

Isolamento de DNA genômico a partir de folhas e câmbio congelados de *Erythrina crista- galli* L., FABACEAE (Corticeira-do-banhado)

Luciano Moura de Mello*
Lia Rejane Reiniger**
Geri Eduardo Meneghello***
Francisco Amaral Villela****
Monalize Salete Mota*****

Resumo: *Erythrina crista-galli* L. (FABACEAE) é uma árvore nativa do Brasil, Uruguai, Paraguai, leste da Bolívia e Argentina. Ocorre em ambientes úmidos e florestas de galerias, podendo ser utilizada na arborização e na restauração de ambientes naturais. Não foram encontradas na literatura metodologias para o isolamento de DNA genômico da espécie utilizando folhas ou câmbio congelados. O objetivo do trabalho foi testar dois protocolos de isolamento de DNA e duas fontes de material biológico, avaliando concentração e qualidade dos isolados. Folhas frescas congeladas e câmbio não constituem boa fonte de material genético segundo as metodologias utilizadas. Novos testes são necessários no sentido de otimizar os procedimentos de coleta e isolamento, buscando solucionar os problemas de contaminações por polissacarídeos e polifenóis e da baixa concentração do DNA genômico isolado nas amostras.

Palavras-chave: DNA genômico, Câmbio vascular, *Erythrina*.

* Instituto Federal Sul-Rio-Grandense. Câmpus de Santana do Livramento, Biólogo, Especialista em Ecologia, Mestre e Doutor em Ciência & Tecnologia de Sementes pela UFPel.

** Universidade Federal de Santa Maria, Prof. Eng. Agr. Dra. Departamento de Fitotecnia.

*** Universidade Federal de Pelotas, Eng. Agr. Dr. Departamento de Sementes.

**** Universidade Federal de Pelotas, Prof. Eng. Agrícola. Dr. Departamento de Sementes.

***** Universidade Federal de Pelotas, Biól. Dra. Pesquisadora (PNPD), Centro de Genômica e Fitomelhoramento.

Abstract: *Erythrina crista-galli* L. (FABACEAE) is a tree native to Brazil, Uruguay, Paraguay, eastern Bolivia and Argentina. Occurs in moist environments and galleries forests and may be used in afforestation and restoration of natural environments. We found no literature methods for the isolation of genomic DNA species using sheets or frozen rates. The aim of the study was to test two protocols for DNA isolation and two sources of biologic material, assessing concentration and quality of isolated. Frozen and fresh leaves rates not constitute good source of genetic material according to the methodologies used. Further tests are necessary in order to optimize the procedures for collection and isolation, seeking to solve the problems of contamination by polysaccharides and polyphenols and low concentration of isolated genomic DNA in the samples.

Keywords: Genomic DNA, Vascular cambium, *Erythrina*.

Introdução

Erythrina crista-galli L. é uma espécie florestal importante no Bioma Pampa, ocorrendo em áreas úmidas de várzeas e orlas de matas ciliares, nos quais desempenha importante papel nas comunidades vegetais.

Estratégias para o isolamento de DNA genômico de *Erythrina crista-galli* L. não são encontrados na literatura e que possam apoiar as ações de investigação nos períodos nos quais a planta, eventualmente não disponha de folhas para a preparação de material.

Em função da deciduidade da espécie, folhas frescas e câmbio congelados devem ser testados com a finalidade de garantir fontes de material genético (além de folhas secas de acordo com Mello et al, 2015) durante o período de outono-inverno.

Danner et al. (2011) testou o isolamento de DNA genômico de jabuticabeira utilizando como um dos recursos de material biológico o câmbio vascular. Estes autores verificaram que o câmbio da jabuticabeira escurece rapidamente, provavelmente por causa da oxidação por compostos fenólicos, devendo ser conservado em CTAB 2% após a sua coleta. Esse método proporcionou, no caso da jabuticabeira, um DNA isolado de boa qualidade, porém com pequena quantidade em relação às outras fontes testadas, sugerindo que a quantidade de tecido de câmbio seja maior que 0,25 g. Os autores salientam ainda que o câmbio pode dispensar o uso de nitrogênio líquido para maceração, facilita a coleta em populações naturais e o manuseio sob armazenamento. Assim, este trabalho tem o objetivo de testar dois protocolos para o isolamento de DNA genômico a partir de câmbio vascular e, testar ainda o uso de folhas frescas congeladas como fonte de material para outros trabalhos na área de genômica com esta espécie florestal.

