

Análise quali-quantitativa do DNA genômico extraído de folha e estipe de x *Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster

Quali-quantitative analysis of genomic DNA taken from the leaf and stipe of x *Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster

Análisis cuali-cuantitativo de ADN genômico extraído de hoja y estípite de x *Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster

Recebido: 15/07/2022 | Revisado: 30/07/2022 | Aceito: 02/08/2022 | Publicado: 11/08/2022

Patrícia de Oliveira Neves

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5729-1599>
Universidade Federal do Pampa, Brasil
E-mail: patricianeves@unipampa.edu.br

Antônio Batista Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0368-4594>
Universidade Federal do Pampa, Brasil
E-mail: batistapereira@unipampa.edu.br

Andrés Delgado Cañedo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8377-6204>
Universidade Federal do Pampa, Brasil
E-mail: andrescanedo@unipampa.edu.br

Velci Queiroz de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6890-6015>
Universidade Federal do Pampa, Brasil
E-mail: velcisouza@unipampa.edu.br

Bruna Lucia Laindorf

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9418-2567>
Secretaria de Educação do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil
E-mail: laindorf@gmail.com

Maike Brum Azambuja

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6674-274X>
Universidade Federal do Pampa, Brasil
E-mail: maikeazambuja.aluno@unipampa.edu.br

Lurdes Zanchetta da Rosa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2885-7212>
Universidade Federal do Pampa, Brasil
E-mail: lurdesrosa.aluno@unipampa.edu.br

Resumo

Ferramentas de identificação baseadas em DNA são de suma importância em estudos genéticos de plantas, onde o isolamento e a purificação são passos cruciais. O objetivo do presente estudo foi testar a eficiência de métodos de conservação e de maceração de materiais biológicos na extração de DNA genômico de folha e estipe de x *Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster. Os dados foram analisados com ajuda do software Genes via análise de variância, considerando o esquema fatorial 3x2x2x2, com três repetições (três espécimes do híbrido; dois tipos de material biológico, estipe e folha; dois tipos de conservação, fresco e desidratado; dois tipos de maceração, com e sem nitrogênio líquido). As médias foram analisadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro. O DNA genômico foi avaliado por espectrofotometria para determinar a concentração. A integridade foi determinada por eletroforese em gel de agarose. Foram utilizados dois primers da família gênica WRKY para testar a qualidade do DNA obtido em reações de PCR. As análises estatísticas revelaram diferenças significativas nas concentrações de DNA entre os métodos avaliados. Obteve-se maiores quantidades de DNA a partir da extração de folhas frescas quando comparadas às folhas desidratadas. O rendimento do DNA a partir de estipe fresco e desidratado não variou entre os métodos testados. O uso de nitrogênio líquido pode ser dispensado, conforme resultado dos padrões das bandas nas reações de PCR. Foi possível extrair DNA de qualidade e quantidades suficientes dos materiais biológicos de x *B. nabonnandii*, que amplificaram as regiões genômicas de interesse.

Palavras-chave: Arecaceae; Extração de DNA; Nitrogênio líquido; Rendimento do DNA; Palmeira híbrida.

Abstract

DNA-based identification tools are of great importance in plant genetic studies, where DNA isolation and purification are crucial steps. The aim of the present study was to test the efficiency of conservation and maceration methods of biological materials in the extraction of genomic DNA from leaf and stipe of *x Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster. The data were analyzed with the help of the software Genes via variance analysis, considering the factorial scheme 3x2x2x2, with three replications (three specimens of the hybrid; two types of biological material – stipe and leaf; two types of conservation – fresh and dehydrated; two types of maceration – with and without liquid nitrogen). The means were analyzed by Tukey test at 5% error probability. Genomic DNA was evaluated by spectrophotometry to determine the concentration. Integrity was determined by agarose gel electrophoresis. Two primers from the WRKY gene Family were used to test the quality of the DNA obtained in PCR reactions. Statistical analyses revealed significant differences in DNA concentrations between the evaluated methods. Higher amounts of DNA were obtained from the extraction of fresh leaves when compared to dehydrated ones. DNA yield from fresh and dehydrated stipe did not vary between the methods tested. The use of liquid nitrogen can be dispensed, as a result of band patterns in PCR reactions. It was possible to extract quality DNA and sufficient amounts of biological materials from *x B. nabonnandii*, which amplified the genomic regions of interest.

Keywords: Arecaceae; DNA extraction; Liquid nitrogen; DNA yield; Hybrid palm.

