguir:

- i. Faleiro et al. (2003) – Colocar material macerado em um microtubo de 2,0 mL, ocupando 1/5 do seu volume. Adicionar 800 µL de tampão de extração (Tabela 2). Incubar os microtubos em banho-maria a 70 °C por 60 minutos, agitando-os a cada 10 minutos. Adicionar 700 µL de CIA – clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v). Agitar com suaves inversões por 10 minutos e centrifugar a 4 °C a 18.845 g por 10

minutos. Transferir o sobrenadante para novos microtubos de 2,0 mL. Adicionar 55 μ L de CTAB 7 % e repetir a etapa de limpeza com CIA. Adicionar ao sobrenadante 700 μ L de isopropanol gelado. Manter os tubos a -20°C por duas horas e centrifugar como na etapa de limpeza. Descartar o sobrenadante, lavar o pellet com etanol 70 % (v/v) e secar a temperatura ambiente. Ressuspender o pellet em 150 μ L de água contendo RNase na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$. Colocar em banho-maria a 37°C até a completa ressuspensão. Precipitar, centrifugar e ressuspender o pellet em 150 μ L de água, como já descrito.

- ii. Silva (2010) – Colocar material macerado em um microtubo de 2,0 mL. Adicionar 700 μ L do tampão de extração pré-aquecido (Tabela 2). Incubar em banho-maria a $60-65^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Retirar os microtubos do banho-maria e resfriar em temperatura ambiente. Adicionar 600 μ L de CIA - clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v). Agitar com suaves inversões por 10 minutos e centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo de 2,0 mL, adicionar 1/10 do volume de CTAB 10 % e homogeneizar por inversão. Repetir a limpeza com 600 μ L de CIA por mais duas vezes. Adicionar 2/3 do volume do sobrenadante de isopropanol gelado e centrifugar a 7.000 rpm por 5 minutos. Descartar o sobrenadante, lavar o pellet duas vezes em 1,0 mL de etanol 70 % e uma vez em 1,0 mL de etanol absoluto por 5 minutos. Secar o pellet em temperatura ambiente. Ressuspender em 100 μ L de tampão TE e armazenar a -20°C .

O tempo gasto para extração de DNA por meio de cada método foi determinado considerando o tempo para execução das principais etapas de cada um, desde a incubação em banho-maria com o tampão de extração, desconsiderando etapas anteriores para preparação do material vegetal, até a obtenção do pellet, desconsiderando etapas posteriores para limpeza deste. Ações rápidas, como a simples adição e mistura de reagentes e o uso do vórtex e/ou spin, por não exercerem grande influência no tempo total, não foram consideradas.

Para determinação do custo total de extração de cada método foram estimados os custos dos reagentes e da mão de obra gasta nas principais etapas descritas nos protocolos, nos termos apresentados para determinação do tempo. Os custos referentes aos equipamentos (aquisição e desgaste) e outros materiais do laboratório foram excluídos. Os custos de todos os reagentes foram calculados com base no valor dos reagentes da empresa Sigma-Aldrich®. Para cálculo do valor da mão de obra foi considerado o salário mensal de R\$ 2.446,97, correspondente ao salário inicial de um técnico de laboratório do governo federal (nível D-I), sendo 20 dias trabalhados/mês e 8 horas/dia.

Tabela 2 – Descrição dos reagentes utilizados nas principais etapas dos protocolos de extração de DNA estudados.

Procedimento	Protocolo		
	SDS + Triton X-100	Faleiro et al. (2003)	Silva (2010)
Extração	100 mM Tris HCl	100 mM Tris-HCl	100 mM Tris-HCl
	20 mM EDTA	20 mM EDTA	20 mM EDTA
	1,4M NaCl	1,3 M NaCl	1,4 M NaCl
	SDS 5 %	CTAB 2,8 %	CTAB 2 %
	Triton X-100 5 %		
	-	PVP 1 %	PVP 1 %
Purificação	-	β -mercaptoetanol 0,2 %	β -Mercaptoetanol 1 %
		Clorofórmio:álcool isoamílico 24:1	Clorofórmio:álcool isoamílico 24:1
		CTAB 7 %	CTAB 10 %
		RNase	-
Precipitação	Etanol absoluto	Isopropanol	Isopropanol

4.3 Resultados e discussão

Na maioria dos protocolos de extração de DNA de plantas, os tampões de extração possuem β -mercaptoetanol e/ou PVP para eliminação de compostos fenólicos, polissacarídeos e outros contaminantes, sendo ainda necessária uma ou

mais etapas de purificação para remoção de proteínas com clorofórmio e álcool isoamílico (RODRIGUES; VENÂNCIO; LIMA, 2017). Embora estes reagentes realmente promovam a melhora da qualidade do DNA extraído, são altamente tóxicos, reduzindo a segurança dos processos de extração.

