

# REVISTA CERES

Janeiro e Fevereiro de 2005

VOL. LII | Nº 299

Viçosa – Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

## ANÁLISE QUALI-QUANTITATIVA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO EM MELANCIA<sup>1</sup>

Andréa Capeloto<sup>2</sup>  
Sandra Helena Unêda-Trevisoli<sup>3</sup>  
Nair Helena Castro Arriel<sup>2</sup>  
Manoel Abílio Queiroz<sup>4</sup>  
Antonio Orlando Di Mauro<sup>5</sup>

### RESUMO

A técnica de PCR, quando utilizada para análise de similaridade, geralmente requer grande número de genótipos, daí a necessidade de métodos rápidos e eficientes que proporcionem a obtenção de DNA de qualidade e em quantidade suficiente. Três métodos de extração de DNA foram testados: CTAB, miniextração de DNA para PCR e o proposto por Murray & Thompson, com adaptações. Nas avaliações, utilizaram-se dez acessos de

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 10.04.2004.

<sup>2</sup> Aluna do curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 14884-900 Jaboticabal, SP.

<sup>3</sup> Pós-Doutoranda em Genética e Melhoramento de Plantas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 14884-900 Jaboticabal, SP.

<sup>4</sup> Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais da Universidade do Estado da Bahia 48900-000 Juazeiro, BA.

<sup>5</sup> Departamento de Produção Vegetal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 14884-900 Jaboticabal, SP. orlando@fcav.unesp.br

melancia, oriundos do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Semi-Árido, testados no delineamento de blocos inteiramente casualizados, com três repetições em cada método. Os parâmetros utilizados para comparação entre os métodos foram as médias da relação de 260/280 nm e a quantificação do DNA (ng/ $\mu$ L). Após a análise dos dados, concluiu-se que todos os métodos testados podem ser utilizados para a extração de DNA em melancia, porém, pela praticidade, rentabilidade e qualidade, o CTAB foi o mais recomendável, com grandes chances de bons resultados.

Palavras-chave: *Citrullus lanatus*, marcadores moleculares.

## ABSTRACT

### QUALI-QUANTITATIVE ANALYSIS OF GENOMIC DNA EXTRACTION METHODS IN WATERMELON

The application of the PCR technique for similarity analysis requires the use of a great number of genotypes, besides fast and efficient DNA extraction methods capable of providing sufficient, high quality DNA. Three methods of DNA extraction (CTAB, mini extraction and Murray & Thompson) were compared to determine the best way to obtain high quality DNA. For the extractions, vegetable tissue of ten watermelon accesses, originated from the Germoplasm Active Bank of Cucurbitacea Embrapa/Semi-arid, were used. These accesses were evaluated in a completely randomized design in three replications for each method. The parameters used for comparing the methods were the averages of 260/280 nm relationship and DNA quantification values (ng/ $\mu$ L). The results showed that all the tested methods can be used for extraction of watermelon DNA. However, the feasibility, efficiency, and quality of the DNA made the CTAB method the most recommended with great chances of producing good results.

Key words: *Citrullus lanatus*, molecular markers.

## INTRODUÇÃO

A melancia (*Citrullus lanatus*) destaca-se entre as espécies da família Cucurbitaceae cultivadas no Brasil, tendo como principais produtores os Estados do Maranhão, Bahia, Piauí, Goiás, Santa Catarina e Pernambuco.

A produção brasileira na safra de 2003 esteve próxima de 620.000 t, ocupando uma área de 74.000 ha e participando com cerca de 8% da produção total de hortaliças produzidas no Brasil (10). Alguns estudos sobre tendências de mercado, realizados pelo Ministério da Agricultura, indicam que, no ano de 2004, a produção brasileira deve atingir 868.611 t, e para 2005 este número pode se elevar para 886.083 t (3).

Fica evidente, portanto, a necessidade de programas de melhoramento genético visando à obtenção de cultivares mais produtivos, resistentes a pragas e doenças e com bons atributos agronômicos. Para a escolha correta de parentais na elaboração dos cruzamentos que darão

origem às populações a serem melhoradas, faz-se necessário o conhecimento da diversidade genética entre os acessos disponíveis no banco de germoplasma. Neste estudo, a técnica de PCR-RAPD tem sido uma opção de grande eficiência e praticidade, levando a bons resultados em um curto espaço de tempo (5).

Os estudos de polimorfismo genético de DNA geralmente envolvem grande número de indivíduos, e a possibilidade de análise vai depender para isso são utilizados, com algumas modificações, para resolver problemas específicos da espécie em estudo, como a degradação do DNA por DNAses endógenas, co-isolamento de polissacarídeos que podem inibir a ação de enzimas (16, 18) e co-isolamento de substâncias fenólicas ou outros compostos secundários que podem danificar o DNA ou também inibir a ação de diversas enzimas de restrição ou da DNA polimerase (20). Os protocolos que utilizam o detergente catiônico CTAB (cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide) no tampão de extração são os mais amplamente utilizados em espécies vegetais, obtendo-se bons resultados, principalmente em extrações de pequenas amostras de tecido vegetal (11).

