



Artigo Original

Comparação de protocolos para extração de DNA genômico de *Calotropis procera* Ait. R. Br. (Apocynaceae: Asclepiadoideae)

Cibelle Santos Dias¹, Luiz Henrique Tolentino Santos², Jardyelle Carvalho Lima³, Ana Beatriz Luz Soares³, Elisa Susilene Lisboa dos Santos⁴, Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva^{4*}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 45700-000;

² Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 45700-000;

³ Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 45700-000;

⁴ Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, Brasil *Autor para correspondência: csilva@uesb.edu.br

INFO ARTIGO

Histórico do artigo

Recebido: 31 de maio de 2018

Aceito: 01 de agosto de 2018

Palavras-chave:

Ácidos nucleicos, biologia molecular, flor de seda, genética.

RESUMO

A flor de seda, como é popularmente conhecida a espécie *Calotropis procera* [Ait. R. Br.] é uma planta que possui entre as suas propriedades químicas diversas funcionalidades, podendo ser utilizada como complemento alimentar animal, na medicina tradicional, na indústria cosmética e têxtil, bem como alternativa no combate à pragas e doenças agrícolas. A despeito destes potenciais, são escassos estudos relacionados à diversidade desta espécie, inexistindo, estudos genéticos e moleculares que subsidiem ações de conservação e, ou, melhoramento genético. Considerando que a extração de ácidos nucleicos, em especial de DNA, é a base para diversos estudos genético-moleculares, o objetivo com este trabalho foi comparar a eficiência de sete protocolos de extração de DNA genômico previamente descritos na literatura para outras espécies. Foram utilizadas três amostras foliares por protocolo (sendo adotado o uso de duplicatas para cada amostra), sendo estas amostras coletadas na área de campo experimental da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia. Após as etapas de extração (definidas em cada um dos sete protocolos considerados), foram avaliadas a qualidade e quantidade de DNA obtido, tendo como base o resultado de eletroforeses com gel de agarose a 1%, a leitura espectrofotométrica realizada através do BioDrop µLITE e teste de amplificação com uso de iniciador ISSR. Análises comparativas entre as imagens obtidas a partir das eletroforeses, bem como estatística descritiva (médias e desvios) das estimativas espectrométricas e os padrões de amplificação com uso de iniciador ISSR, atestam para diferença na eficiência dos protocolos, sendo possível indicar quatro destes protocolos (a saber: P1, P2, P4 e P5) como mais eficientes para extração do DNA genômico de *Calotropis procera*.

1. Introdução

A espécie *Calotropis procera*, pertence à família Apocynaceae, subfamília Asclepiadoideae e a tribo Asclepiadeae (Sennblad & Bremer, 2002, Tabatinga Filho, 2008). Essa espécie apresenta ampla distribuição, sendo nativa do sudoeste da Ásia (Índia, Paquistão, Afeganistão, Irã, Arábia Saudita e Jordânia) e da África (Somália, Egito, Líbia, Argélia, Marrocos, Mauritânia e Senegal) (Abbassi et al., 2003), sendo também observada na maior parte das regiões tropicais e semiáridas da América (Ulhoa et al., 2007). No século XIX, *C. procera* foi introduzida no Brasil para ser utilizada como planta ornamental e, em função da sua eficiente adaptação a numerosos ecossistemas, se disseminou pelo País (Lorenzi & Matos, 2002), ocorrendo principalmente na região Nordeste e

no norte do estado de Minas Gerais, além de várias outras regiões, prevalecendo em áreas do cerrado (Ulhoa et al., 2007).

No Nordeste brasileiro a espécie é facilmente encontrada, pois é adaptada a áreas com baixo índice pluviométrico, solos arenosos, pobres em nutrientes, ácidos e degradados (Andrade et al., 2005). Seu rápido estabelecimento e desenvolvimento a torna dominante em ambientes perturbados pela ação humana, assumindo assim o papel de bioindicadora de áreas degradadas (Souto et al., 2008). Enquanto recurso natural, as propriedades químicas de *C. procera*, podem ser aplicadas na medicina tradicional, no complemento na alimentação de ovinos (Torres, et al., 2010) e ruminantes (Garcez, et al., 2014), na agricultura, na indústria têxtil e cosmética, bem como no combate a fungos, vírus e

larvas, através das propriedades químicas associadas ao seu látex (Ramos et al., 2009).