Os kits comerciais são uma alternativa para eliminar o uso destes reagentes e obter DNA de plantas com boa qualidade e em boa quantidade, mas são caros (SHI; PANTHEE, 2017), podendo chegar a cerca de R\$ 16,00 por amostra (US\$ 4,37), valor inviável de ser gasto para boa parte dos laboratórios de análises moleculares de plantas (ANTANAVICIUTE et al., 2015). Já o protocolo baseado no uso conjunto de SDS e Triton X-100, como verificado na Tabela 2, não utiliza os principais reagentes tóxicos usados nos demais protocolos já testados para espécies vegetais do Cerrado (β -mercaptoetanol, PVP e clorofórmio), bem como ainda dispensa o uso de nitrogênio líquido, que é geralmente caro e difícil de obter em localidades remotas (AMBAWAT et al., 2017).

O tempo de extração de DNA dos protocolos testados variou de 29 a 242 minutos, sendo o nosso protocolo o mais rápido e o descrito por Faleiros et al. (2003) o mais demorado (Tabela 3). Enquanto os outros protocolos usam de 30 a 60 minutos de incubação em banho-maria, no nosso protocolo são apenas 15 minutos. Além disso, ambos os protocolos baseados em CTAB exigem mais de uma etapa de limpeza com CIA e CTAB, o que aumenta consideravelmente o seu tempo de execução. O tempo total de extração do protocolo de Faleiros et al. (2003) foi ainda superior ao descrito por Silva (2010) devido a etapa de precipitação, uma vez que no primeiro as amostras são mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por duas horas para precipitação do DNA, o que não é necessário no segundo.

Os custos dos reagentes variaram de R\$ 0,895 a R\$ 1,178 por amostra (Tabela 4). Embora a extração pelo método SDS + Triton X-100 tenha apresentado maior custo para extração, o seu custo total foi inferior 21 e 24 %, respectivamente, quando comparado aos protocolos descritos por Faleiros et al. (2003) e Silva (2010), pelo fato de não usar reagentes no processo de purificação, que é composto apenas por centrifugação.

Tabela 3 – Tempo gasto, em minutos, nas principais etapas dos protocolos de extração de DNA estudados.

Procedimento	Protocolo		
	SDS + Triton X-100 ¹	Faleiro et al. (2003) ²	Silva (2010) ³
Extração	15	60	30
Purificação	7	50	45
Precipitação	7	130	5
Tempo total	29	242	80

¹ Extração: incubação em banho-maria; Purificação: centrifugação para separação do sobrenadante com o DNA; Precipitação: centrifugação para precipitação do pellet.

² Extração: incubação em banho-maria; Purificação: duas limpezas com CIA (homogeneização e centrifugação) e uma limpeza com RNase (centrifugação); Precipitação: manutenção em baixa temperatura e centrifugação para precipitação do pellet.

³ Extração: incubação em banho-maria; Purificação: limpeza com CIA por três vezes (homogeneização e centrifugação); Precipitação: centrifugação para precipitação do pellet.

A etapa de purificação foi responsável por 60 e 76 % dos custos totais dos protocolos de Faleiro et al. (2003) e Silva (2010), respectivamente, sendo que no primeiro são realizadas duas limpezas com CIA, uma com CTAB e uma com RNase, enquanto no segundo, além da limpeza por CTAB, a limpeza com CIA é repetida por três vezes, o que aumenta o gasto com estes reagentes.

Tabela 4 – Custos dos reagentes utilizados nas principais etapas dos protocolos de extração de DNA estudados (R\$)¹.