Material e métodos

Fonte do material vegetal

Os fragmentos estudados, fontes do material para análise da diversidade genética, estão localizados na região do município de Bagé, Aceguá, Hulha Negra e Dom Pedrito (Figura 1).

Os critérios para a seleção de fragmentos foram a distância mínima de 8 quilômetros entre os fragmentos e o isolamento mínimo de 350m entre o fragmento e qualquer outro indivíduo, seja em formações florestais ciliares ou mesmo qualquer outro indivíduo isolado.

A fim de verificar diferenças quantitativas e qualitativas no material genético isolado a partir das fontes testadas realizou-se o isolamento de DNA genômico baseado em dois métodos, um método descrito por Nienhuis et al. (1995), com modificações, a segunda metodologia com um Kit comercial (PROMEGA®).

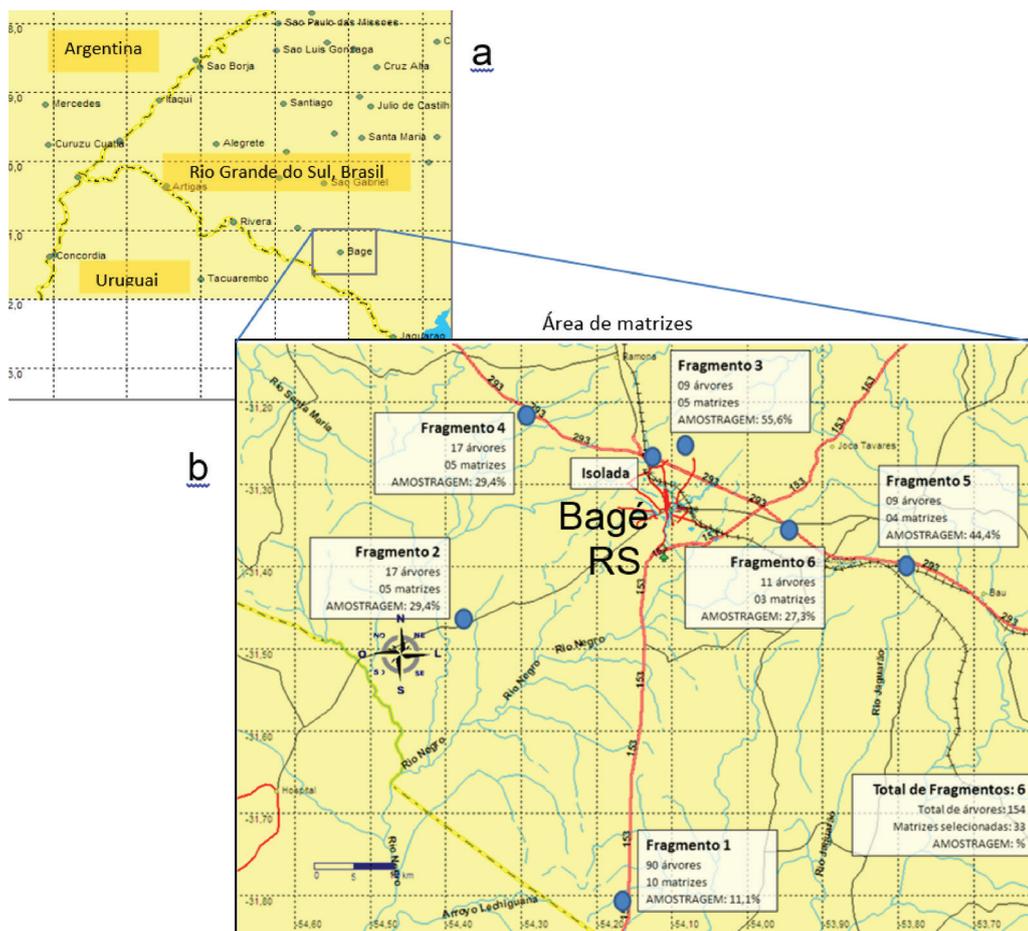


Figura 1. (a) Mapas de referência: localização da matriz da qual foram utilizadas sementes (b) Os fragmentos amostrados para testes, com número de indivíduos em cada fragmento e de matrizes selecionadas para o estudo (imagens do GPS TrackMaker®).