Protocolos simplificados, como a miniextração de DNA para PCR (17), e outros, como o proposto por Cheung et al. (6) e Edwards e Johnstone (8), podem fornecer DNA parcialmente degradado ou contaminado que, apesar de possibilitar ampliações por PCR, podem comprometer a reprodutibilidade das reações, tendo-se muitas vezes resultados duvidosos (17).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de três métodos de extração de DNA em acessos de melancia, para recomendação daquele de maior eficiência e praticidade para esta espécie, em estudos envolvendo técnicas moleculares.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Material vegetal*

Para este trabalho foram utilizados dez acessos de melancia (A 06, A 07, A 08, A 09, A 10, A 13, A 16, A 17, A 19 e A 22) oriundos do BAG (Banco Ativo de Germoplasma) de Curcubitáceas, da Embrapa Semi-Árido.

### *Coleta do material*

Foram coletadas folhas jovens definitivas de plântulas com aparência sadia. O semeio foi realizado em bandejas de isopor, e, após a coleta, as folhas foram acondicionadas em gelo e em seguida armazenadas em ultra freezer (-80°C) até o momento da maceração com nitrogênio líquido. Imediatamente após a maceração, procederam-se as extrações.

### *Extração de DNA*

Os métodos de extração de DNA genômico testados no trabalho foram o CTAB (11), o miniextração (17) e o Murray & Thompson (14). O primeiro foi realizado com a maceração de 50-100 mg de tecido vegetal, sendo adicionados 700 µL de tampão de extração (CTAB 2,0%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 e 2-mercaptoethanol 2%), levando-se ao banho-maria, com circulação, a 65°C, por 40 minutos. Durante a incubação, invertermos os tubos a cada dez minutos, sendo retirados do banho-maria e deixados em temperatura ambiente até esfriarem. Adicionaram-se 600 µL de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1), agitando por cinco minutos. Os tubos foram centrifugados a velocidade de 16.000 x g, por cinco minutos, em centrífuga Eppendorf 5415C. Após a centrifugação, transferiu-se a fase superior (360 µL) para novos tubos, adicionando-se 2/3 do volume da solução aquosa de isopropanol gelado, com inversão e posterior incubação a -20°C por, no mínimo, 30 minutos. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados à velocidade de 4.000 x g, por cinco minutos. Descartou-se o sobrenadante, e o sedimento foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70%, ficando imerso por dez minutos e sendo novamente lavado com 1 mL de etanol absoluto, por três minutos. Os tubos foram levados à câmara de fluxo laminar vertical para secagem, por aproximadamente 60 minutos. A seguir, ressuspendeu-se o sedimento em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) contendo RNase A (10 µg/mL). Os tubos foram levados ao banho-maria, a 37°C, por 40 minutos, e posteriormente deixados à temperatura ambiente por aproximadamente 12 horas.

O método de miniextração de DNA para PCR (17) procedeu-se com a maceração de 50-100 mg de tecido vegetal, adicionando a seguir 500 µL de tampão de extração (CTAB 0,8%, NaCl 800 mM, EDTA 22 mM, Tris-HCl 220 mM, pH 8,0, sarcosil 1%, sorbitol 140 mM e 2-mercaptoethanol 0,2%) e 200 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram levados ao banho-maria, a 55°C, por 15 minutos, sendo em seguida centrifugados, à velocidade de 11.750 x g em centrífuga Eppendorf 5415C, por cinco minutos. Após a centrifugação, transferiu-se a fase superior (360

µL) para novos tubos, onde se adicionou metade do volume da solução aquosa de isopropanol gelado, invertendo os tubos e, em seguida, levando-os a  $-20^{\circ}\text{C}$  por no mínimo 15 minutos. Posteriormente, submeteram-se os tubos a uma nova centrifugação, à velocidade de 11.750 x g, por dez minutos. Descartou-se o sobrenadante, e o sedimento foi lavado com 500 µL de etanol 70%. Os tubos foram novamente centrifugados, a 11.750 x g, por 10 minutos. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante, sendo o sedimento levado à câmara de fluxo laminar vertical para secagem por aproximadamente 60 minutos, e a seguir, ressuspendido em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) contendo RNase A (10 µg/mL). Logo em seguida, os tubos foram levados ao banho-maria, a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 40 minutos. Na seqüência, permaneceram à temperatura ambiente por aproximadamente 12 horas.