Resumen

Las herramientas de identificación de ADN son de gran importancia en los estudios genéticos de plantas, donde el aislamiento y la purificación son pasos cruciales. El objetivo del presente estudio fue probar la eficiencia de los métodos de conservación y maceración de muestras de hoja y estípote de *x Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster en la extracción de ADN genómico. Los datos fueron analizados con el software Genes mediante análisis de varianza, considerando el esquema factorial 3x2x2x2 con tres repeticiones (tres ejemplares del híbrido; dos tipos de material biológico, estípote y hoja; dos tipos de conservación – fresco y deshidratado; dos tipos de maceración – con y sin nitrógeno líquido). Las medias se analizaron por el test de Tukey con 5% de probabilidad de error. El ADN genómico fue evaluado por espectrofotometría para determinar la concentración. La integridad se determinó por electroforesis en gel de agarosa. Se utilizaron dos iniciadores de la familia de genes WRKY para comprobar la calidad del ADN obtenido en reacciones de PCR. Los análisis estadísticos revelaron diferencias significativas en las concentraciones de ADN entre los métodos evaluados. Se obtuvieron mayores cantidades de ADN en la extracción de hojas frescas en comparación con las hojas deshidratadas. El rendimiento de ADN del estípote fresco y deshidratado no varió entre los métodos probados. Se puede prescindir del uso de nitrógeno líquido como resultado de los patrones de bandas en las reacciones de PCR. Fue posible extraer ADN de calidad y cantidades suficientes de material biológico de *x B. nabonnandii*, que amplificó las regiones genómicas de interés.

Palabras clave: Arecaceae; Extracción de ADN; Nitrógeno líquido; Rendimiento de ADN; Palma híbrida.

1. Introdução

O isolamento e a purificação do DNA são passos cruciais em técnicas moleculares usadas em estudos de plantas para a identificação de genótipos, características econômicas associadas a genes de interesse e diversidade genética (Aboul-Maaty & Oraby, 2019). Ferramentas de identificação baseadas em DNA estão ganhando importância em estudos genéticos de plantas (Hegde et al., 2017), onde o estágio mais importante de qualquer técnica baseada em DNA é conseguir isolar e amplificar o DNA genômico obtido de tecidos vegetais (Mo & Wangsomnuk, 2021).

Tradicionalmente, as folhas são usadas como fonte principal de DNA genômico (Colpaert et al., 2005; Novaes et al., 2009; Aydin et al., 2020). Materiais alternativos, entretanto, como a casca e tecidos do caule, vêm sendo utilizados por serem mais fáceis de serem coletados, especialmente em espécies arbóreas onde a altura das folhas dificulta sua amostragem (Mangaravite et al., 2020).

A extração do DNA do caule de espécies arbóreas é importante devido à dificuldade de obtenção de folhas jovens e saudáveis de plantas altas (Carvalho et al., 2019). Em Arecaceae, por exemplo, em que algumas espécies apresentam porte muito alto, amostras de tecidos do estípite representam uma alternativa ao uso das folhas, pela facilidade de obtenção desse tipo de material ao nível do solo (Lanes et al., 2017; Carvalho et al., 2019).

Outro aspecto importante no processo de extração de DNA consiste no método de maceração do tecido, que pode afetar a qualidade do DNA obtido. A maioria dos métodos de isolamento de DNA vegetal, incluindo kits comerciais, requer a maceração do material vegetal em nitrogênio líquido, que facilita a trituração da amostra, além de manter o tecido vegetal em

baixa temperatura (Ibrahim et al., 2010). Em contrapartida, esse produto não é facilmente acessível em cidades afastadas de grandes centros populacionais, é caro, deve ser armazenado em recipientes especiais (Azêvedo et al., 2019), não sendo apenas perigoso, como também volátil, o que acaba adicionando custo ao experimento (Tan et al., 2013).

No Brasil, a palmeira x *Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster apresenta distribuição geográfica restrita ao estado do Rio Grande do Sul, existindo até o momento, apenas descrições da sua morfologia externa (Barbosa Rodrigues, 1903; Proschowsky, 1921; Burret, 1940; Lorenzi et al., 2010; Soares et al., 2014). Abordagens utilizando ferramentas de biologia molecular, por sua vez, podem contribuir com o conhecimento ainda incipiente dessa palmeira pertencente a uma família botânica tão representativa na biodiversidade brasileira.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi testar a eficiência de métodos de conservação e maceração de materiais biológicos na extração de DNA genômico a partir de tecidos internos do estipe e de folhas de indivíduos adultos de x *B. nabonnandii* para uso em análises moleculares.