Procedimento	Protocolo		
	SDS + Triton X-100	Faleiro et al. (2003)	Silva (2010)
Extração	0,762	0,113	0,093
Purificação	-	0,704	0,861
Precipitação	0,133	0,361	0,181
Custo total	0,895	1,178	1,135

¹ Valor de cada reagente por quilograma ou litro: SDS (R\$ 2.039,00/kg), Triton X-100 (R\$ 403,00/L), NaCl (R\$ 496,00/kg), EDTA (R\$ 641,00/kg), NaOH (R\$ 779,00/kg), Tris-base (R\$ 1.102,00/kg); Precipitação: etanol absoluto (R\$ 133,00/L), CTAB (R\$ 2.068,00/kg), PVP (R\$ 1.569,00/kg), β-mercaptoetanol (R\$ 774,00/L), clorofórmio (R\$ 476,00/L), álcool isoamílico (R\$ 380,00/L), RNase (R\$ 5.846,00/kg), isopropanol (R\$ 258,00/L).

Como o tempo total gasto no nosso protocolo foi inferior aos demais, consequentemente, os custos com mão de obra também foram inferiores (Tabela 5).

Enquanto nosso protocolo gasta apenas R\$ 7,39 para execução de suas principais etapas, no protocolo descrito por Faleiro et al. (2003) esse custo chegou a R\$ 61,15.

Tabela 5 – Custos com mão de obra para realização das principais etapas dos protocolos de extração estudados (R\$)¹.

Procedimento	Protocolo		
	SDS + Triton X-100	Faleiro et al. (2003)	Silva (2010)
Extração	3,82	15,29	7,64
Purificação	1,78	12,74	11,47
Precipitação	1,78	33,12	1,27
Custo total	7,39	61,15	20,38

Considerando o tempo de execução das três principais etapas dos métodos de extração testados e o uso de uma micro centrífuga com capacidade para 24 amostras, como à usada em nosso laboratório, por meio do protocolo SDS + Triton X-100, 384 amostras de DNA podem ser extraídas por uma pessoa durante um dia de trabalho. Já para os protocolos de Faleiros et al. (2003) e Silva (2010), a capacidade de extração diária por uma pessoa, nas mesmas condições, é reduzida para cerca de 48 e 144 amostras, respectivamente, o que dificulta a aplicação destes métodos quando a análise de um elevado número de indivíduos é requerida.

Portanto, além de eficiente, quando comparado aos demais protocolos testados para um maior número de espécies do Cerrado, o protocolo descrito no capítulo 3 mostra-se menos tóxico, mais rápido e mais barato. Ou seja, ideal para análises moleculares com as espécies do bioma.

5 CONCLUSÕES

Diante do exposto, conclui-se que o protocolo aqui apresentado, baseado no uso conjunto de SDS e Triton X-100 para lise celular, é eficiente na extração de DNA íntegro, puro e em boa quantidade para análises moleculares de plantas do Cerrado,

além de poder ser utilizado com sucesso para outras espécies vegetais. O método é mais simples, seguro, barato e rápido quando comparado aos demais já descritos na literatura para extração de DNA de plantas do bioma. Assim, a sua utilização será de grande valia para facilitar e aprimorar estudos moleculares que visem à conservação ou à utilização econômica das plantas do bioma.

REFERÊNCIAS

- AHMADI, E.; KOWSARI, M.; AZADFAR, D.; JOUZANI, G.S. Rapid and economical protocols for genomic and metagenomic DNA extraction from oak (*Quercus brantii* Lindl.). *Annals of Forest Science*, v. 75, n. 43, p. 1-14, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13595-018-0705-y>.
- ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. *Cerrado: espécies vegetais úteis*. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1998.
- ALMEIDA N. F; MORI F. A; GOULART S. L; MENDES L. M. Estudo da reatividade de taninos de folhas e cascas de barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. *Scientia Forestalis*, v. 38, n. 87, p. 401-408, 2010.
- AMBAWAT, S.; KUMAR, R.; SINGH, S.; YADAV, R. An easy, quick and cost effective method of high quality DNA extraction from Mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] without liquid nitrogen. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 6, n. 9, p. 2695-2703, 2017. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.609.332>.
- ANTANAVICIUTE, L.; HARRISON, N.; BATTEY, N.H.; HARRISON, R.J. An inexpensive and rapid genomic DNA extraction protocol for rosaceous species. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, v. 90, n. 4, p. 427-432, 2015. <https://doi.org/10.1080/14620316.2015.11513205>.

