

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE BRYOPHYTA PARA ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Paulo Eduardo Aguiar Saraiva Câmara

1. Universidade de Brasília, UnB. Departamento de Botânica. Campus Universitário Darcy Ribeiro - Asa Norte - Caixa Postal - 04457 -CEP 70910-970 - Brasília - DF - Brasil
2. Missouri Botanical Garden, PoBox 299, Saint Louis. MO.63110. USA
(paulo.camara@mobot.org)

RESUMO: Métodos de extração de DNA de Bryophyta para análises filogenéticas

A medida que novos métodos cladísticos aliados a biologia molecular vem aumentando nosso entendimento dos processos evolutivos e conseqüentemente de sua classificação, o uso dessas ferramentas tem se tornado fundamental. No Brasil, tais técnicas ainda não alcançaram a comunidade briológica. Este artigo apresenta uma breve revisão, em português, dos métodos mais utilizados atualmente para a extração de DNA de musgos. Espera-se que dessa forma se estimule o uso pelas novas gerações de botânicos. Comentários e discussões acompanham o texto.

Palavras-chave: Briófitas, DNA, Filogenia molecular, Técnicas de extração.

METHODS FOR DNA EXTRACTION OF BRYOPHYTES FOR PHYLOGENETIC ANALYSES

ABSTRACT: The use of new methods of molecular biology and cladistics have increased our understanding of the evolution of living beings and therefore of its classification. The use of such tools has become fundamental in taxonomy and other sciences as well. As in Brazil such techniques have not yet reached the bryology community, this paper presents the first effort to present an overview, in

Portuguese of the most currently used methods for DNA extraction of mosses. Hopefully it will enhance the use of such techniques by the new generation of botanists. Comments and discussions are also presented.

Key words: Bryophytes, DNA, Extraction techniques, Molecular phylogeny.

INTRODUÇÃO

O uso de métodos cladísticos de análise filogenética causou recentemente uma revolução na sistemática. Estudos sistemáticos envolvendo marcadores moleculares tem se tornado de uso cada vez mais rotineiro na botânica, em parte pela maior popularização dos métodos moleculares (devido em parte à sua simplificação e conseqüente baixa de custos), bem como pelo seu maior entendimento e aceitação pela comunidade taxonômica.

Diversos novos sistemas de classificação tem sido recentemente propostos para os mais diversos grupos de plantas: Angiospermas (APG I, II), Marchantiophyta (Crandall - Stotler & Stotler, 2000), Antocerothophyta (Duff *et al.* 2007) e Bryophyta (Buck & Goffinet, 2000 ; Goffinet & Buck, 2004). Vive-se atualmente um período particularmente criativo e dinâmico, há muito não vivido na sistemática, na medida em que novos dados aumentam o entendimento das relações evolutivas entre os taxa, nossa compreensão se amplia e os inevitáveis ajustes são feitos. Esta é a fase que vivemos atualmente e é provável que conviveremos com uma classificação assim por um prazo de médio a longo.

Tais mudanças ainda alcançam proporções relativamente modestas nos grupos vegetais avasculares, em especial em Bryophyta. Estudos moleculares em musgos tiveram seu início em fins da década de 1990 tendo alguns de seus primeiros artigos publicados em 2000 (Newton *et al.* 2000, de Luna *et al.* 2000, Buck *et al.* 2000). Com menos de 10 anos de atividade e contando ainda com menos recursos e um número menor de pesquisadores (comparado com

fanerógamas), uma grande quantidade de questões, muitas ainda básicas, esperam para ser averiguadas sob o ponto de vista da filogenia moléculas em Bryophyta.

Atualmente, a grande maioria de estudos em briologia no Brasil se refere principalmente realização de inventários e flóculas. Na área da taxonomia, até o momento, comparativamente poucos trabalhos publicados lidam com o tema e a maioria absoluta utiliza-se apenas de dados morfológicos, tendo até o momento um único trabalho publicado utilizando dados moleculares (Câmara, 2006).

Embora a discussão sobre a relevância de dados moleculares versus morfologia em sistemática ainda permeie alguns círculos científicos, a medida que novas gerações de briólogos se formam o interesse no tema da sistemática molecular tem crescido substancialmente.