2. Material e Métodos

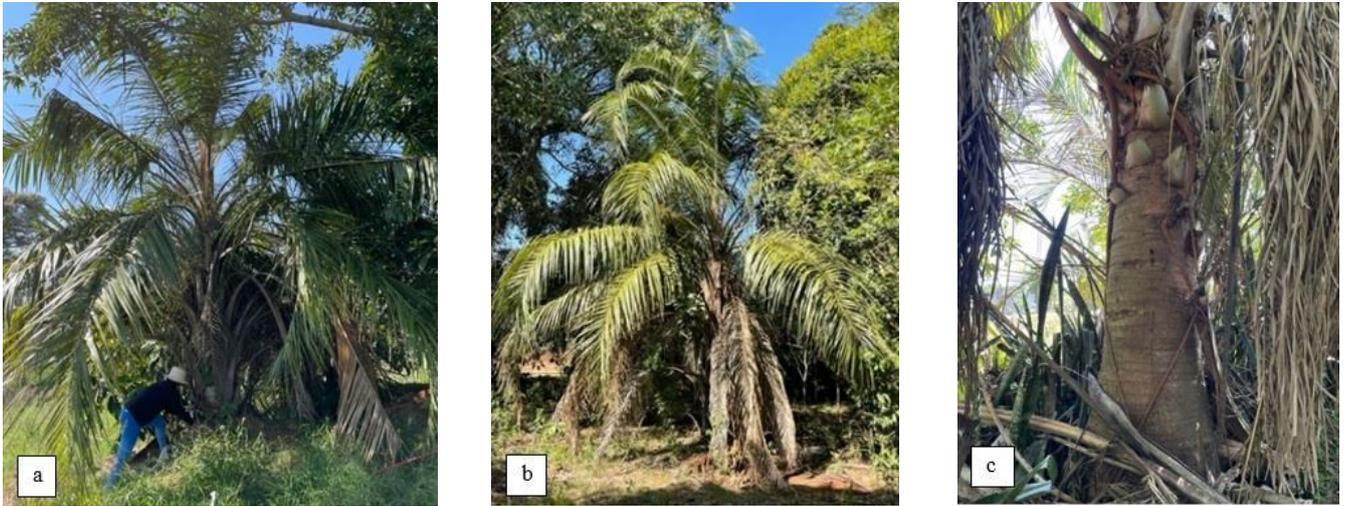
2.1 Coleta do material biológico

Para a análise quali-quantitativa do DNA genômico, foi realizada saída a campo para a coleta de amostras de folhas e de tecidos internos do estipe de três espécimes adultos da palmeira x *B. nabonnandii*, em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 1), pertencentes a uma população encontrada no município de Venâncio Aires, estado do Rio Grande do Sul, Brasil (29° 36' 22" S 52° 11' 40" O). As atividades de laboratório para a realização das extrações de DNA e das análises moleculares foram desenvolvidas no Laboratório de Análises de Ácidos Nucleicos do Centro de Pesquisas Biotecnológicas (CIPBiotec) da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), campus São Gabriel/RS.

Amostras foliares: amostras de folhas dos três espécimes selecionados foram coletadas e armazenadas de forma diferente considerando dois métodos de conservação (material fresco e desidratado), baseados no trabalho de Azêvedo et al. (2019). Para a análise com folhas frescas, essas foram dispostas em embalagens plásticas com fecho tipo “Ziplock” e borrifadas com água para mantê-las hidratadas (Figura 2a). Após, os sacos ficaram acondicionados em caixa térmica de isopor com gelo até o momento da extração do DNA, que ocorreu quatro dias após a coleta. Para a análise da extração a partir de folhas desidratadas, as amostras foram dispostas individualmente dentro de envelopes de papel pardo, que foram acondicionados em embalagens plásticas com fecho tipo “Ziplock”, contendo sílica gel (Figura 2b). A sílica foi substituída de acordo com o indicador de saturação. A extração desse tipo de amostra foi realizada aproximadamente 15 dias após a coleta, quando o material já estava bem desidratado.

Amostras de tecidos do estipe: os métodos para a coleta e armazenagem de tecido interno do estipe se basearam nos trabalhos de Mello et al. (2015) e Mangaravite et al. (2020), respectivamente. Amostras foram coletadas sempre que possível a 1,30 m do solo, por meio de um trado de incremento (Sonda Pressler) (Figura 2c). O material fresco foi estocado em tubo de reação de 1,5 ml, envolto por papel alumínio para evitar contato com a luz (Figura 2d), ficando acondicionado em caixa térmica de isopor com gelo até o momento da extração, que ocorreu em torno de sete dias após a coleta. Para as amostras desidratadas, o procedimento foi o mesmo daquele descrito para as amostras de folhas. Após a perfuração do estipe, o orifício foi protegido com pasta de silicone para dificultar a entrada de microrganismos e permitir a cicatrização do ferimento.

Figura 1. Espécimes de *x Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster selecionados para o estudo quali-quantitativo. a: espécime em estágio mais inicial de desenvolvimento; b: espécime em estágio intermediário de desenvolvimento; c: espécime em estágio mais avançado de desenvolvimento.



Fonte: Autores.

Figura 2. Métodos de coleta e de conservação das amostras de folha e estipe de *x Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster. a: folhas frescas, borrifadas com água, acondicionadas em embalagens plásticas; b: envelopes de papel pardo com amostras de folhas, estocados em embalagem plástica com sílica gel; c: coleta de tecidos internos do estipe por meio da Sonda Pressler; d: amostra de estipe sendo estocada em tubo de reação 1,5 ml.



Fonte: Autores.

2.2 Extração e quantificação do DNA genômico

Para a extração do DNA genômico de ambos os materiais biológicos estudados, foi seguido as instruções do protocolo do kit comercial Qiagen Plant MiniKit® (Hilden, Germany), utilizando em torno de 100 mg de folha e estipe desidratados e 150 mg de estipe fresco. A quantidade do DNA isolado foi avaliada no espectrofotômetro NanoVue™ Plus e a integridade foi verificada em eletroforese de gel de agarose 1%, corado com GelRed™ (Biotium^{VR}), visualizado sob luz UV.

No processo de extração foram avaliados dois métodos de maceração, com e sem o uso de nitrogênio líquido, baseados no trabalho de Azêvedo et al. (2019), em que foram incluídos os dois tipos de material biológico (folha e estipe) e os dois estados de conservação (fresco e desidratado).