Como fonte de material foram utilizadas folhas frescas conservadas em embalagens plásticas com fecho tipo “Ziplock” e câmbio armazenado em microtubos de centrífuga e mantidos em freezer (Figura 2).



Figura 2. Embalagens de acondicionamento das amostras de folhas frescas mantidas congeladas. Foto: Luciano Moura de Mello, Santa Maria, 2014.

Isolamento de DNA genômico a partir de câmbio vascular

As amostras de câmbio foram coletadas das matrizes nos dias 14 e 15 de outubro 2013 utilizando-se uma Sonda de Pressler (Figura 3).



Figura 3. Fases da coleta de câmbio das matrizes de *Erythrina crista-galli*: (a) georreferenciamento da matriz e uso da Sonda Pressler (ou Trado de Incremento), (b) acondicionamento do bastão de câmbio (seta) nos microtubos de centrifuga. Fotos: Luciano Moura de Mello, Aceguá, 2013.

As amostras de câmbio foram coletadas sempre que possível à altura média do peito e imediatamente após a coleta foram armazenadas em microtubos de centrifuga previamente contendo 700 μ L de tampão CTAB [Cetiltrimetil brometo de amônio 2%] e conservadas durante a fase de campo em caixa térmica contendo gelo.

Durante as coletas de câmbio foram tomados os cuidados de promover a desinfecção do orifício com 10mL de solução comercial de sulfato de Cobre e a posterior proteção do orifício com pasta de silicone para dificultar a entrada de microorganismos e permitir a cicatrização do ferimento.

Utilizando o protocolo modificado de Nienhuis et al. (1995) foram testadas oito amostras de câmbio de *Erythrina crista-galli*: (1.5), (2.1), (3.3), (4.1), (4.2), (5.1), (5.2), e (6.1).

Em laboratório, após a maceração, as amostras de câmbio foram repesadas para fins de homogeneização e obtiveram-se 230mg de macerado final de câmbio em cada amostra, sendo a diferença entre o peso inicial e final atribuído a perdas durante a maceração e ao material fino aderido ao almofariz. Estimou-se, pela média dos pesos iniciais e finais de amostras levadas à maceração, que cerca de 20% do volume do material usado inicialmente tenha sido perdido após o processo na maceração de câmbio utilizando-se nitrogênio líquido.

De todas as amostras de câmbio obteve-se pelo menos 300 μ L de sobrenadante.

No caso do isolamento de DNA de câmbio, o material após ser pesado (280mg), foi pré-macerado em almofariz e somente depois foi adicionado o nitrogênio líquido para a maceração fina do material, seguindo-se posteriormente a pesagem do material que efetivamente compôs a amostra, seguindo-se o mesmo protocolo já referenciado para os isolamentos de material genético de folhas secas.

Com o câmbio vascular testou-se dois protocolos, o método descrito por Nienhuis et al. (1995), com modificações e com um kit comercial (PROMEGA®).

O protocolo do kit comercial padrão PROMEGA® (Kit Wizard® Genomic

DNA, Ref. A1123) foi desenvolvido da seguinte forma: as amostras de câmbio (230mg) foram maceradas em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido e posteriormente o macerado foi transferido para microtubos de centrífuga.

Foram adicionados 600µL de solução de lise nuclear (*Nuclei Lysis Solution*). O material foi incubado a 65°C por 15 minutos em banho-maria. Após este período de incubação, as amostras receberam 3µL de solução de RNase (*RNase Solution*), sendo realizadas lentas inversões para homogeneizar os reagentes. A mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos e, posteriormente deixada por 5 minutos à temperatura ambiente. Foi adicionada a solução para a precipitação de proteínas (*Protein Precipitation Solution*) e a mistura foi submetida a vortex por 20 segundos para homogeneização. Posteriormente o material foi centrifugado por 5 minutos a 18.000 x g (e não por 3 minutos a 16.000 x g conforme estabelecia o protocolo uma vez que estes procedimentos não produziram inicialmente os efeitos esperados), tendo sido feita, após a centrifugação, a separação do sobrenadante contendo o DNA para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5ml, já contendo 600µL de isopropanol. Foram realizadas lentas inversões no material e centrifugação por 5 minutos a 18.000 x g, à temperatura ambiente.