Entre alguns dos principais fatores, na opinião do autor, que restringem ainda a utilização e aplicação de métodos moleculares na sistemática de briófitas no Brasil estão: dificuldade de acesso à literatura específica que lida com os protocolos moleculares em briófitas, carência de profissionais com formação teórica ou prática no tema, pouca familiaridade do taxonomista de briófitas com o ambiente de laboratório e a pequena quantidade de laboratórios devidamente equipados para tal nas diversas regiões do Brasil.

A fim de aliviar o primeiro problema, este artigo pretende facilitar o acesso aos protocolos mais comumente utilizados para extração de DNA de briófitas para fins de análise filogenética e de sistemática molecular. Espera-se não apenas fornecer uma lista dos artigos e descrever os protocolos utilizados, repetindo assim o que já foi publicado, porém apresentar uma compilação dos métodos mais utilizados, adicionando comentários sobre as adaptações necessárias e diferentes aplicações dos métodos, baseados na literatura e principalmente em experiência pessoal.

Briófitas apresentam certas peculiaridades nos métodos. Uma das primeiras coisas a serem notadas na literatura briológica é que a maioria dos artigos que lidam com extração de DNA apresentam sempre a frase “método com modificações” ou “modificado de”, porém tais modificações quase nunca são explicitadas, neste artigo apresentaremos também no que consistem as mesmas.

O autor é oriundo da área taxonômica e não pretende discorrer a fundo os aspectos puramente moleculares, apenas facilitar o acesso ao que para o

sistemata deve ser uma ferramenta poderosa e útil. O artigo não pretende, dessa forma, esgotar o tema, lembramos que existem diversos outros métodos não discutidos aqui e apenas os mais utilizados em briologia serão apresentados. Sugere-se que se consulte os artigos de Doyle & Doyle (1987); Doyle & Doyle (1990); Barthomieu *et al.* (1994); Edwards *et al.* (1991); Rogers & Parkes (1999); Steñinen (1999) e Wang *et al.* (1993) para maior aprofundamento e comparação.

Espera-se que este artigo, publicado em português, possa facilitar as atividades daqueles que pretendem e desejam utilizar-se dessa ferramenta tão poderosa, em especial estudantes e demais botânicos sem muita familiaridade com biologia molecular, contribuindo para estabelecer uma ponte (cada vez mais urgente) entre a sistemática clássica e a biologia molecular.

METODOLOGIA

Embora material fresco sempre represente a melhor opção de trabalho, briófitas são particularmente viáveis de se extrair DNA de material depositado em herbário. A principal razão é que, ao contrário das plantas vasculares, briófitas não são secas em estufas, preservando assim de forma melhor a integridade do DNA. Sabe-se de extrações feitas com sucesso de material briológico com até 100 anos (Jankowiak *et al.* 2005). Porém, na prática, apenas de material herborizado com até 25 anos de idade espera-se poder obter DNA de qualidade e com relativa facilidade, esta regra obviamente varia e está relacionada com vários fatores, tais como tolerância a dessecação (Werner *et al.* 2002), além da quantidade e qualidade dos produtos químicos utilizados nas fumigações dos herbários.

Pode-se basicamente dividir o trabalho de laboratório do briólogo-sistemata molecular em quatro etapas: 1) Extração do DNA, 2) Amplificação do marcador alvo do estudo (PCR), 3) Sequenciamento e 4) Análise dos dados. Tais passos incluem suas próprias subdivisões, porém nesse artigo será apresentado apenas com o primeiro passo: Extração de DNA.

Devido ao seu tamanho, extrair DNA de musgos foi inicialmente uma tarefa bastante difícil pois grande quantidade de material era necessária, incompatível com a realidade briológica. Isso foi sanado com a criação de protocolos de extração em “pequena

escala” como alguns dos apresentados a seguir.

É importante lembrar que para se ter uma reação de PCR (reação em cadeia da polimerase) bem sucedida, existem diversos fatores envolvidos, sabe-se, por exemplo, que diversos componentes celulares (proteínas, compostos secundários, carboidratos entre outros) podem agir como inibidores da polimerase, devido a isso, geralmente o excesso de tecido vegetal e não a falta deste é mais provável que seja a causa de um PCR mal sucedido. Da mesma forma, uma extração que resulte com o DNA o mais “limpo” possível deve ser sempre o mais desejado, embora tais métodos sejam também os mais demorados.