Apesar de existir informações disponíveis relacionadas ao potencial enquanto recurso natural e, conseqüente valoração desta espécie, bem como interesse ecológico relacionado ao seu histórico como planta invasora e bioindicadora, pouco se conhece sobre a sua diversidade, inexistindo estudos genéticos e moleculares que possam contribuir para proposições de ações de conservação e melhoramento. A despeito dessa realidade, o conhecimento da diversidade e estrutura genética de populações, bem como as informações genético-moleculares são de grande importância para o avanço na proposição de ações relacionadas a conservação, manejo e melhoramento dos recursos genéticos em geral. Em síntese, a maior parte destes estudos perpassam a obtenção de ácidos nucleicos em quantidades e qualidades específicas, visto que o processo de extração de DNA genômico é parte fundamental para qualquer análise que utilizam técnicas moleculares e sua eficiência está diretamente relacionada com a pureza, quantidade e qualidade das amostras geradas (Demeke & Jenkins, 2010). Desta forma, a realização de estudos associados a comparação, seleção e, ou otimização de protocolos para extração de ácidos nucleicos em diferentes espécies tem sido observada na literatura (Matos-Oliveira et al., 2017, Oliveira et al., 2015, Scaldaferrri et al., 2013; Corrêa et al., 2013, Costa et al., 2012).

Com intuito de gerar subsídios para o avanço de pesquisas relativas a caracterizações genéticas e moleculares em *Calotropis procera*, o objetivo com este trabalho foi testar e comparar a eficiência de sete protocolos de extração de DNA genômico previamente descritos na literatura para outras espécies.

2. Material e Métodos

Amostras de tecido foliar jovem de três espécimes de *Calotropis procera* foram coletados na área de campo experimental da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB, *campus* Juvino de Oliveira), no município de Itapetinga, Bahia, e transferidos para o Laboratório de Genética Molecular Aplicada (LGMA) da mesma universidade, onde foram armazenados em freezer -20°C.

Para os testes de extração de DNA genômico, foram avaliados sete protocolos previamente descritos na literatura (Tabela 1). Para todos os sete protocolos foram realizadas três extrações e cada uma destas extrações realizadas em duplicata, utilizando 0,1 g de tecido foliar e 3 ml de solução tampão (referente a composição descrita originalmente em cada protocolo).

Tabela 1: Descrição geral dos sete protocolos (P1 a P7) utilizados para os testes de extração de DNA genômico de *Calotropis procera*.

| Protocolos | Referências | Tampão de Extração |
|------------|--|---------------------|
| P1 | Sunnucks & Hales (1996) | SDS* 10% |
| P2 | Doyle & Doyle (1990) | CTAB** 5% |
| P3 | Rogstad (1992) - Modificado Storchova et al. (2000) | Manitol |
| P4 | Russel et al. (2010) | Sorbitol |
| P5 | Mogg & Bond (2003) | SDS 0,7% e NaCl |
| P6 | Barnwell et al. (1998) | CTAB 2% |
| P7 | Doyle & Doyle (1990) - Modificado Silva (2014) | CTAB 2% e NaCl 1,4M |