O outro método testado foi o proposto por Murray & Thompson (14) com algumas modificações, realizado com a maceração de 50-100 mg de tecido vegetal, na qual adicionaram-se 500 µL de tampão de extração (CTAB 2,0%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 e 2-mercaptoethanol 1%). A seguir, os tubos foram levados ao banho-maria, a  $65^{\circ}\text{C}$ , por 30 minutos. Durante a incubação, foram invertidos a cada dez minutos. Logo após a retirada do banho-maria, adicionaram-se 350 µL de clorofórmio-octanol (24:1), sendo invertidos e centrifugados, à velocidade de 16.000 x g, em centrífuga Eppendorf 5415C, por 15 minutos. Após a centrifugação, transferiu-se a fase superior (360 µL) para novos tubos, onde se adicionaram 3/4 do volume da solução aquosa de isopropanol gelado, invertendo-os novamente e em seguida incubando-os a  $-20^{\circ}\text{C}$  por, no mínimo, 30 minutos. Posteriormente, foram novamente centrifugados, à velocidade de 8.160 x g, por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante, e ao sedimento foram adicionados 500 µL de solução *Wash* (etanol 76%, 8% de acetato de sódio 3 M e água Milli-Q 16%), sendo os tubos agitados por 20 minutos e submetidos a uma nova centrifugação, à velocidade de 8.160 x g, por dez minutos. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento levado à câmara de fluxo laminar por cerca de 60 minutos para a secagem, sendo então ressuspendido em 100 µL de tampão TE (Tris-Cl 10 mM, EDTA 1 mM) contendo RNase A (10 µg/mL). Os tubos foram levados ao banho-maria, a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 40 minutos, e logo em seguida mantidos à temperatura ambiente por aproximadamente 12 horas.

### *Quantificação do DNA*

As concentrações das amostras de DNA obtidas foram estimadas em espectrofotômetro (DU 640 Beckman), medindo-se a absorbância a 260 nm. Para estimar o grau de pureza das amostras, pela relação 260/280 nm,

foi também determinada a absorvância a 280 nm. Alíquotas das amostras, diluídas 50 vezes em água Milli-Q, foram utilizadas nas determinações. Como branco, foi utilizada uma amostra de TE livre de DNA.

#### *Eletroforese das amostras de DNA*

Para a verificação da quantidade e qualidade do DNA obtido pelos três métodos de extração testados, foram tomadas amostras de 10  $\mu$ L da solução de DNA, sendo adicionados a elas 2  $\mu$ L de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,01% e glicerol 40%, em água Milli-Q estéril). Dessas amostras, 10  $\mu$ L foram aplicadas em cada canaleta do gel de agarose 1,5% p/v (agarose 1,5% dissolvida em TEB 1X–Tris 28 mM, ácido bórico 88 mM, EDTA 7 mM, pH 8,0) contendo 3  $\mu$ L de brometo de etídeo (10 mg/mL) e submetidos à eletroforese em cuba horizontal GIBCO BRL 11-14, a 100 V, por aproximadamente uma hora. Como padrão, foi utilizado o DNA de fago Lambda adquirido na GIBCO BRL (100 ng/ $\mu$ L).

#### *Amplificação do DNA genômico por meio de PCR-RAPD*

Para verificar se o DNA obtido estaria passível de amplificação, prepararam-se reações RAPD, com volume final de 25  $\mu$ L contendo tampão PCR (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3 e KCl 50 mM); MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTP's 0,2 mM; iniciador 15 ng; DNA genômico 15 ng, 1 Unidade de Taq Polimerase e água Milli-Q autoclavada e filtrada (11).

Para a realização da PCR, foi utilizado um aparelho termociclador marca MJ, modelo PTC 100, sendo empregado o seguinte programa: um minuto a 92°C (desnaturação); um minuto a 35°C (anelamento do iniciador); dois minutos a 72°C (extensão pela Taq Polimerase). Este ciclo foi repetido 42 vezes, finalizando com 4°C, até que os microtubos fossem retirados do aparelho. Após a retirada, adicionou-se 2,5  $\mu$ L de tampão de carregamento [5,75 mL de glicerol, 2 mL de EDTA 0,5 M, 0,5 mL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 20%, 1,75 mL de água e azul de bromofenol 0,01%] antes da aplicação da amostra no gel de agarose (1,5% - p/v), o qual foi corado com brometo de etídeo, na concentração de 10 mg/mL, adicionando-se 3  $\mu$ L para 80 mL de gel. A eletroforese procedeu-se a 100 V por cerca de uma hora, utilizando-se tampão TBE pH 8,0 (Tris 0,09 M; ácido bórico 0,09 M e EDTA 2 mM).