1) Mini-CTAB

Esté é de fato o método mais utilizado em sistemática molecular de briófitas atualmente, descrito originalmente por Doyle & Doyle (1987) e adaptado por Doyle & Doyle (1990). O nome do método, a sigla CTAB, é a abreviação de “brometo de cetil trimetil amônio”. Este método fornece DNA de alta qualidade, suficientemente “limpo” para amplificação da maioria dos marcadores, incluindo nucleares. Porém, se o material precisa ser processado em larga escala, este método é possivelmente o mais lento.

a) Primeira fase: destruição da parede celular.

Retirar o CTAB (100 mM Tris com pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% de brometo de cetil trimetil amônio) do freezer e colocar em banho maria a 60°C até liquefazer; adicionar 0.2 % de -mercaptoetanol ao volume de CTAB a ser utilizado; rotular dois micro-tubos de 1.5 ml por amostra; adicionar um pouco de areia esterilizada aos tubos (não há uma quantidade fixa, sugere-se o equivalente a uma ponta de espátula); adicionar as amostras (plantas) aos tubos; adicionar 250l de CTAB quente (60°C) a cada tubo utilizando-se de um micro-almofariz (blue pestles) triturar a planta a fim de destruir a parede celular adicionar 450l de CTAB (60°C) a cada tubo; misturar suavemente por inversão; incubar por uma hora (ou uma hora e meia) a 60°C invertendo gentilmente duas vezes neste período.

Comentários: A não adição de mercaptoetanol parece não interferir no processo de extração. Existem pesquisadores que não o utilizam, porém, em tese, a

qualidade final do seu DNA poderá ser afetada. É importante lembrar que se deseja um DNA final o mais puro possível.

O processo tedioso de destruição da parede celular com almofariz pode ser amenizado pelo uso de N₂ líquido. Neste caso procede-se da seguinte maneira: após adicionar areia e a amostra, adicione um pouco de N₂ líquido (suficiente apenas para cobrir sua amostra; imediatamente após a evaporação do mesmo, triture a planta com almofariz e só então adicione o tampão (CTAB). O restante do processo segue o protocolo descrito anteriormente. Outra possibilidade é colocar os tubos fechados imersos em N₂ líquido por alguns segundos, dessa forma evita-se que o material saia do tubo.

A trituração também pode ser feita por equipamento especializado como “genogrinder”. Neste caso siga as instruções constantes do manual da máquina. Geralmente para musgos o ritmo de 100 impactos por minuto por um ou dois minutos é suficiente. Neste caso não se utiliza areia e o CTAB é adicionado após a trituração em um volume único de 700l.

b) Segunda fase: desproteinização.

Preparar uma mistura de clorofórmio com álcool isoamílico 24:1 (conhecido como SEVAG); adicionar 700l de SEVAG; misturar por inversão gentilmente (sugere-se 50 vezes) até produzir-se uma emulsão; centrifugar a 7.000 rpm por um minuto a temperatura ambiente; utilizar uma pipeta para transferir o sobrenadante para novos micro-tubos devidamente rotulados, não tocar a interface; descartar o resto.

Comentários: A centrifugação a 10.000 rpm por um período maior (um a cinco minutos) pode ser também utilizado, em especial para material de herbário. É importante observar as regras de sua instituição para o descarte do SEVAG.

Deve-se lembrar aqui que as proteínas são inibidoras das reações de PCR, mas que existe relativamente poucas proteínas nos tecidos vegetais, em especial quando comparados com outros tecidos como sangue em animais. Quanto menos impurezas estiverem presentes na amostra, mais fácil será res-suspender, e melhores resultados serão obtidos nas reações de amplificação (PCR), lembre-se que o DNA está presente apenas no sobrenadante, dessa forma é

importante evitar a outra fase bem como a interface (rica em proteínas).

Obtem-se melhores resultados na transferência do sobrenadante de tubos quando as pontas das pipetas (P1000) a serem utilizadas forem cortadas cerca de 2 a 3 mm do ápice, aumentando assim sua abertura.

c) Terceira fase: precipitação.