BASHALKHANOV, S.; RAJORA, O.P. Protocol: A high-throughput DNA extraction system suitable for conifers. *Plant Methods*, v. 4, n. 20, 2008. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-4-20>.

BIRAL, L.; LOMBARDI, J.A. *Celastraceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17787>>. Acesso em: 26 Nov. 2018.

BORGES, J.C. *Atividade antimicrobiana de extrato de Brosimum gaudichaudii Trécul. contra bactérias isoladas de lesões de pés diabéticos*. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Tocantins, Palmas.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Eds.). *Marcadores moleculares*. Viçosa: Editora UFV, 2016. p. 9-93.

CARVALHO, P.E.R. *Espécies Arbóreas Brasileiras: Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras*. v. 1. Brasília: Embrapa Floresta, 2003.

CARVALHO, M.C.C.G.; SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Ciência Rural*, v. 40, n. 3, p. 735-744, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010000300040>.

CIPRIANO, J.; MARTINS, L.; DEUS, M.S.M.; PERON, A.P. O gênero hymenaea e suas espécies mais importantes do ponto de vista econômico e medicinal para o Brasil. *Caderno de Pesquisa: Série Biologia*, v. 26, n. 2, p. 41-51, 2014. <http://dx.doi.org/10.17058/cp.v26i2.5248>.

COLEY, P.D.; BRYANT, J.P.; CHAPIN, F.S. Resource availability and plant antiherbivore defens. *Science*, v. 230, n. 4728, p. 895-899, 1985. <https://doi.org/10.1126/science.230.4728.895>.

CORRÊA, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.

COSTA, A.G.L.C. *Estudo químico de Baccharis dracunculifolia DC. e sua correlação com a própolis de uma microrregião dos campos gerais do Paraná*. 2009. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.

CRUZ, C.D.; FERREIRA, F.M.; PESSONI, L.A. *Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética*. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011.

DEHESTANI, A.; TABAR, S.K.K. A rapid and 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. <https://doi.org/10.3923/ajps.2007.977.981>.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, v. 19, p. 11-15, 1987.

DURIGAN, G.; BAITELLO, J.B.; FRANCO, G.A.D.C.; SIQUEIRA, M.F. *Plantas do Cerrado paulista: imagem de uma paisagem ameaçada*. São Paulo: Página & Letras Editora e Gráfica, 2004.

DURIGAN, G.; RATTER, J.A. The need for a consistent fire policy for Cerrado conservation. *Journal of Applied Ecology*, v. 53, p. 11-15, 2016. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12559>.

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 nº 92. Planaltina: Embrapa, 2003.

FALEIRO, F.G. *Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos*. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FERREIRA, A.L. *Atividade antiulcerogênica da espécie Anacardium humile St. Hil. (Anacardiaceae)*. 2005. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Farmacologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

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

FIGUEIREDO, C.C.; RAMOS, L.M.G.; TOSTES, R. Propriedades físicas e matéria orgânica de um latossolo vermelho sob sistemas de manejo e cerrado nativo. *Bioscience Journal*, v. 24, n. 3, p. 24-30, 2008.

GIUSTI, J.; KETTENER, K.; FUCHS-FERRAZ, M.C.P. Influência do sequenciamento de nova geração no futuro da genética da conservação. *Revista RG News*, v. 2, n. 2, p. 88-99, 2016.

HEIDEN, G.; SCHNEIDER, A. 2015. *Baccharis in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5177>>. Acesso em: 26 Nov. 2018.

HENRIQUES, R.P.B. Influência da história, solo e fogo na distribuição e dinâmica das fitofisionomias no bioma do Cerrado. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. (Org.). *Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. p. 73-92.

KER, J.C. Latossolos do Brasil: uma revisão. *Geonomos*, v. 5, n. 1, p. 17-40, 1997.

KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

KLINK, C.A. Policy intervention in the Cerrado savannas of Brazil: changes in land-use and effects on conservation. In: CONSORTE-MCCREA, A.G.; SANTOS, E.F. (Eds.). *Ecology and conservation of the maned wolf: multidisciplinary perspectives*. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2013. p. 293-308. <https://doi.org/10.1201/b15607-26>.

KOTCHONI, S.O.; GACHOMO, E.W. A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plants. *Molecular Biology Reports*, v. 26, p. 1633-1636, 2009. <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9362-9>.