#### *Análises estatísticas*

Para a comparação entre os três métodos de extração de DNA, anteriormente detalhados, foi realizado um experimento segundo o

esquema inteiramente casualizado, com 30 repetições em cada método. O número de repetições foi definido de acordo com a grande variação oferecida pelos testes iniciais, em todos os métodos.

Foram analisadas as variáveis relação 260/280 nm e a concentração de DNA, sendo esta expressa em ng/ $\mu$ L. Ambos foram obtidos pela leitura em espectrofotômetro.

Antes da análise de variância, os testes de homogeneidade de variâncias e heterocedasticidade regular indicaram que os dados da variável relação 260/280 nm estavam aptos para serem analisados. O mesmo teste, no entanto, sugeriu a transformação de  $\sqrt{X}$  nos dados da variável concentração (ng/ $\mu$ L), para que se adequassem mais à curva de distribuição normal. Após a análise de variância, foi realizado o teste de Duncan, a 5%, nas médias que diferiram significativamente pelo teste F.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros para comparação entre os métodos de extração de DNA genômico em melancia foram a relação 260/280 nm e a concentração de DNA (ng/ $\mu$ L). O resultado da análise de variância e a comparação entre as médias obtidas nos três métodos encontram-se, respectivamente, nos Quadros 1 e 2.

Na análise de variância, foi detectada diferença significativa pelo teste F, a 5%, entre os métodos, apenas na concentração de DNA (ng/ $\mu$ L), sugerindo que eles diferem entre si quanto a este parâmetro. Quando realizado o teste de Duncan a 5%, para a concentração de DNA, o CTAB não diferiu do Murray & Thompson, ao mesmo tempo que ambos diferiram da miniextração. A maior média de concentração foi obtida pela miniextração, seguida do CTAB. Apesar de a miniextração ter fornecido grande quantidade de DNA, notou-se que, aparentemente, havia ocorrido sedimentação de outros componentes, além do DNA, principalmente polifenóis, os quais fornecem aparência escurecida ao sedimentado (17). Esses componentes podem prejudicar a interpretação correta da PCR no gel de corrida, pelos resultados contraditórios que podem surgir (2). Quanto ao resultado da relação, apesar de as médias não diferirem entre si estatisticamente, a maior foi obtida no método CTAB, sugerindo menor quantidade de polissacarídeos. No entanto, as médias de todos os três métodos situaram-se entre 1,8 e 2,0, o que caracteriza DNA de boa qualidade (12, 17). O método da miniextração foi o de menor tempo de execução, podendo ser indicado para a extração de DNA genômico em grandes quantidades de acessos.

esquema inteiramente casualizado, com 30 repetições em cada método. O número de repetições foi definido de acordo com a grande variação oferecida pelos testes iniciais, em todos os métodos.

Foram analisadas as variáveis relação 260/280 nm e a concentração de DNA, sendo esta expressa em ng/ $\mu$ L. Ambos foram obtidos pela leitura em espectrofotômetro.

Antes da análise de variância, os testes de homogeneidade de variâncias e heterocedasticidade regular indicaram que os dados da variável relação 260/280 nm estavam aptos para serem analisados. O mesmo teste, no entanto, sugeriu a transformação de  $\sqrt{X}$  nos dados da variável concentração (ng/ $\mu$ L), para que se adequassem mais à curva de distribuição normal. Após a análise de variância, foi realizado o teste de Duncan, a 5%, nas médias que diferiram significativamente pelo teste F.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros para comparação entre os métodos de extração de DNA genômico em melancia foram a relação 260/280 nm e a concentração de DNA (ng/ $\mu$ L). O resultado da análise de variância e a comparação entre as médias obtidas nos três métodos encontram-se, respectivamente, nos Quadros 1 e 2.

Na análise de variância, foi detectada diferença significativa pelo teste F, a 5%, entre os métodos, apenas na concentração de DNA (ng/ $\mu$ L), sugerindo que eles diferem entre si quanto a este parâmetro. Quando realizado o teste de Duncan a 5%, para a concentração de DNA, o CTAB não diferiu do Murray & Thompson, ao mesmo tempo que ambos diferiram da miniextração. A maior média de concentração foi obtida pela miniextração, seguida do CTAB. Apesar de a miniextração ter fornecido grande quantidade de DNA, notou-se que, aparentemente, havia ocorrido sedimentação de outros componentes, além do DNA, principalmente polifenóis, os quais fornecem aparência escurecida ao sedimentado (17). Esses componentes podem prejudicar a interpretação correta da PCR no gel de corrida, pelos resultados contraditórios que podem surgir (2). Quanto ao resultado da relação, apesar de as médias não diferirem entre si estatisticamente, a maior foi obtida no método CTAB, sugerindo menor quantidade de polissacarídeos. No entanto, as médias de todos os três métodos situaram-se entre 1,8 e 2,0, o que caracteriza DNA de boa qualidade (12, 17). O método da miniextração foi o de menor tempo de execução, podendo ser indicado para a extração de DNA genômico em grandes quantidades de acessos.