Adicionar 700l de isopropanol gelado (aprox. -20° C) a cada tubo, misturar por inversão gentilmente (sugerimos cinco a vinte vezes), deixar precipitando por, no mínimo, oito horas a -20°C, sugere-se deixar durante toda a noite.

Comentários: A maior parte do DNA precipitará na primeira hora, no entanto aumenta-se o rendimento deixando-se por mais tempo. Sugere-se que o processo de extração seja iniciado à tarde, dessa forma o DNA poderá permanecer por toda a noite a -2°C, permitindo-se assim a continuação do processo na manhã seguinte, de forma mais cômoda.

Devido a relativamente pequena quantidade de DNA obtido nesse processo, não se espera nenhuma evidência visível da presença do DNA, porém muitas vezes a formação de diminutas bolhas denuncia a sua precipitação.

d) Quarta fase: limpeza, secagem e ressuspensão.

Retirar as amostras do freezer e centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos, descartar o sobrenadante; adicionar 1 ml de etanol a 70%; centrifugar 13.000 rpm por cinco minutos; deixar os tubos secarem (veja comentários sobre secagem abaixo); adicionar 25l de tampão EB (10mM tris-Cl, pH 8.0) ou TE (10mM tris-HCl, 1mM EDTA), ou ainda dH₂O previamente aquecida a 60°C; deixar os tubos em banho a 60°C por cinco minutos. O DNA deverá estar pronto para ser utilizado nas reações de amplificação.

Comentários: A secagem poderá ser feita em centrífuga a vácuo (speed-vac), por cinco minutos, porém, existe uma tendência, nesta técnica, de secar em demasia. Nunca deixe as amostras por mais de dez minutos, ou será virtualmente impossível ressuspender o DNA. Outra forma, mais lenta, porém mais segura, é deixar

os tubos secarem de ponta cabeça em papel toalha, o eventual excesso de álcool presente nas paredes dos tubos poderá ser retirado delicadamente com papel absorvente.

e) Gel de verificação.

Neste momento sugere-se correr um gel a fim de verificar a presença de DNA, comumente usa-se gel de agarose a 1%, contendo algum agente intercalante (como brometo de etídio ou SYBR Safe) usando um marcador de alto peso molecular (como). É fundamental citar que mesmo que nenhuma banda possa ser vista, ainda assim o DNA pode estar presente, assim sendo, a forma mais certa de verificação é a própria reação de PCR.

Comentários: Este método resultará em um volume final de 25l de DNA total (genômico), dependendo de quantas reações de PCR serão feitas, esta quantidade poderá ser insuficiente. Dessa forma sugere-se que se tenha pelo menos dois tubos por amostra, totalizando ao final 50l de DNA. Lembre-se que, embora seja bastante estável quando em tampão, o DNA deve ser, preferencialmente, armazenado a -20°C.

Em alguns casos, após a extração pode-se ainda realizar uma limpeza do DNA, para tal existem diversos métodos além de “kits” de limpeza disponíveis no mercado. Porém esse passo raramente é necessário e o detalhamento desse processo foge do escopo deste artigo.

2) Extração alcalina

Este método, é bastante adequado para plantas de tamanho bastante reduzido, como por exemplo os representantes da família Pottiaceae. Ou quando é importante poder se obter DNA de um único indivíduo, apesar de seu tamanho.

a) Limpar a planta com água bi-distilada retirando da planta as impurezas visíveis (utilizar uma lupa), se necessário cortar os rizóides fora.

b) Colocar uma planta inteira em um micro-tubo de 1.5 ml (ou 0.5 ml); adicionar 5 l de NaOH 0.5 M; triturar com uma pinça ou agulha (a agulha deve ter sido esterilizada com HCl 0.5 M); quando não hou-

ver mais fragmentos visíveis adicionar, mais 15 l de NaOH 0.5 M; continuar triturando (um a dois minutos); centrifugar a 13.000 rpm por dois minutos; diluir o sobrenadante em 1:10 com tampão de extração (100mM Tris-HCl, pH 8.3).