LICKFELDT, D.W.; HOFMANN, N.E.; JONES, J.D.; HAMBLIN, A.M.; VOIGT, T.B. Comparing three DNA extraction procedures for cost, efficiency, and DNA yield. *HortScience*, v. 37, p. 822-825, 2002. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.37.5.822>.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Vol. 2. 2 ed. São Paulo: Plantarum, 1998.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Vol. 1. 5 ed. São Paulo: Plantarum, 2008.

LUZ, C.L.S.; MITCHELL, J.D.; MITCHELL, J.D.; MITCHELL, J.D.; MITCHELL, J.D.; PIRANI, J.R. *Anacardiaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15463>>. Acesso em: 26 Nov. 2018.

MARTINOTTO, C.; PAIVA, R.; SOARES, F.P.; SANTOS, B.R.; NOGUEIRA, R.C. Cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.). *Boletim Técnico nº 78*, Lavras, p. 1-21, 2008.

MARTINS, W.A.; MANTELLI, M.; SANTOS, S.C.; NETTO, A.P.C.; PINTO, F. Estaquia e concentração de reguladores vegetais no enraizamento de *Campomanesia adamantium*. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 38, n. 1, p. 58-64, 2015. <https://doi.org/10.19084/rca.16869>.

MATUDA, T.G.; MARIA NETTO, F. Caracterização química parcial da semente de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 2, p. 353-357, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000200029>.

MEDEIROS, J.D. *Guia de campo: vegetação do Cerrado 500 espécies*. Brasília: MMA/SBF, 2011.

MENEZES, H. 2005. Avaliação da atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). In: 18 RAIB. São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*. São Paulo: Instituto Biológico, v. 72. p. 33-33, 2005.

MIRANDA, E.A.G.C. *Transferibilidade e validação de marcadores microssatélites derivados de EST para duas espécies de Campomanesia (Myrtaceae) do Cerrado*. 2014. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2014.

MITTERMEIER, C.G.; TURNER, W.R.; LARSEN, F.W.; BROOKS, T.M.; GASCON, C. Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots. In: ZACHOS, F.E.; HABEL, J.C. (Eds.). *Biodiversity hotspots: distribution and protection of priority conservation areas*. Berlin: Springer-Verlag, 2011. p. 3-22. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20992-5_1.

MOREIRA, P.A.; OLIVEIRA, D.A. Leaf age affects the quality of DNA extracted from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), a tropical tree species from the Cerrado region of Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v. 10, n. 1, p. 353-358, 2011. <https://doi.org/10.4238/vol10-1gmr1030>.

MORIM, M.P. *Anadenanthera in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB18075>>. Acesso em: 26 Nov. 2018.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v. 403, p. 853-858, 2000. <https://doi.org/10.1038/35002501>.

NOLETO, M.G. *Longevidade foliar, compostos fenólicos e nitrogenados em árvores e lianas d um fragmento de Cerrado na Estação Experimental de Itirapina, São Paulo*. 2010. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

OLIVEIRA, M.E.S. *Elaboração de bebida alcóolica fermentada de cagaita (Eugenia dysenterica, DC) empregando leveduras livres e mobilizadas*. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PASCOAL, A.M. *Extração e caracterização do amido de lobeira (Solanum lycocarpum)*. 2014. Tese (Doutorado em Biologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

PARK, Y.K.; PAREDES-GUZMAN, J.F.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; FUJIWARA, F.Y. Chemical constituents in *Baccharia dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 52, n. 5, p. 1100-1103, 2004. <https://doi.org/10.1021/jf021060m>.

PEGORINI, F.; MARANHO, L.T.; ROCHA, L.D. Organização estrutural das folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 89, n. 3, p. 272-275, 2008.

PELLOSO, I.A.O. *Caracterização fenotípica de frutos e desenvolvimento inicial de plantas de Campomanesia adamantium (Cambess.) O. Berg, em Mato Grosso do Sul*. 2011. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2011.

PEREIRA, M.F.; VALVA, F.D.; COELHO, A.S.G.; AGUIAR, A.V.; ZUCCHI, M.I. Estrutura genética de populações de espécies arbóreas nativas do cerrado encontradas em terrenos serpentínicos. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 34, n. 2,

p. 75-82, 2004.

PEREIRA, M.G.; RAMOS, H.C.C.; PEREIRA, T.N.S.; BATISTA, F.R.C. Marcadores moleculares no pré-melhoramento. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Eds.). *Marcadores moleculares*. Viçosa: Editora UFV, 2016. p. 94-128.