* *Sodium Dodecyl Sulfate*. ** *Cetyl Trimethylammonium Bromide*

As estimativas da qualidade e da concentração de DNA obtidas com os protocolos de extração foram avaliadas em gel de agarose a 1% (m/v) por eletroforese (90 minutos

sob uma tensão elétrica de 90 V) e visualizadas com uso de GelRed (Biotium) e sistema de fotodocumentação Kodak (KODAK MI Software) com incidência de luz ultravioleta. A quantificação da concentração de DNA (ng/μl) foi estimada utilizando diluições do marcador de peso molecular (DNA Lambda; Invitrogen) nas concentrações de 25, 50 e 100 ng/μl. Também foram realizadas estimativas de concentração e pureza das amostras por meio da leitura espectrofotométrica (razões de absorvância A260/230 e A260/280) utilizando o BioDrop μLITE (Whitehead Scientific). A proporção de absorvância A260/230 para DNA estão geralmente na faixa entre 2,0 e 2,2 e a proporção de absorvância A260/280 é utilizada para avaliar a pureza do DNA e RNA, sendo considerado como puros valores de $\approx 1,8$ para DNA e $\approx 2,0$ para RNA (Nelson & Cox, 2004).

Para as leituras espectrofotométricas foram utilizadas alíquotas de 1μl de DNA de cada um dos sete protocolos testados. Médias e desvio-padrão foram calculados para os resultados observados em cada protocolo com uso do programa BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007).

Para avaliar a qualidade e a viabilidade de uso do DNA extraído em ampliações na plataforma PCR (Polymerase Chain Reaction), foram realizados testes de amplificação com uso do iniciador ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) DiGA 3'T (5' - GAG AGA GAG AGA GAG AT - 3'). Os testes foram realizados no LGMA adotando-se os seguintes programas de amplificação: 5 minutos a 94°C seguido por 34 ciclos (50 segundos a 94°C; 50 segundos a 48°C e 1 minuto a 72°C) finalizando com 5 minutos a 72°C. Os padrões de amplificação foram avaliados por eletroforese (120 minutos sob uma corrente elétrica de 120 V) em gel de agarose a 2% (m/v) com solução de corrida TBE 0,5X (Tris-Ácido Bórico-EDTA). Os resultados foram visualizados com uso de GelRed (Biotium) e sistema de fotodocumentação Kodak (KODAK MI Software) com incidência de luz ultravioleta.

3. Resultados e Discussão

Considerando os resultados observados na eletroforese foi possível identificar diferença na eficiência da extração de DNA genômico de *Calotropis procera* entre os sete protocolos considerados (Figura 1). Destaca-se os resultados observados com uso dos protocolos P1 (tampão com Sulfato de Sódio - SDS 10%), P2 (tampão com Brometo de Cetil Trimetil de Amônia - CTAB 5%), P4 (tampão com Sorbitol) e P5 (tampão com Sodium Dodecyl Sulfate - SDS 0,7% e NaCl), onde foi possível verificar a presença de marcas (DNA) definidas, não ocorrendo o mesmo para os protocolos P3 (tampão com Manitol), P6 (tampão com CTAB 2%) e P7 (CTAB 5% com NaCl 1,4M).

Na análise dos dados referentes a leitura espectrofotométrica, observou-se que as médias de absorvância na razão A260/230 variaram entre 0,32 e 2,02 demonstrando, respectivamente, que o P7 foi o menos eficiente e o P4 o mais eficiente quando relacionados com a pureza do DNA (Tabela 2). Os protocolos P1, P2, P3, P5, P6 e P7, geraram amostras contaminadas por fenóis e clorofórmio, visto que obtiveram a média abaixo de 2,0.

Considerando os valores de absorvância na razão A260/280, os protocolos mais eficientes foram os P1 e P4 (com razões de absorvância de 1,74 e 1,96 respectivamente), contrastando com os protocolos P3, P5 e P7 que apresentaram razões de absorvância inferior a 1,5 (Tabela 1). Por sua vez, os protocolos P3, P5, P6 e P7, apresentaram amostras que não são consideradas "puras" por conter componentes interferentes como proteínas e ácidos nucleicos degradados.