Comentários: Após a utilização, armazene o DNA a -20°C. As vantagens desse método, somam o tempo (trata-se obviamente de uma extração mais rápida), e a não utilização de solventes orgânicos e outros produtos potencialmente tóxicos. Outra vantagem é a minimização de contaminação, pois manipula-se menos a amostra.

3) Extração rápida de Pedersen *et al.*

Este método foi desenvolvido por Pedersen *et al.* (2006). Consiste em uma versão bastante simplificada e que apresenta bons resultados, em especial para cpDNA. O método poderá não ser adequado para amplificação de marcadores nucleares com poucas cópias, pois o DNA obtido poderá não apresentar a quantidade e o grau de pureza necessários para tal.

a) Rotular dois micro-tubos de 1.5 ml por amostra; adicionar um pouco de areia esterilizada em um dos tubos; em seguida adicionar a amostra (planta), recomenda-se fragmentos com menos de 10 mg; adicionar N2 líquido e imediatamente após a evaporação do mesmo, triturar a planta no tubo usando um micro-almofariz; adicionar à sua amostra 50l de tampão TE; deixar em banho a 60°C por 15 minutos; centrifugar a 13.200 rpm por 15 minutos; transferir o sobrenadante para um novo tubo devidamente rotulado. Descartar o restante.

Comentários: Sendo uma técnica desenvolvida recentemente, pouco se sabe sobre a estabilidade do DNA a longo prazo, (recomenda-se armazenar a -20°C), bem como sua aplicabilidade dentro do espectro de possibilidades de marcadores, os únicos testados até o momento foram trnL-F e ITS.

4) Extração rápida de Timme & Ross

a) Rotular dois micro-tubos de 1.5 ml por amostra; adicionar aproximadamente 250g de tecido vegetal; adicionar N2 líquido em quantidade suficiente para

cobrir a amostra; imediatamente após a evaporação triturar utilizando o micro-almofariz; adicionar 400 l de tampão (200mM Tris HCl com pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 MMEDTA, 0.5% SDS); misturar utilizando vortex; centrifugar a 10.000 rpm por 5-10 minutos.

b) Descartar o sobrenadante; secar o tubo de ponta-cabeça com a tampa aberta em um freezer a -20°C; adicionar 100l de RNase (10mg/ml).

Comentários: Trata-se de um método pouco utilizado atualmente. Desenvolvido por Timme & Ross (1997). É possível que o DNA resultante não seja adequado para marcadores nucleares com poucas cópias.

5) Amplificação direta

Quando a obtenção de DNA na quantidade necessária, ou quando a manipulação da planta é muito difícil, devido ao tamanho, como no caso de Pottiaceae, algumas Bryaceae ou de anões machos (Pedersen *et al.* 2006). Pode-se optar por adicionar a planta inteira no tubo de PCR. A desvantagem é que este método só permitirá a realização de uma reação de PCR, ou seja não é replicável e permite que apenas um marcador seja amplificado por indivíduo.

a) Limpar a planta cuidadosamente, enxaguando em água bi-destilada, remover com a lupa os resíduos, se necessário cortar fora os rizóides. Pode-se utilizar um esterilizador ultra-sônico, pois o mesmo não afeta o método.

b) Preparar a reação de PCR na forma adequada, sugere-se reações de 25l.

c) Adicionar fragmentos com ca. de 0.2 mm² diretamente no tubo de PCR (ao invés do DNA).

d) Realizar a reação de PCR na forma adequada ao marcador selecionado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da biologia molecular em sistemática já é uma prática consolidada na ciência. As publicações de maior impacto em Sistemática vegetal, bem como em outras áreas, dedicam grande número de suas pá-

ginas a trabalhos que se utilizam dessa poderosa ferramenta, com cerca mais diversas finalidades.

Espera-se que os procedimentos descritos e comentados acima possam servir de norte para aqueles que desejam ou necessitam utilizar-se de técnicas moleculares em suas teses, dissertações e projetos nos mais variados níveis acadêmicos, afastando preconceitos e auxiliando seu maior entendimento.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece a Dra. Elisabeth Kellogg (UMSL), a mestre Vanessa Rivera (UnB) e ao Dr. Felipe Martins (USP)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.P.G. [= Angiosperm Phylogeny Group.] An ordinal classification for the families of flowering plants. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, 85: 531-553, 1998.