Todas as amostras, inclusive os materiais processados em nitrogênio líquido, foram maceradas em um almofariz com a ajuda de um pistilo até ficarem moderadamente fracionadas.

2.3 Análise estatística

Os dados foram analisados com ajuda do software Genes (Cruz, 2016) via análise de variância considerando o esquema fatorial 3x2x2x2 com três repetições, isto é: 3 espécimes do híbrido; 2 tipos de material biológico (estipe e folha); 2 tipos de estado de conservação (fresco e desidratado); 2 tipos de maceração (com e sem nitrogênio líquido). Após a identificação das interações significativas, os efeitos foram desmembrados em seus efeitos simples, e as médias analisadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

2.4 Amplificação do DNA genômico

Para amplificação do DNA genômico por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foram utilizados primers correspondentes a sequências gênicas da família WRKY desenvolvidos para *Cocos nucifera* L. (Mauro-Herrera et al., 2006) e adaptadas por Meerow et al. (2009) (Tabela 1). A amplificação de fragmentos de tamanhos esperados foi um parâmetro para determinar a qualidade do DNA genômico compatível com a técnica de PCR.

As reações de PCR foram adaptadas de Laindorf et al. (2019), onde o volume final de cada reação foi de 25 µL, composto por: 2 µL (120-160 ng de folhas frescas; 30-160 ng de folhas desidratadas) e 4 µL (10-30 ng de estipe fresco e desidratado) de DNA genômico; 1 µL (10 pM) de cada primer (*forward* e *reverse*); 1 µL (1 mM) de MgCl₂; 15 µL de HotStarTaq® Master Mix Kit Qiagen 2x (2.5 unidades da Taq DNA Polimerase; 1.5 mM MgCl₂; 200 µM de cada dNTP), e água ultrapura (Milli-Q) até completar os 25 µL de reação.

A amplificação foi realizada em um termociclador BIO-RAD C1000 Touch™, com um passo de desnaturação inicial de 95° C por 15 minutos, seguido por 35 ciclos de 95° C por 30 s para desnaturação, 1 minuto a 61.1° C para anelamento, 1 minuto de extensão a 72° C, e um passo de extensão final a 72° C por 2 minutos.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%, preparados em tampão TBE 1X, corados com GelRed™ (Biotium^{VR}) e visualizados sob luz UV. Um marcador de tamanho molecular de 100 pares de bases (Norgen) foi usado para avaliar o tamanho dos produtos de amplificação.

Tabela 1. Sequências de primers utilizadas para amplificar o DNA genômico extraído de folha e estipe de *Butyragrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster, correspondentes aos loci WRKY-02 e WRKY-12.

Locus	Sequência do Primer (5' – 3')	Temperatura de anelamento (°C)
WRKY-02	F: ACAATCACCCCAGGCTTTCTCA	61.1
	R: ATTCCACAACCCCGATGCTTC	
WRKY-12	F: GGGTGCTCACAACCACTCCA	61.1
	R: TGCCCTCTCCACATGCTTTC	

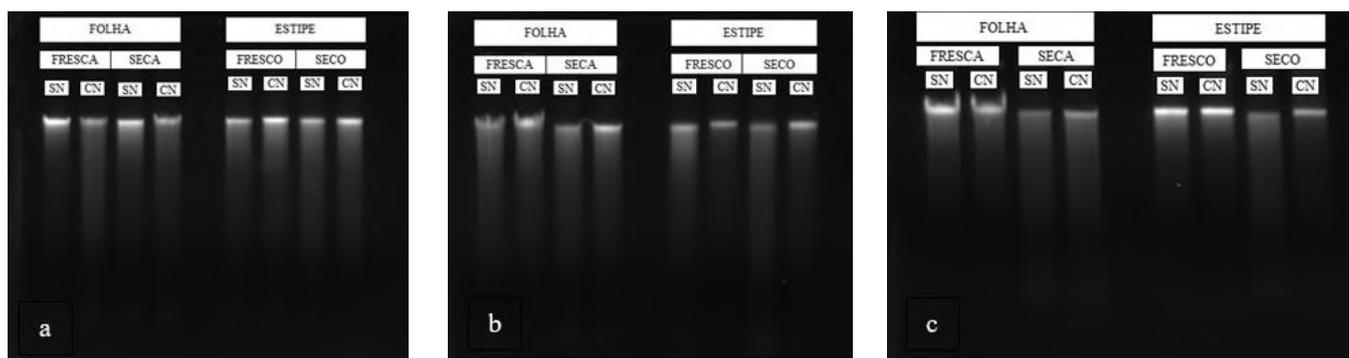
Fonte: Meerow et al. (2009).

3. Resultados e Discussão

O kit comercial usado no presente estudo se mostrou apto para a extração de DNA de boa qualidade dos materiais biológicos extraídos de *B. nabonnandii*. Para os diferentes métodos de conservação e de maceração, foi possível obter elevada porcentagem de DNA de alto peso molecular, confirmado pelo padrão observado por eletroforese em gel de agarose (Figura 3).