## Método CTAB

300 700 A/8 A/9 A/10 A/16 A/17 A/22 A/13 A/7 A/6 A/19

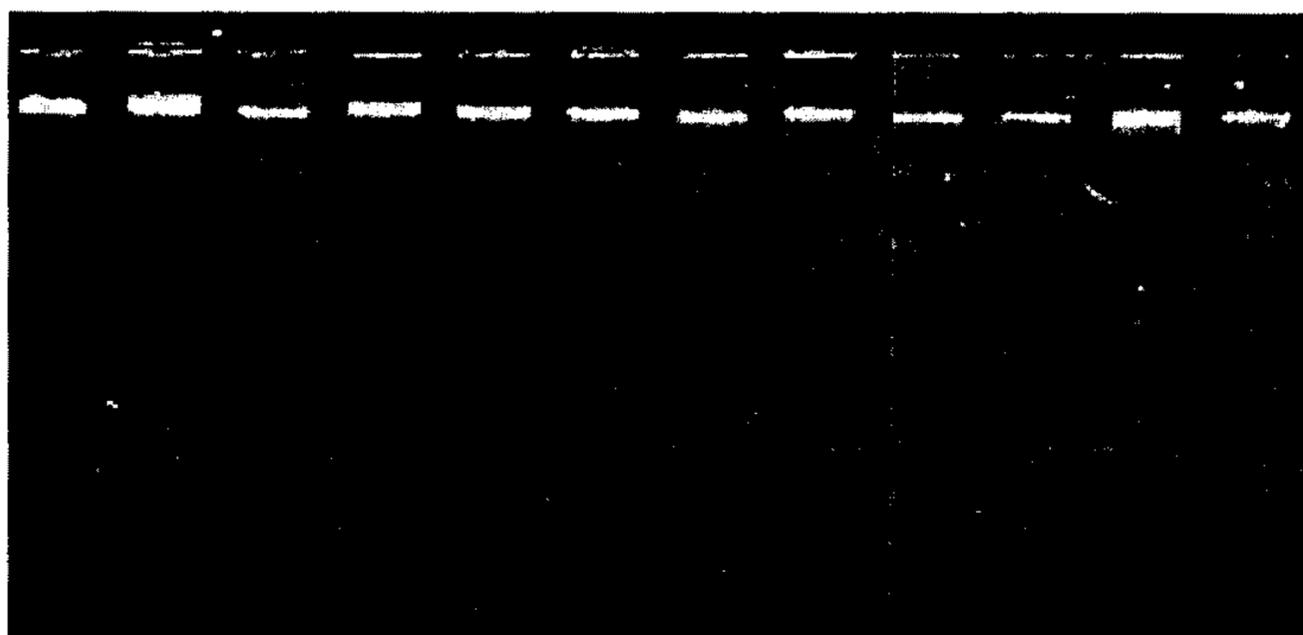


FIGURA 1 - Perfil eletroforético de DNA extraído de folhas de melancia (*Citrullus lanatus*) pelo método CTAB, utilizando-se padrão Lambda, nas canaletas 1 (300 ng) e 2 (700 ng). Nas demais, encontram-se os genótipos testados.