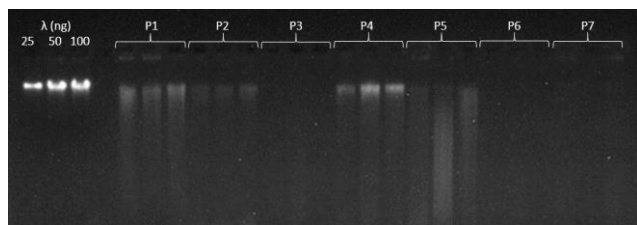


Figura 1: DNA genômico de *Calotropis procera* obtido a partir de sete protocolos de extração que correspondem respectivamente aos protocolos de Sunnucks & Hales (1996) – P1, Método Doyle & Doyle (1990) – P2, Método Modificado por Storchova et al. (2000) – P3, Método Modificado por Russel et al. (2010) – P4, Mogg & Bond (2003) – P5, Barnwell et al. (1998) – P6 e Método Modificado por Silva (1990) – P7.

As estimativas espectrométricas relacionadas a concentração de DNA genômico obtido variaram de 2546,7 ng/ul para o P2 até 28,47 ng/ul para o P6 (Tabela 2). Essa amplitude nas estimativas de concentração de DNA, demonstra a influência que a escolha do método adotado para extração de DNA exerce para *C. procera*. Elevada variação nas concentrações de DNA observada com diferentes protocolos de DNA também foram observadas por Costa et al. (2012) ao comparar cinco protocolos de extração de DNA, baseados no método de CTAB, em *Morinda citrifolia* L (espécie popularmente conhecida como Noni), e por Corrêa et al. (2013) ao realizar uma análise quali-quantitativa da extração de DNA em *Jatropha* spp (espécie popularmente conhecida como Pinhão).

Tabela 2: Valores médios referentes a estimativa da pureza e concentração de DNA por meio da leitura espectrofotométrica (razões $A_{260/230}$ e $A_{260/280}$) utilizando o *BioDrop* μ LITE.

| | $A_{260/230}$ | | $A_{260/280}$ | | Concentração (ng/ul) | |
|----|---------------|--------------|---------------|--------------|----------------------|--------------|
| | Média | Desv. Padrão | Média | Desv. Padrão | Média | Desv. Padrão |
| P1 | 0,912 | 0,338 | 1,737 | 0,205 | 927,783 | 294,921 |
| P2 | 1,874 | 0,279 | 2,090 | 0,075 | 2546,783 | 598,866 |
| P3 | 0,644 | 0,134 | 1,433 | 0,109 | 259,017 | 68,134 |
| P4 | 2,025 | 0,145 | 1,959 | 0,014 | 159,817 | 40,021 |
| P5 | 0,520 | 0,084 | 1,436 | 0,126 | 464,900 | 276,348 |
| P6 | 0,502 | 0,153 | 1,534 | 0,089 | 28,470 | 16,287 |
| P7 | 0,321 | 0,042 | 1,442 | 0,056 | 34,868 | 7,648 |

Os processos envolvidos nas fases de extração do DNA genômico, e a diferença entre os tampões de extração podem interferir na qualidade e quantidade do produto, que no presente estudo é o material genético (DNA) da espécie. De acordo com Costa & Moura (2001), a integridade e qualidade do DNA são fundamentais para o sucesso das etapas posteriores, e estes, dependem da maneira de coletar e armazenar o tecido, do estado vegetativo do material biológico, da adequação do protocolo para a espécie, além do manuseio adequado dos utensílios para evitar a contaminação das amostras.

De acordo as especificações do fabricante do *BioDrop* μ LITE a proporção da absorvância em $A_{260/230}$ é utilizada como medida secundária de pureza do DNA (sendo possível inferir a partir dos seus resultados a presença de fenol e clorofórmio). Ainda segundo os fabricantes do *BioDrop* μ LITE, para considerar o DNA “puro” os valores desta absorvância devem estar entre 2,0 e 2,2. Por sua vez, a estimativa de absorvância em $A_{260/280}$ é utilizada para avaliar a pureza dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), sendo possível inferir a presença de proteína e fenol, dentro outros possíveis contaminantes. Geralmente são consideradas “puras” as amostras que estão

nas proporções aproximadas de 1,8 e 2,0 para DNA e RNA, respectivamente.