Com base nos dados obtidos, foi possível identificar que houve interações significativas para todos os fatores analisados, onde os efeitos simples após desmembrados, possibilitaram identificar que, independentemente do método utilizado, foram bem evidentes as diferenças nas concentrações de DNA genômico obtidas (em ng/μL) para folha e estipe de *B. nabonnandii* (Gráfico 4a). Folhas frescas e desidratadas produziram uma concentração muito superior de DNA em relação ao estipe, com rendimento de 16 vezes e quatro vezes, respectivamente. Essa diferença expressiva nas concentrações de DNA entre folha fresca e estipe também foi observada por Lanes et al. (2013) estudando a palmeira *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Martius, cujo rendimento das folhas foi 4,8 superior ao obtido pelo estipe. Carvalho et al. (2019), entretanto, observaram que não houve diferença estatística entre essas concentrações na palmeira *Euterpe edulis* Mart.

Figura 3. Integridade do DNA genômico obtido a partir dos diferentes métodos de conservação e maceração dos materiais biológicos de *Butyragrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster. Bandas de alto peso molecular observadas em a (espécime 1), b (espécime 2), c (espécime 3). SN: maceração sem nitrogênio líquido; CN: maceração com nitrogênio líquido.



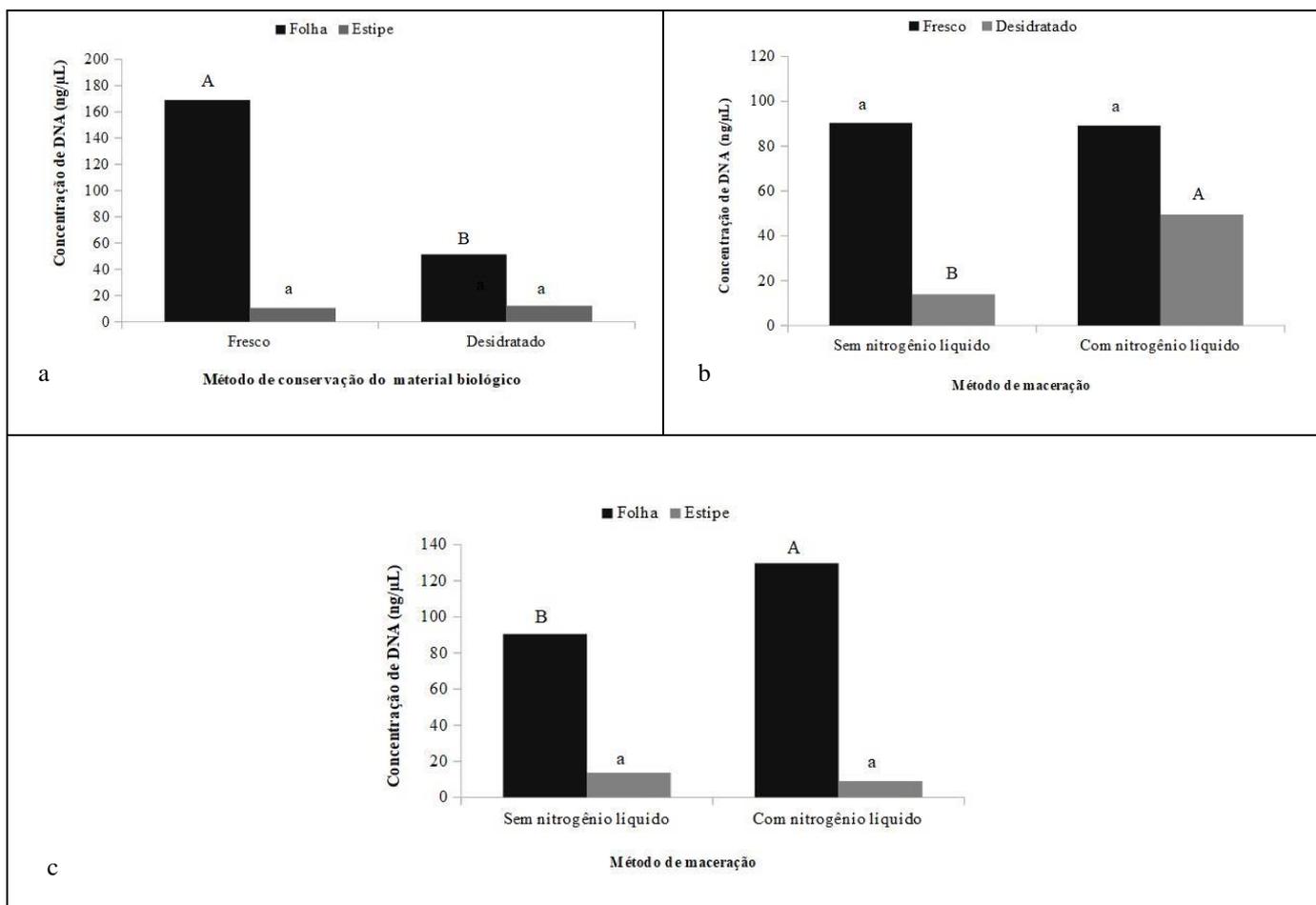
Fonte: Autores.