O isopropanol foi descartado e foram adicionados 600µL de álcool 70% para a lavagem do DNA (*pellet*). Após lentas inversões o álcool também foi descartado, deixando-se os tubos secarem sobre papel absorvente limpo, durante 15 minutos. A fim de fazer a reidratação do DNA foram adicionados 100µL de DNA *Rehydration Solution*, com incubação de 60 minutos a 65°C.

O protocolo modificado de Nienhuis et al. (1995) foi desenvolvido da seguinte forma: amostras de câmbio (230mg) foram maceradas em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido e posteriormente o macerado foi transferido para microtubos de centrífuga contendo 700 µL de tampão CTAB [Cetiltrimetil brometo de amônio a 2%; Cloreto de sódio (NaCl) 1,4mM; Tris 1mM pH 8,0; Polivinilpirrolidona (PVP) 1%].

As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 60 minutos, agitando-as a cada 15 minutos para homogeneização do material.

Após o período de incubação, foi adicionado 1 volume do solvente orgânico clorofórmio : álcool isoamílico, 24:1 (CIA), sendo, imediatamente, centrifugado por 30 segundos a 10.000 x g.

O sobrenadante foi transferido para novos microtubos de centrífuga de 2mL. A seguir, foram adicionados 400µL de isopropanol gelado a -20 °C e misturados suavemente por inversão dos tubos. As amostras foram armazenadas em freezer à temperatura de -20°C por 1h para precipitação do DNA, sendo, na sequência, centrifugadas a 18.000 x g por 60 segundos para formação do sedimentado (*pellet*). O sobrenadante foi descartado, cuidadosamente, para não acarretar em descarte acidental do *pellet*. Os *pellets* foram lavados com 1mL de etanol 70% por 5min. A fase aquosa foi descartada e os *pellets* foram secos à temperatura ambiente, por 45 min.

O DNA extraído foi ressuspenso em 200µL de TE Buffer (1µM de TRIS + 0,1µM EDTA) e foram adicionados 2µL de RNase (10mg.mL⁻¹), sendo as amostras incubadas a 37°C, por 60 min.

Posteriormente, foram adicionados 200µL de isopropanol gelado (a -20°C), os quais foram misturados, suavemente, por inversão dos tubos, sendo, na sequência centrifugados a 18.000 x g por 60 segundos, para nova formação

do sedimentado (*pellet*).

A fase aquosa foi descartada e o *pellet* foi novamente lavado com 1mL de etanol 70% por 5 min. As amostras foram submetidas a um *spin*, por 30 segundos. A fase aquosa foi descartada e os *pellets* secos à temperatura ambiente por 60 min.

Por fim, o DNA extraído foi ressuspendido em 100µL do tampão de eluição TE Buffer (1µM de TRIS + 0,1µM EDTA).

As soluções de DNA foram armazenadas em freezer, a -20°C até o dia da quantificação de DNA das amostras.

Isolamento de DNA genômico a partir de folhas frescas congeladas utilizando o protocolo modificado de Nienhuis et al. (1995) e kit comercial (PROMEGA®)

As folhas frescas foram coletadas nos mesmos dias das amostras de câmbio. Assim que coletadas, as amostras de folhas frescas foram acondicionadas em sacos plásticos (Figura 2) contendo duas colheres de sopa de sílica gel (4-8mm). Estas embalagens permaneceram em freezer a -20°C, por 170 dias, até o dia dos testes de isolamento do DNA genômico.

As amostras testadas foram: (1.5), (2.1), (4.1), (5.1) e (6.1) e para a extração do DNA de folhas frescas congeladas utilizou-se 150mg de material fresco, tendo sido seguidos os mesmos métodos de Nienhuis et al. (1995) e kit comercial já citados anteriormente para o câmbio.

Um resumo das amostras e protocolos testados consta da Tabela 1.