Os protocolos que utilizaram tampão SDS nas concentrações 10% e 7% (P1 e P5, respectivamente), obtiveram as médias das razões $A_{260/230}$ e $A_{260/280}$ abaixo de 1,8, evidenciando a presença de contaminantes como fenol, clorofórmio e proteínas. As médias de concentração dos protocolos P1 e P5 indicaram a presença de contaminantes, mas não necessariamente a ausência de DNA genômico, como pode ser observado na imagem da eletroforese (Figura 1).

Ao comparar a eficiência dos protocolos que utilizaram tampão CTAB 5% e 2% (P2, P6 e P7, respectivamente), verificou-se que a diferença na concentração do tampão de extração influenciou na qualidade e quantidade de DNA genômico de *C. procera*. Os protocolos P2, P6 e P7 não geraram amostras de DNA “puras”, porém o protocolo P2 apresentou a média de concentração superior aos protocolos P6 e P7, justificando respectivamente a presença e a ausência de bandas visualizados pela imagem de eletroforese (Figura 1).

Assim como os demais protocolos, o P3 apresentou evidência de contaminação com fenol e clorofórmio e estes, podem ter interferido na visualização do DNA na eletroforese, visto que as amostras apresentaram a média de concentração de ≈ 259 ng/ul. Segundo Sharma et al. (2002), durante o isolamento do DNA, os contaminantes se ligam ao ácido nucleico e quando encontrados em grandes quantidades podem interferir direta ou indiretamente nas reações enzimáticas. De acordo com Porebski et al. (1997), os polifenóis estão presentes em muitas espécies de plantas, sendo este um dos tipos contaminantes responsáveis pela oxidação que reduz o rendimento e a qualidade do DNA extraído. Portanto, o DNA pode estar presente, mas em baixas quantidades nas amostras resultantes da extração utilizando o tampão contendo Manitol.

No P4 (Sorbitol), os valores das razões $A_{260/230}$ (2,02), $A_{260/280}$ (1,95) e concentração (≈ 160 ng/ul) foram satisfatórias, pois indicaram que o protocolo gera amostras de DNA “puras” para ambas as variantes, contribuindo para classificação deste protocolo como mais eficiente para a obtenção de DNA genômico de *Calotropis procera*.

O teste de amplificação das amostras de DNA genômico de *Calotropis procera* obtidas com os sete protocolos de extração e uso do iniciador ISSR - DiGA 3'T (5' - GAG AGA GAG AGA GAG AT - 3'), atesta para eficiência dos protocolos P1, P2, P4 e P5 e ineficiência dos protocolos P3, P6 e P7 em rotinas que envolvam a plataforma de PCR (Figura 2). A ausência de amplificação observada para os protocolos P3, P6 e P7 deve estar relacionada com a presença de contaminantes (fenóis, clorofórmio) e de componentes interferentes (proteínas e ácidos nucleicos degradados), como foi evidenciado nos resultados da análise espectrométrica (Tabela 2), bem como a baixa quantidade de DNA observada nos géis de quantificação para estes protocolos (Figura 1).

A diferença existente entre os protocolos de extração está na composição do tampão. Basicamente, os tampões são compostos por um agente tamponante com o objetivo de dissociar as proteínas do DNA e um detergente para facilitar o rompimento das membranas celulares e contribuir na inativação de algumas enzimas (CHEUNG et al., 1993). Sendo assim, verificou-se que os tampões eficientes para a extração do DNA genômico de *Calotropis procera* são a base de SDS 10% e 0,7%, CTAB 5% e Sorbitol. Todos estes são detergentes cujo objetivo é facilitar o rompimento das membranas celulares. O SDS é um detergente iônico forte que colabora para a precipitação simultânea de proteínas e polissacarídeos e CTAB tem a função de separar os ácidos nucleicos dos

polissacarídeos, e este também está presente no tampão Sorbitol. O papel do NaCl nos tampões de extração é colaborar com a precipitação das proteínas.