Quando a análise comparou o material biológico com o método de armazenagem, houve diferenças estatísticas significativas apenas na concentração de DNA obtido a partir do tecido foliar (Gráfico 4a). Folhas frescas permitiram obter três vezes mais DNA (valor médio de 169,03 ng/μL) que as folhas desidratadas (valor médio de 51,25 ng/μL).

Entretanto, a comparação entre os métodos de conservação e de maceração, sem especificar o tipo de material biológico (folha ou estipe), revelou que a concentração de DNA obtida a partir de material fresco não diferiu significativamente com o uso de nitrogênio líquido (Gráfico 4b). Resultados semelhantes foram observados por Furtado Filho et al. (2021) quando compararam cinco diferentes protocolos de extração de DNA a partir de folhas frescas de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O., constatando não haver nenhuma diferença significativa quando usaram nitrogênio líquido na extração.

Quando envolveu material desidratado, por outro lado, a concentração de DNA genômico obtida utilizando nitrogênio líquido na maceração (49,51 ng/μL) foi quatro vezes superior ao material que não utilizou esse produto (13,95 ng/μL). O uso de nitrogênio se fez importante especialmente quando o material biológico tratou-se de folha, onde houve diferença estatística significativa, ao contrário do observado para estipe, cuja correlação com o nitrogênio líquido não diferiu entre si (Gráfico 4c).

Gráfico 4. Médias das interações entre as concentrações de DNA extraído de folha e estipe de *x Butyragrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster, a partir dos diferentes métodos de conservação e de maceração. Médias seguidas das mesmas letras na coluna correspondente não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.



Em que: no gráfico a, letras maiúsculas comparam os efeitos simples da folha com o tipo de conservação; letras minúsculas comparam os efeitos simples do estipe com o tipo de conservação. No gráfico b, letras minúsculas comparam os efeitos simples do material fresco macerado com e sem nitrogênio líquido; letras maiúsculas comparam os efeitos simples do material desidratado macerado com e sem nitrogênio líquido. No gráfico c, letras maiúsculas comparam os efeitos simples de folha macerada com e sem nitrogênio líquido; letras minúsculas comparam os efeitos simples do estipe macerado com e sem nitrogênio líquido. Fonte: Autores.

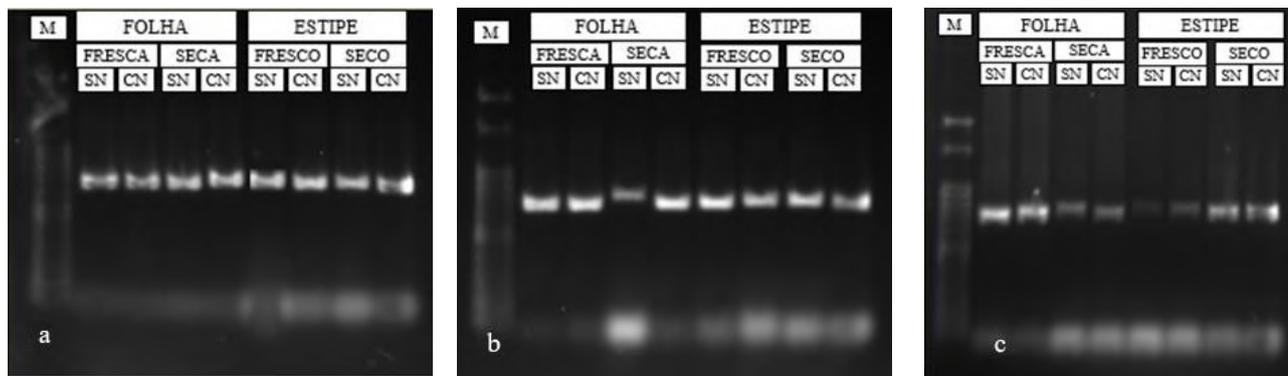
A qualidade do DNA genômico obtido foi confirmada pela amplificação das regiões de interesse via reação de PCR (Figuras 5 e 6), apresentando bandas definidas e fragmentos de tamanhos esperados de acordo com os genes amplificados.

O DNA obtido de folha e estipe de *x B. nabonnandii* respondeu bem principalmente à região gênica WRKY-02, onde ocorreram amplificações de DNA nos três espécimes estudados, para todos os métodos avaliados, mostrando um padrão de bandas mais evidente especialmente nos espécimes um e dois (Figura 5). Já para o locus WRKY-12, observou-se amplificações para todos métodos avaliados, com exceção do espécime três (Figura 6c). Ao menos para o estipe, uma hipótese para esse resultado, refere-se à possível relação entre a idade do indivíduo e a queda na qualidade do DNA, pois, dentre as três plantas estudadas, o espécime três está em um estágio de desenvolvimento mais avançado (Figura 1c).