PINTO, R.B.; TOZZI, A.M.G.A.; MANSANO, V.F. *Hymenaea in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB83206>>. Acesso em: 27 Nov. 2018.

POZETTI, G.L. *Brosimum gaudichaudii* Trecul (Moraceae): da planta ao medicamento. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 26, n. 3, p. 159-166, 2005.

RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. (Eds.). *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina: Embrapa CPAC, 2008. p. 89-166.

RIBEIRO, R.A.; RODRIGUES, F.M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 5, n. 3, p. 253-260, 2006.

RODRIGUES, E.B. *Variabilidade genética populacional em variedades botânicas de Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae): estratégias para conservação no cerrado*. 2015. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

RODRIGUES, P.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Toxic reagents and expensive equipment: are they really necessary for the extraction of good quality fungal DNA? *Letters in Applied Microbiology*, v. 66, p. 32-37, 2017. <https://doi.org/10.1111/lam.12822>.

ROMANIUC NETO, S.; CARAUTA, J.P.P.; VIANNA FILHO, M.D.M.; PEREIRA, R.A.S.; RIBEIRO, J.E.L.S.; MACHADO, A.F.P.; SANTOS, A.; PELISSARI, G.;

PEDERNEIRAS, L.C. 2015. *Moraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB19772>>. Acesso em: 27 Nov. 2018.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de plantas do Cerrado: soluções para problema comumente encontrados. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v. 2, n. 9, p. 40-43, 1999.

SAHU, S.K.; TANGARAJ, M.; KATHIRESAN, K. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *ISRN Molecular Biology*, article ID 205049, 2012. <https://doi.org/10.5402/2012/205049>.

SANTOS, D.Y.A.C. *Botânica aplicada: metabólitos secundários na interação planta-ambiente*. 2015. Tese (Livre Docência em Recursos Econômicos Vegetais) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SEMAGN, K. Leaf tissue sampling and DNA extraction protocols. In: BESSE, P. (Ed.). *Molecular plant taxonomy: methods and protocols*. New York: Human Press, 2014. p. 53-67. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-767-9_3.

SHI, R.; PANTHEE, D.R. A novel plant DNA extraction method using filter paper-based 96-well spin plate. *Planta*, v. 246, p. 579 - 584, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2743-3>.

SILVA, R.S.; CHAVES, L.J.; NAVES, R.V. Caracterização de frutos e árvores de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) no sudeste do estado de Goiás, Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 23, n. 2, p. 330-334, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452001000200026>.

SILVA, J.M.C.; BATES, J.M. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. *BioScience*, v. 52, n. 3, p. 225-233, 2002. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2002\)052\[0225:BPACIT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2002)052[0225:BPACIT]2.0.CO;2).

SILVA, M.N. Extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do cerrado. *Revista Árvore*, v. 34, n. 6, p. 973-978, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622010000600002>.

SILVA, N.L.A.; MIRANDA, F.A.A.; CONCEIÇÃO, G.M. Triagem fitoquímica de plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. *Scientia Plena*, v. 6, n. 2, p. 1-17, 2010.

SILVA JÚNIOR, M.C. *100 Árvores do Cerrado: guia de campo*. Brasília: Rede de Sementes do Cerrado, 2005.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. 2015. *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10308>>. Acesso em: 17 jul. 2017.

SOLANUM in *Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB14805>>. Acesso em: 26 Nov. 2018.

SOUZA, H.A.V.; MULLER, L.A.C.; BRANDÃO, R.L.; LOVATO, M.B. Isolation of high quality and polysaccharide-free DNA from leaves of *Dimorphandra mollis* (Leguminosae), a tree from the Brazilian Cerrado. *Genetics and Molecular Research*, v. 11, n. 1, p. 756-764, 2012. <https://doi.org/10.4238/2012.March.22.6>.

SOUZA, V.C.; GIBAU, A. 2018. *Stryphnodendron in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB19133>>. Acesso em: 28 Nov. 2018.

STEHMANN, J.R.; MENTZ, L.A.; AGRA, M.F.; VIGNOLI-SILVA, M.; GIACOMIN, L.; RODRIGUES, I.M.C. 2015 *Solanaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14805>>. Acesso em: 06 Dez. 2018.