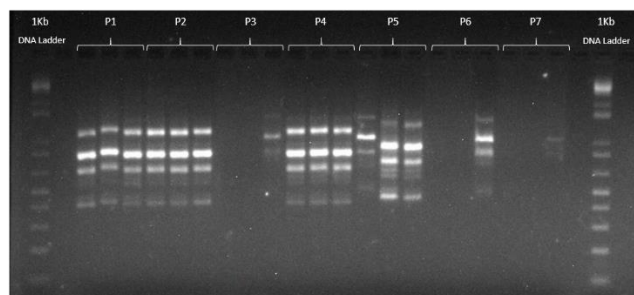


Figura 2: Padrão de amplificação dos fragmentos de DNA genômico de *Calotropis procera* obtidos por meio de sete protocolos de extração e avaliados com o iniciador ISSR - 5' (GA)₈T 3'.

Scaladaferri et al. (2013) ao avaliar a eficiência de seis destes tampões de extração de DNA para a obtenção de DNA genômico de *Croton linearifolius* (Euphorbiaceae), observou que o protocolo P1 (SDS 10%) não foi eficiente, tendo em vista a ausência de bandas detectáveis em gel de agarose. Os demais protocolos foram eficazes para obtenção do DNA genômico de *Croton linearifolius*. Diferente dos resultados obtidos por Scaladaferri et al. (2013), o P1 mostrou-se, no presente estudo, ser eficiente para extração do DNA genômico de *Calotropis procera*, pois gerou uma alta concentração de DNA genômico (ng/μl), como pode ser visualizado na imagem da eletroforese (Figura 1), bem como possibilitou ampliações estáveis no teste de amplificação (Figura 2).

Matos-Oliveira, et al. (2017), comparou a eficiência dos protocolos de extração de DNA genômico testados neste estudo, com exceção do P2 (Método Doyle & Doyle (1990), em espécimes de formigas cortadeiras, *Atta sexdens* (Hymenoptera) e verificou que os protocolos P1 (SDS 10%), P4 (Sorbitol) e P5 (SDS 0,7% com NaCl) são eficientes para a obtenção do DNA genômico de *A. sexdens*. Apesar da diferença entre os tecidos utilizados em ambos experimentos, os resultados se assemelham quanto a eficiência dos protocolos testados em possibilitar a obtenção de DNA em quantidades e qualidades adequadas para estudos genéticos moleculares.

Silva et al. (2014) ao comparar dois protocolos de extração com CTAB nas concentrações de 2% e 5%, observou que o tampão contendo CTAB 5% foi eficiente para a extração do DNA das folhas de *Anacardium giganteum*. De forma semelhante, Schmitt et al. (2014) verificou que o tampão com a concentração de CTAB 2% não foi eficiente enquanto que o tampão com o CTAB 5% foi eficiente para a extração do DNA da espécie *Curcuma longa*. Pires et al. (2013), avaliou diferentes tampões de extração para a obtenção do DNA genômico de *Melocactus coinoides* e verificou a eficiência dos tampões SDS, CTAB e Manitol, classificando-os como tampões que apresentam quantidade e qualidade de DNA adequada para procedimentos de reação em cadeia da polimerase (PCR).

4. Conclusão

A escolha de protocolos e o conseqüente uso de diferentes detergentes interferem no resultado da extração de DNA genômico para a *Calotropis procera*. Em ordem classificatória, os protocolos mais eficientes na obtenção do DNA genômico da espécie, foram: Método Modificado por Russel et al. (2010) (P4), Sunnucks & Hales (1996) (P1), Mogg & Bond (2003) (P5) e o Método Doyle & Doyle (1990) (P2).

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Pós-Graduação em

Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) pela concessão da bolsa de estudo para mestranda CS Dias. À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UESB pela concessão da bolsa de estudo para o Doutorando LHT Santos. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e a FAPESB pelas bolsas de iniciação científica concedidas as graduandas JC Lima e ABL Soares, respectivamente.