## Método da miniextração

300 700 A/8 A/9 A/10 A/16 A/17 A/22 A/13 A07 A06 A19

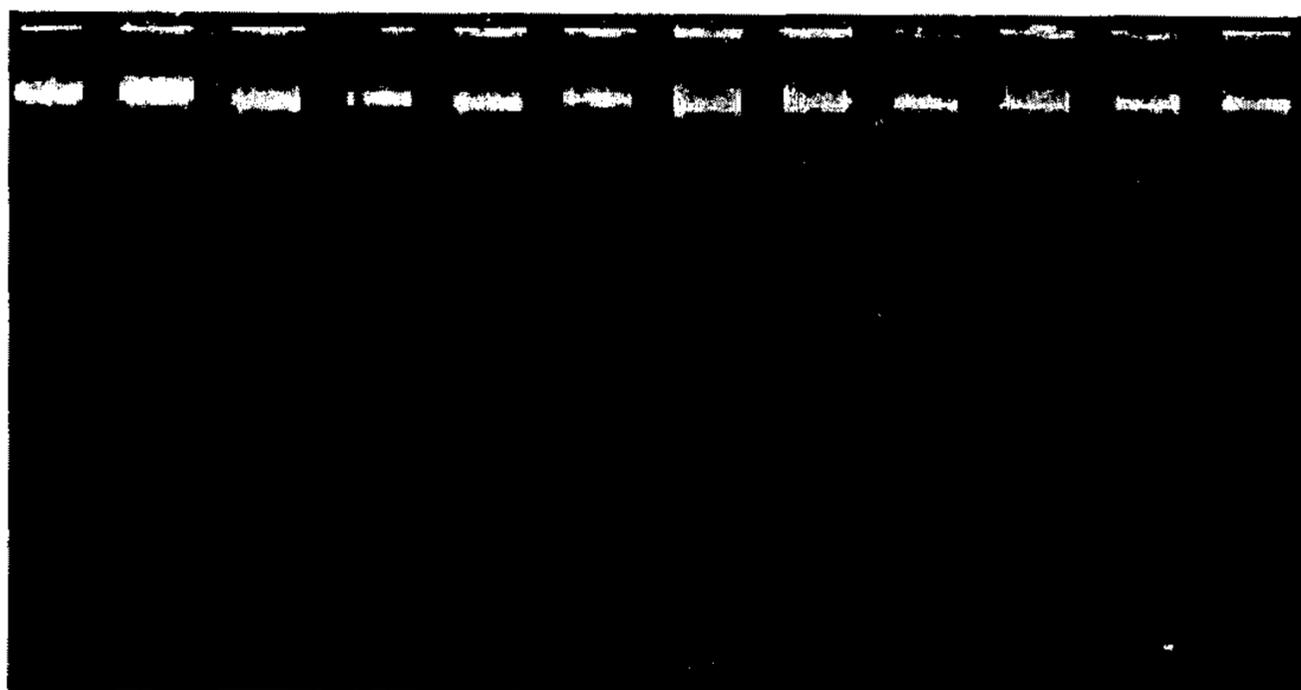


FIGURA 2 - Perfil eletroforético de DNA extraído de folhas de melancia (*Citrullus lanatus*), pelo método da miniextração, utilizando padrão Lambda, nas canaletas 1 (300 ng) e 2 (700 ng). Nas demais, encontram-se os genótipos testados.