A.P.G. [= Angiosperm Phylogeny Group] II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Bot. J. Linnean Soc.**, 141: 399-436, 2003.

BUCK, W. R. & GOFFINET, B. Morphology and classification of mosses. In: SHAW, A.J. & GOFFINET, B. (eds.). **Bryophyte Biology**, Cambridge University Press, 2000. p.71-123.

BUCK, W. R.; GOFFINET, B. & SHAW, A.J. Novel relationships in pleurocarpous mosses as revealed by cpDNA sequences. **Bryologist**, 103: 774-789, 2000.

BARTHOMIEU, P. & MEYER, C. Direct amplification of plant genomic DNA from leaf and root pieces using PCR. **Plant Molecular Biology**, 17: 555-557, 1994.

CÂMARA, P.E.A.S. Molecular contribution on the systematics placement of the moss genus *Paranapiacabaea*. **Boletim do Instituto de Botânica**,

18: 159-162, 2006.

CRANDALL-STOTLER, B. & STOTLER, R. Morphology and classification of the Marchantiophyta. In: SHAW, J. & GOFFINET, B. (eds.) **Bryophyte Biology**. Cambridge University Press, 2000.

DE LUNA, E.; BUCK, W.R. ; AKIYAMA, H. ; ARIKAWA, T.; TSUBOTA, T.; GONZÁLEZ, D.; A.; NEWTON, E. & SHAW, A.J. Ordinal phylogeny within the hypnobryalean pleurocarpous mosses inferred from cladistic analyses of three chloroplast DNA sequence data sets: trnL-F, rps4 and rbcL. **Bryologist**, 103: 242-256, 2000.

DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, 19: 11-15, 1987.

DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12: 13-15, 1990.

DUFF, R. J.; VILLARREAL, J. C.; CARGILL, D. C & RENZAGLIA, K. S. Progress and challenges toward developing a phylogeny and classification of the hornworts. **The Bryologist**, 110: 214-243, 2007.

EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C. & THOMPSON C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analyses. **Nucleic Acid Research**, 19: 1349, 1991.

GOFFINET, B. & BUCK, W.R. Systematics of the Bryophyta (mosses): from molecules to revised classification. In: GOFFINET, B.; HOLLOWELL, V. & MAGILL, R. **Molecular Systematics of Bryophytes. Monographs in Systematic Botany**, 98: 201-239, 2004.

JANKOWIAK, K.; BUCZKOWSKA, K.; SZWEYKOWSKA - KULINSKA, Z. Successful extraction of DNA from 100- year- old herbarium specimens of the liverwort *Bazzania trilobata*. **Taxon**, Volume 54: 335-336, 2005.

NEWTON, A. E.; COX, C.J.; DUCKETT, J.; WHEELER, B.; GOFFINET, B.; MISHLER, B. &

HEDDERSON, T.A.J. Evolution of the major moss lineages. **The Bryologist**, 103: 187-211, 2000.

PEDERSEN, N.; RUSSELL, S. J.; NEWTON, A. E. & ANSELL, S. W. A novel molecular protocol for the rapid extraction of DNA from bryophytes and the utility of direct amplification of DNA from a single dwarf male. **The Bryologist**, 109: 257-264, 2006.

ROGERS, H.J. & PARKES, H.C. Direct PCR amplification from leaf discs. **Plant Science**, 143: 183-186, 1999.

STEØINEN, H. K. Protocols for DNA isolation and storage of land plants samples for macromolecular comparison. **Methods in Enzymology**, 224: 23-37, 1999.

TIMME, S. L. & ROSS, A. A simple method to extract DNA from bryophytes for RAPD analysis. **Evansia**, 14: 131-132, 1997.

WANG, H.; QI, M. & CUTLER, A. J. A simple method of preparing plant samples for PCR. **Nucleic Acid Research**, 21:4153-4154, 1993.

WERNER, O.; ROS, R. M. & GUERRA, J. Direct amplification and NaOH extraction: two rapid and simple methods for preparing bryophyte DNA for polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Bryology**, 24: 127-131, 2002.