5. Referências

- Abbassi, K., Atay-Kadiri, Z., & Ghaout, S. (2003). Biological effects of alkaloids extracted from three plants of Moroccan arid areas on the desert locust. *Physiological Entomology*, 28 (3), 232-236.
- Andrade, M. V. M., Silva, D. S., Andrade, A.P., Medeiros, A. N., & Pinto, M. S. C. (2005). Fenologia da *Calotropis procera* Ait R. Br., em função do sistema e da densidade de plantio. *Arquivo de Zootecnia*, 54(208), 631-634.
- Ayres, M., Ayres Júnior, M., Ayres, D. L. & Santos, A. S. (2007). *BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamiraná.
- Barnwell, P., Blanchard, A. N., Bryant, J. A., & Smirnov, N. (1998). Isolation of DNA from the highly mucilaginous succulent plant *Sedum telephium*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16, 33-138.
- Cerqueira-Silva, C. B. M. (2009). Avaliações biométricas, genéticas e moleculares visando conservação e melhoramento de *Passiflora spp.* (Tese de Mestrado). Universidade Estadual de Santa Cruz, Brasil.
- Cheung, W. Y., Hubert, N., & Landry, R. S. A. (1993). Simple and Rapid DNA Microextraction Method for Plant, Animal, and Insect Suitable for RAPD and Other PCR Analyses. *Genome Research*, 3, 69-70.
- Corrêa, A. A. P., Unêda-Trevisoli, S. H., Pazeto, M. S. R., Vianna, V. F., & Di Mauro, A. O. (2013). Análise quali-quantitativa da extração de DNA em *Jatropha spp.* *Científica*, 41(2), 235-245.
- Costa, D. F., Vieira, F. A., Fajardo, C. G., & Chaga, K. P. T. (2015). Diversidade genética e seleção de iniciadores ISSR em uma população natural de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37(4) 970-976.
- Costa, M. F., Lopes, A. C. A., Valente, S. E. S., Viana, J. P. O., & Gomes, S. O. (2012). Comparação de cinco protocolos de extração de DNA, baseados no método de CTAB, em *Morinda citrifolia* L. Disponível em: <<http://www.sbpnet.org.br/livro/64ra/resumos/resumos/7915.htm>> Acesso em: 20/05/2018.
- Costa, M. R., & Moura, E. F. (2001). *Manual de extração de DNA*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental.
- Demeke, T., & Jenkins, R. (2010). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(6), 1977-1990.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Garcez, B. S., Câmara, C. S., & Vasconcelos, V. R. (2014). Utilização da flor de seda (*Calotropis procera*) e do mata-pasto (*Senna obtusifolia*) na alimentação de ruminantes. *Revista eletrônica Nutritime*, v. 11(3), 3500-3507.
- Matos-Oliveira, C. F., Rocha S. O., Dias, C. S., Santos, E. S. L., & Cerqueira-Silva, C. B. M. (2017). Comparação de protocolos para extração de DNA genômico da espécie

- Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*, 14 (25), 66-76.
- Mogg, R. J., & Bond, J. M. (2003). A cheap, reliable and rapid method of extracting high-quality DNA from plants. *Molecular Ecology Notes*, 3, 666-668.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2004) *Lehninger, Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publishers.
- Oliveira, R. R., Viana, A. J. C., Reátegui, A. C. E., & Vincentz, M. G. A. (2015). An efficient method for simultaneous extraction of high-quality RNA and DNA from various plant tissues. *Genetics and Molecular Research*, 14, 18828-18838.
- Pires, A. P. O., Alves, J. S., Viana, B. O. S., Cerqueira-Silva, C. B. M., & Santos, E. S. L. *Comparação de protocolos para extração de DNA genômico de Melocactus conoideus e teste de amplificação de regiões genômicas usando marcadores RAPD*. Disponível em: < <http://www.sbpnet.org.br/livro/65ra/resumos/resumos/5567.htm> > Acesso em: 20/05/2018.
- Porebski, S., Bailey, L. G., & Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Pant Molecular Biology Reporter*, v.15, 8-15.
- Ramos, M. V., Pereira, D. A., Araújo, E. S., Freitas, C. D., Cavalheiro, M. G., Matos, M. P. V., & Carvalho, A. F. F. U. (2009). Potential of laticifer fluids for inhibiting larvae development of *Stegomyia (Aedes) aegypti*: Evidences for the involvement of proteolytic activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(6), 805-8012.
- Rogstad, S. H. (1992). Saturated NaCl-CTAB Solution as a Means of Field Preservation of Leaves for DNA Analyses. *Taxon*, 41 (4) 701-708.
- Russell, A.; Samuel, R.; Rupp, B. E.; Barfuss, M. H. J. (2010). Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae, Vandaeae, Orchidaceae): Evidence from plastid DNA sequence data. *Taxon*, 59, 389-404.
- Scaldaferrri, M. M., Freitas, J. S., Santos, E. S. L., Vieira, J.G.P. et al. (2013). Comparison of protocols for genomic DNA extraction from 'velame pimenta' (*Croton linearifolius*), a species native to the Caatinga, Brazil. *African Journal of Biotechnology*, 12(30), 4761- 4766.
- Schmitt, K. F. M., Silva, B. M., Rossi, A. A. B., Sander, N., & Silva, C. J. (2014). Estabelecimento e otimização de protocolo para extração e amplificação de DNA em tecido foliar de *Curcuma longa*. (L). *Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer*, 10(18), 1560.
- Sennblad, B., & Bremer, B. (2002). Classification of Apocynaceae s.l. According to a New Approach Combining Linnaean and Phylogenetic Taxonomy. *Systematic Biology*, 5(3), 389-409.
- Sharma, A. D., Gill, P. K., & Singh, P. (2002). DNA Isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. *Pant Molecular Biology Reporter*, 20(4), 415-415.
- Silva, B. M., Dalbosco, E. Z., Botini, N., Faria, R. B., & Rossi, A. A. B. (2014). Protocolo para extração de dna genômico de *Anacardium giganteum* W. Hancock Ex Engl. (Anacardiaceae). *Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer*, 10(19), 2401.
- Souto, P. C., Sales, S. C. V., Souto, J. S., Santos, R. V., & Sousa, A. A. (2008). Biometria de Frutos e Número de Sementes de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br no Semi-Árido da Paraíba. *Revista Verde*, 3(1), 108-113.
- Štorchová, H., Hrdličková, R., Chrtek, J., & Tetera, M. (2000). An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution. *Taxon*, 49(1), 79-84.
- Sunnucks, P., & Hales, D. F. (1996). Numerous Transposed Sequences of Mitochondrial Cytochrome Oxidase I-II in Aphids of the Genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Molecular Biology and Evolution*, 13(3), 510-524.
- Tabatinga Filho, G. M. (2008). Fenologia, biologia reprodutiva e ecologia da polinização de *Calotropis procera* Ait. R. Br. (Apocynaceae:Asclepiadoideae). (Dissertação Mestrado). Universidade federal de Pernambuco, Brasil.
- Torres, J. F., Braga, A. P., Lima, G. F. Da C., Rangel, A. H. Do N., Lima Júnior, D. M., Maciel, M. V., & Oliveira, E. O. (2010). Utilização do feno de flor-de-seda (*Calotropis procera* Ait. R. Br) na alimentação de ovinos. *Acta Veterinaria Brasilica*, 4(1), 42-50.
- Štorchová, H., Hrdličková, R., Chrtek, J., Tetera, M., Fitze, D., Fehrer, J. (2000). An Improved Method of DNA Isolation from Plants Collected in the Field and Conserved in Saturated NaCl/CTAB Solution. *Taxon*, 49 (1), 79-84.
- Ulhôa, N., Fernandes, G. W., & Almeida-Cortez, J. (2007). As cidades e suas perdas. Uma estranha na paisagem: planta com múltiplas aplicações em sua area de origem e séria ameaça a regiões invadidas. *Ciência Hoje*, 41(241), 70-72.