### Método Murray & Thompson

300 700 A/8 A/9 A/10 A/16 A/17 A/22 A/13 A/7 A/6 A/19

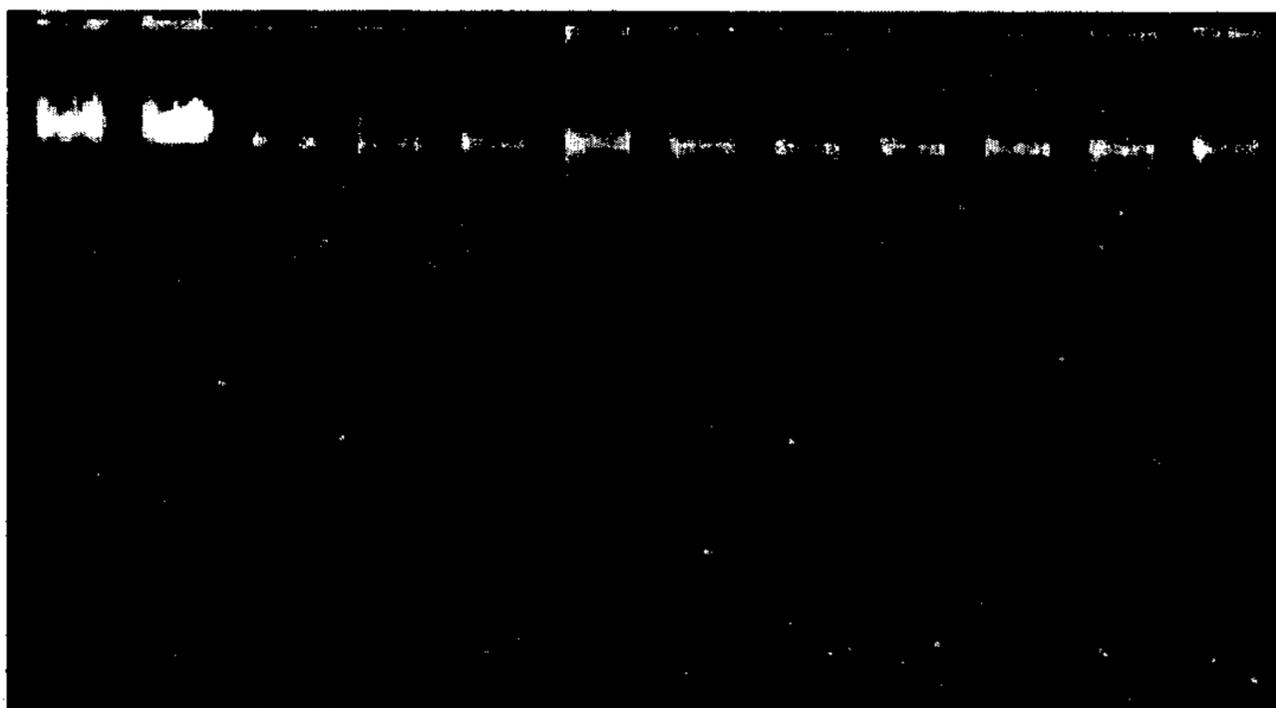


FIGURA 3 - Perfil eletroforético de DNA extraído de folhas de melancia (*Citrullus lanatus*) pelo método proposto por Murray & Thompson modificado, utilizando-se padrão Lambda, nas canaletas 1 (300 ng) e 2 (700 ng). Nas demais, encontram-se os genótipos testados.

1 2 3 4 5 6 7 8 9

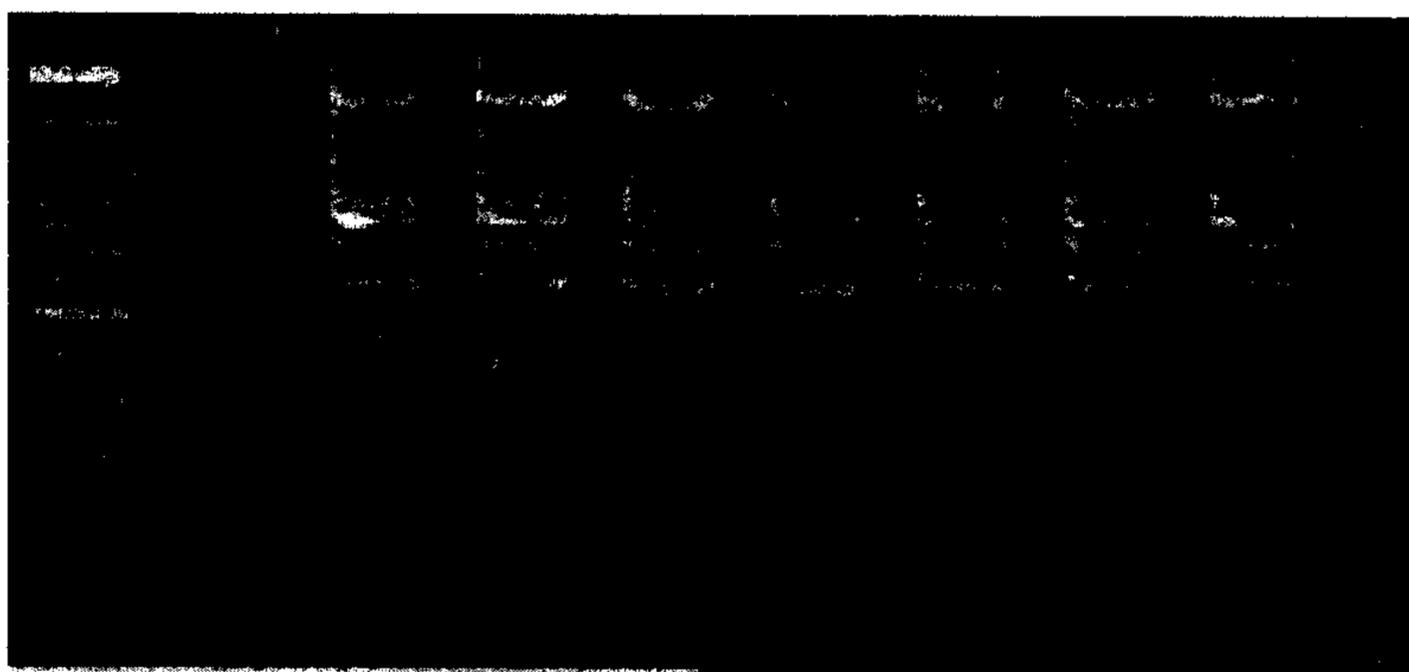


FIGURA 4 - Perfil eletroforético de RAPD utilizando-se DNA extraído de melancia e amplificados com o primer OPR15: na canaleta 1, padrão de peso molecular (Ladder 100pb); canaleta 2, controle negativo; canaletas 3 e 4, método da miniextração; canaletas 5 e 6, método Murray & Thompson; e canaletas 7, 8 e 9, método CTAB.