A necessidade do uso de nitrogênio líquido no processo de maceração pode ser questionável, uma vez que a qualidade do DNA obtido a partir da maceração sem esse produto foi perfeitamente adequada para amplificar as regiões de interesse, com padrões de bandas muito semelhantes. A dispensa do uso de nitrogênio líquido foi corroborada por Ihase et al. (2016) e

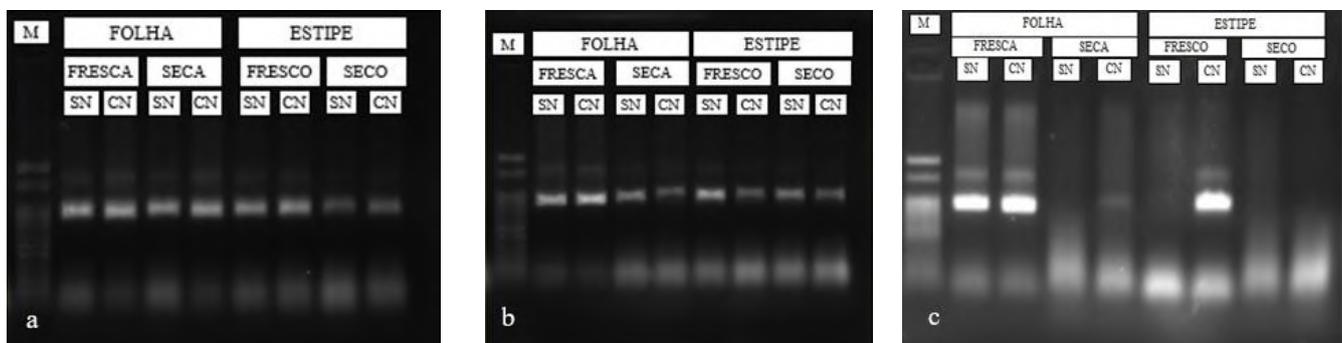
Ibrahim et al. (2010), que investigaram métodos alternativos de maceração em outras espécies de palmeiras, ambos obtendo DNA genômico de boa qualidade para análises moleculares.

Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando os perfis de amplificação do primer WRKY-02 em *x Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster. M = Marcador de tamanho molecular 100 pb. Padrões de bandas observados em a (espécime 1), b (espécime 2), c (espécime 3).



Fonte: Autores.

Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando os perfis de amplificação do primer WRKY-12 em *x Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster. M = Marcador de tamanho molecular 100 pb. Padrões de bandas observados em a (espécime 1), b (espécime 2), c (espécime 3).



Fonte: Autores.

4. Considerações Finais

O DNA isolado de folhas e de tecidos internos do estipe de *x B. nabonnandii* apresentou boa qualidade, uma vez que as duas regiões genômicas de interesse foram amplificadas, mostrando bandas bem definidas e de tamanhos esperados.

Extração de DNA genômico de estipe de *x B. nabonnandii* mostrou-se ser uma boa alternativa, pois o rendimento do material obtido não variou conforme o estado de conservação do material (se fresco ou desidratado), tampouco, com o uso de nitrogênio líquido no processo de maceração. Mesmo com um baixo rendimento em todos os métodos avaliados, o DNA extraído apresentou qualidade satisfatória, amplificando as regiões genômicas de interesse, sobretudo quando extraído de indivíduos mais jovens.

Quanto ao material foliar, a extração de DNA a partir de folhas frescas também se mostrou uma boa alternativa, uma vez que o rendimento de DNA foi maior, amplificou nos três espécimes estudados com bandas bem evidentes e dispensou o uso de nitrogênio líquido no processo de maceração. A extração a partir de folhas desidratadas, entretanto, mesmo

apresentando maior rendimento de DNA quando maceradas na presença de nitrogênio líquido, poderia dispensar o uso desse produto, uma vez que não se observou variações evidentes nos padrões das bandas nas reações de PCR.

Para trabalhos futuros, recomenda-se o sequenciamento dos produtos amplificados por PCR e o uso de outros marcadores moleculares da família gênica WRKY, para a realização de estudos moleculares que colaborem com o conhecimento ainda incipiente desta palmeira híbrida e também de outros representantes da família Arecaceae.

Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório de Diversidade Genética Animal da UNIPAMPA/campus SG pelo empréstimo dos equipamentos necessários para as análises moleculares, aos colegas que eventualmente colaboraram em alguma etapa desse projeto e à bióloga Marícia Fantinel D'Ávila pelas valiosas contribuições ao revisar o manuscrito.