STRASSBURG, B.B.N.; BROOKS, T.; FELTRAN-BARBIERI, R.; IRIBARREM, A.; CROUZEILLES, R.; LOYOLA, R.; LATAWIEC, A.E.; OLIVEIRA-FILHO, F.J.B.; SCARAMUZZA, C.A.M.; SCARANO, F.R.; SOARES-FILHO, B.S.; BALMFORD, A. Moment of truth for the Cerrado hotspot. *Nature Ecology & Evolution*, v. 1, p. 1-3, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0099>.

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

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

VALLILO, M.I.; BUSTILLOS, O.V.; AGUIAR, O.T. Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O.Berg – Myrtaceae. *Revista do Instituto Florestal*, v. 18, p. 15-22, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000400015>.

VALLILO, M.I.; LAMARDO, L.C.A.; GABERLOTTI, M.L.; OLIVEIRA, E.; MORENO, P.R.H. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O.Berg. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 4, p. 805-810, 2006.

XIN, Z.; CHEN, J. A high throughput DNA extraction method with high yield and quality. *Plant Methods*, v. 8, n. 26, 2012. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-26>.

ZHANG, L.; DAI, L.; GOU, J.; PENG, J. An effective protocol to solve the problem in genomic DNA isolation of tung tree. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, v. 22, p. 492-497, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13562-012-0183-5>.

ANEXO – NORMAS DA REVISTA *MOLECULAR BIOLOGY REPORTS*

1 Guidelines for short communication articles

Article Length: 2,500 words or less. References: 25 or less. Results and Discussion sections may be combined. Figures and/or Tables: 3 or less. Article must contain clinical significance.

2 Abstract format

Max Word Count: 250 words.

Format: The abstract should be presented divided into subheadings as follows:

I. Background: Brief summary of basic, relevant background info (2-3 sentences). Rationale and purpose of the study.

II. Methods and Results: Brief explanation of experimental procedure and presentation of significant results. Include sample sizes as well as animal species if applicable.

III. Conclusions: Succinct interpretation of results as well as significance of findings. Statement of the main conclusion of the study. Emphasis should be on new information found during study.

3 Review article guidelines

Max Word Count: 12,000 words (including the abstract).

Format: A strong review article will present novel concepts or approaches that are

defined based on the contributions of several researches engaged in a particular subject. They focus on a single topic of a field and not broad generalized discussion of literature. They should not be focused on the author's own work but should try to incorporate the work of several different researchers. Authors should write the review taking into consideration both general and specialized readers. Language should be simple, new concepts should be defined and specialized terminology must be explained.

The article should include a short abstract, approximately 200 words in length. It should be used to arouse the interest of the reader and should not be simple in language.

The main text of the review article should be divided into sections. Examples for headings include: Background, Recent Studies and Results, Points of Dispute or Unanswered Questions, Potential Research/Future.

The majority of the review should focus on the most recent findings and their implications. Points of dispute or controversial ideas should not be overlooked or ignored. Authors should consider the future direction for further research as well as provide information for studies that are currently going on.

Where appropriate, illustrations and tables are useful tools for explaining concepts but must be sufficiently explained as to avoid confusion. Again consideration must be made for general readership.

4 Manuscript submission

4.1 Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for

compensation.

4.2 Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

4.3 Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

5 Title page

5.1 Title Page

The title page should include: The name(s) of the author(s). A concise and informative title. The affiliation(s) and address(es) of the author(s). The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author. If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

5.2 Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

5.3 Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

6 Text

6.1 Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word. Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text. Use italics for emphasis. Use the automatic page numbering function to number the pages. Do not use field functions. Use tab stops or other commands for indents, not the space bar. Use the table function, not spreadsheets, to make tables. Use the equation editor or MathType for equations. Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions). Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

6.2 Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

6.3 Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

6.4 Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

6.5 Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

7 References

7.1 Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples: Negotiation research spans many disciplines [3]. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5]. This effect has been widely studied [1-3, 7].

7.2 Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article: Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted: Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI: Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

Book: South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter: Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document: Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation: Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see ISSN.org LTWA. If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

8 Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

9 Artwork and illustrations guidelines

9.1 Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

9.2 Halftone Art

Halftone gray color

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

9.3 Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

9.4 Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

9.5 Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

9.6 Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

9.7 Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

9.8 Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

9.9 Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that.

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware).

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements).

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1.