Todos os resultados estatísticos foram condizentes com os visualizados por meio dos géis, confirmando a possibilidade da utilização dos três métodos para extração de DNA, em quantidade e qualidade, para a realização da técnica de PCR, em melancia. No entanto, de acordo com o descrito por Romano (17) e comprovado para outras espécies, como o maracujazeiro (13), métodos muito simplificados podem fornecer DNA degradado ou contaminado. O método da miniextração teve grande quantidade de impurezas no sedimento durante a extração, podendo assim apresentar falsos resultados na técnica de PCR (11). O CTAB foi o que apresentou melhores resultados na fase de sedimentação e na visualização em gel de agarose (Figura 1), devido à menor degradação, além da maior média de relação 260/280 nm, sendo esses resultados em parte dependentes do laboratório. Apesar disto, tendo em vista que o método CTAB é o mais amplamente utilizado em espécies vegetais como o Eucalyptus, Citrus, Pinus, Brassica, milho, arroz, dentre outras (11), e particularmente para extração a partir de amostras pequenas de tecido, aliado à facilidade de execução e ao alto valor da quantificação obtida, ele pode ser indicado para extração de DNA genômico de melancia, com grande possibilidade de bons resultados.

## CONCLUSÕES

1) Apesar de os três métodos de extração terem mostrado eficiência, o CTAB apresenta melhores resultados, além de ser de fácil execução, sendo o mais indicado para obtenção de DNA de qualidade e em quantidade adequadas para a análise molecular de melancia.

2) O método da miniextração é de menor tempo de execução, podendo ser indicado para a extração de DNA genômico em projetos que envolvem grandes quantidades de acessos.

## REFERÊNCIAS

1. ASEMOTA, H. N. A fast, simple, and efficient miniscale method for the preparation of DNA from tissues of yam (*Dioscorea* spp.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 13:214-8, 1995.
2. BERED, F. Extração de DNA - considerações e prática. In: Milach, S. (ed). *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre, Milach, S. C. K, 1998.p. 91-8.
3. BRASIL. Ministério da Agricultura. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/MENU\\_LATERAL/AGRICULTURA\\_PECUARIA/ESTUDOS\\_PUBLICACOES/ESTUDO\\_MERCADO\\_FRUTAS/CAPITULO\\_4.PDF](http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/MENU_LATERAL/AGRICULTURA_PECUARIA/ESTUDOS_PUBLICACOES/ESTUDO_MERCADO_FRUTAS/CAPITULO_4.PDF). Acesso em: 10 de dezembro de 2004.
4. BRUNEL, D. An alternative, rapid method of plant DNA extraction for PCR analyses. *Nucleic Acids Research*, 20:4676, 1992.
5. CASSIANO, A.P.A. A. Variações genéticas entre espécies de *Passiflora* usando marcadores moleculares RAPD. Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 1998.47p. (Tese mestrado)

6. CHEUNG, W.Y.; HUBERT, N. & LANDRY, B.S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. *Technical Tips*, 3:69-70, 1993.
7. CROCHEMORE, M.L.; HUYGHE, C.; KERLAN, M.C.; DURAND, F. & JULIER, B. Partitioning and distribution of RAPD variation in a set of populations of the *Medicago sativa* complex. *Agronomie*, 16:421-32, 1996.
8. EDWARDS, K.; JOHNSTONE C. & THOMPSON, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 19:1349, 1991.
9. FAIRBANKS, D.J.; WALDRIGUES, A. & RUAS, P.M. Efficient characterization of biological diversity using field DNA extraction and random amplified polymorphic DNA markers. *Revista Brasileira de Genética*, 16:11-22, 1993.
10. FAO. Disponível em: <http://apps.fao.org>. Acesso em: 10 de dezembro de 2004.
11. FERREIRA, M. E. & GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD em análise genética. Brasília, EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220p.
12. MILACH, S. Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998. 139p.
13. MOLINARI, H.B. & CROCHEMORE, M.L. Extração de DNA genômico de *Passiflora* spp. para análises PCR-RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23:447-50, 2001.
14. MURRAY, R.W. & THOMPSON W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8:4321-5, 1980.
15. OARD, J.H. & DRONOVALLI, S. Rapid isolation of rice and maize DNA for analysis by random primer PCR. *Plant Molecular Biology Reporter*, 10:236-41, 1992.
16. ROGERS, S.O. & BENDICH, A.J. Extraction of DNA from plant tissues. In: Gelvin, S. B. & Schilperoort, R.A., (ed). *Plant molecular biology manual*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1988.
17. ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: Brasileiro, A.C.M. & Carneiro, V.T.C (eds.). *Manual de transformação genética de plantas*. Brasília, EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p. 163-77.
18. SHIODA, M. & MARAKAMI-MUOFUSHI, K. Selective inhibition of DNA polymerase by a polysaccharide purified from slime of *Phisarum polycephalum*. *Biochemical and Biophysical Research*, 146:61-6, 1987
19. VARADARAJAN, G.S. & PRAKASH, C.S. A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9:6-12, 1991.
20. WILLIAMS, J.G. K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18:6531-5, 1990.