Referências

- Aboul-Maaty, N. A. & Oraby, H. A. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*, 43 (25), 1-10.
- Arif, I. A., Bakir, M. A., Khan, H. A., Ahamed, A., Farhan, A. H. A., Homaidan, A. A. A., Sadoon, M. A., Bahkali, A. H. & Shobrak, M. (2010). A simple method for DNA extraction from mature date palm leaves: impact of sand grinding and composition of lysis buffer. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 3149-3157.
- Aydın, Z. U., Şenova, M. K., Koch, M. A. & Dönmez, A. A. (2020). DNA from Leaf or Stem: A Comparative Work on *Dianthus L.* for DNA Barcoding Analysis with Four Commercial Extraction Kits. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 48 (4), 333-339.
- Azêvedo, H. S. F. S., Rufino, P. B., Azevedo, J. M. A., Silva, L. M. S., Wadt, L. H. O. & Campos, T. (2019). Preservação e maceração de tecido de folíolos de açaí da Amazônia para obtenção de DNA genômico. *Bioscience Journal*, 35 (4), 1188-1197.
- Barbosa Rodrigues, J. (1903). *Sertum Palmarum Brasiliensium*. *Imprimerie Typographique Veuve Monnm*, 2 (1), 116.
- Burret, M. (1940). Um caso de hibridação entre *Arecastrum romanzoffianum* e *Butia capitata*. *Rodriguesia*, 13, 170-173.
- Carvalho, M. S., Noia, L. R., Ferreira, M. F. S. & Ferreira, A. (2019). DNA de alta qualidade isolado a partir do córtex de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae). *Ciência Florestal*, 29 (1), 396-402.
- Colpaert, S. C., Bandou, E., Caron, H., Gheysen, G. & Lowe, A. J. (2005). Sampling tissue for DNA analysis of trees trunk cambium as an alternative to canopy leaves. *Silvae Genetica*, 54 (6), 265-269.
- Cruz, C. D. (2016). Genes software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Scientiarum*, 38 (4), 547-552.
- Furtado Filho, J. C., Silva, J. N., Viana, J. P. G., Costa, M. F., Sousa, C. C., Gomes, M. F. C., Lopes, A. C. A. & Valente, S. E. S. (2021). Comparação de métodos de isolamento do DNA em *Handroanthus Serratifolius*. *Brazilian Journal of Development*, 7 (4), 35765-35779.
- Hedge, S., Pai, S. R. & Roy, S. (2017). Combination of DNA isolation and RP-HPLC analysis method for bark samples of *Saraca asoca* and its adulterant. *Biotech*, 7 (208), 208.
- Ihase, L. O., Horn, R., Anoliefo, G. O., Eke, C. R., Afolab, A. B. & Asemota, O. (2016). Development of a method for DNA extraction from oil palm leaves and the effects of pH and ionic strength on nucleic acid quantification. *Journal of Biological Methods*, 3 (2), e37.
- Laindorf, B. L., Metz, G. F., Küster, M. C. T., Lucini, F., Freitas, K. E. J., Victória, F. C. & Pereira, A. B. (2019). Transfer of microsatellite markers from other Arecaceae species to *Syagrus romanzoffiana* (Arecaceae). *Genetics and Molecular Research*, 18 (3), gmr18183.
- Lanes, E. C. M., Nick, C., Kuki, K. N., Freitas, R. D. & Motoike, S. Y. (2013). Genomic DNA isolation of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) from leaf and stipe tissue samples for PCR analysis. *Genetics and Molecular Research*, 12 (3), 3905-3911.
- Lorenzi, H., Noblick, L. R., Kahn, F. & Ferreira, E. (2010). *Flora Brasileira: Arecaceae (Palmeiras)*. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 214-255.
- Mangaravite, E., Terra, V., Hattori, E. K. O., Dal'sasso, T. C. S., Bhering, L. L. & Oliveira, L. O. (2020). A feasible method to extract DNA from the cambium of high-canopy trees: from harvest to assessment. *Acta Amazonica*, 50, 335-338.
- Mauro-Herrera, M., Meerow A. W., Borrone, J. W., Kuhn, D. N. & Schnell, R. J. (2006) Ten informative markers developed from WRKY sequences in coconut (*Cocos nucifera*). *Molecular Ecology Notes*, 6, 904-906.
- Meerow, A. W., Noblick, L., Borrone, J. W., Couvreur, T. L. P., Mauro-Herrera, M., Hahn W. J., Kuhn, D. N., Nakamura, K., Oleas, N. H. & Schnell, R. J. (2009). Phylogenetic analysis of seven WRKY Genes across the palm Subtribe Attaleinae (Arecaceae) identifies *Syagrus* as sister group of the coconut. *Plos ONE*, 4 (10), e7353.

- Mello, L. M., Reiniger, L. R., Meneghello, G. E., Villela, F. A. & Mota, M. S. (2015). Isolamento de DNA genômico a partir de folhas e câmbio congelados de *Erythrina crista-galli* L., FABACEAE (Corticeira-do-banhado). *Revista Thema*, 12 (02), 82-93.
- Mo, X. C. & Wangsomnuk, P. P. (2021). A modified non-liquid nitrogen protocol for extraction of high-quality genomic DNA from the inner bark tissues of *Dalbergia cochinchinensis* (Fabaceae). *Genetics and Molecular Research*, 20 (2), gmr18836.
- Novaes, R. M. L., Rodrigues, J. G. & Lovato, M. B. (2009). An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. *Genetics and Molecular Research*, 8 (1), 86-96.
- Proschowsky, A. R. (1921). Un beau palmier hybride: *Butiarcacrum nabonnandi*. *Revue Horticole*, 93, 290–291.
- Soares, K. P., Longhi, S. J., Witeck Neto, L. & Assis, L. C. (2014). Palmeiras (Arecaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Rodriguésia*, 65 (1), 113-139.
- Tan, H., Tie, M., Zhang, L., Zhu, Y. & Li, H. (2013). The effects of three diferente grinding methods in DNA extraction of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *African Journal of Biotechnology*, 12 (16), 1946-1951.