Fragmento	Folha fresca congelada		Câmbio vascular congelado	
	(1)	(2)	(1)	(2)
1	(1.5)*	(1.5)	(1.5)*	(1.5)*
2	(2.1)*	(2.1)	(2.1)*	(2.1)*
3	(3.3)	(3.3)	-	-
4	(4.1) (4.2)	(4.2)	(4.1)	(4.1)
5	(5.1) (5.2)	(5.2)	(5.1)	(5.1)
6	(6.1)*	(6.1)	(6.1)*	(6.1)*

* avaliação em duas repetições.

Tabela 1. Matrizes utilizadas nos testes de protocolos e fontes de material genético (folhas frescas e câmbio congelado) de *Erythrina crista-galli* L. A numeração que identifica as matrizes foi tomada pela ordem da coleta no campo, tendo todas as matrizes posições georreferenciadas para posterior identificação a campo: (1) Protocolo modificado de Nienhuis et al. (1995) e (2) Kit comercial.

Análise da qualidade e concentração das soluções de DNA genômico

A análise da qualidade e concentração das amostras de DNA genômico obtidas a partir do emprego dos diferentes protocolos foi realizada por meio de um espectrofotômetro de UV-Vis NanoDrop®ND-1000. Neste equipamento utilizou-se 2µL da solução de DNA.

O software do equipamento baseia-se na equação de Lambert-Beer para correlacionar a absorvância com a concentração da amostra, de acordo com a

Equação 1 (SCIENTIFIC, 2008b):

$$A = E \cdot b \cdot c(1)$$

Sendo “A” representa a absorvância, representada em unidades de absorvância (A); “E” o coeficiente de absorvidade molar dependente do comprimento de onda (ou coeficiente de extinção), em unidades de mol-cm.L-1; “b” é o comprimento do caminho, em cm; e “c” a concentração do analito, em mol L-1 ou molaridade (M).

No caso particular da quantificação de ácidos nucleicos, a equação de Lambert-Beer é modificada (Equação 2) para usar o coeficiente de extinção específico para DNA em ng-cm μ L-1 (SCIENTIFIC, 2008b):

$$c = (A \cdot e) b / (2)$$

Sendo “c” corresponde à concentração de DNA em ng. μ L-1; “A” a absorvância a 260 nm (comprimento de onda correspondente ao pico de absorvância de DNA); “e”, o coeficiente de extinção (para DNA é igual a 50 ng-cm. μ L-1); e “b”, a altura da coluna criada no espectrofotômetro (neste caso corresponde a 1 cm).

Logo, o aparelho mede a absorvância a 260 nm, obtém-se um valor, que, multiplicado pelo coeficiente de extinção, indica a concentração de DNA na amostra, em ng. μ L-1 (SCIENTIFIC, 2008b).

A Figura 10 mostra etapas da qualificação do DNA utilizando-se o espectrofotômetro de UV-Vis NanoDrop® ND-1000.

Para a análise da qualidade das amostras, foi utilizada a razão A260/A230 e A260/A280. O software do equipamento utiliza as leituras da absorvância nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm para calcular, automaticamente, as razões.

Para elaborar uma curva padrão de absorvância esperada para uma solução de DNA livre de contaminantes, foram utilizados dados disponíveis no Manual do Usuário do equipamento (SCIENTIFIC, 2008b).

Resultados e discussão

Análise da qualidade e concentração das soluções de DNA genômico obtidas de folhas frescas e câmbio congelados, pelo método de Nienhuis et al. (1995), com modificações

Da análise dos resultados do isolamento de DNA *E. crista-galli* obtido a partir de câmbio e de folhas frescas mantidos congelados verificou-se que a metodologia não é adequada para estes tipos de material. Nenhuma das fontes de amostras apresentou, na quantificação por espectrofotômetro, valores dentro dos mínimos para a realização de análises de diversidade genética.

Durante a etapa de retirada do sobrenadante (após a adição de CIA) e centrifugação, observou-se que as amostras de folhas frescas resultaram em menores quantidades de sobrenadante comparativamente às amostras de câmbio. De todas as amostras de folhas frescas, entretanto, obteve-se pelo

menos 200µL de sobrenadante, exceto as amostras 1.5, 4.1 e 5.1 das quais se obtiveram, apenas, 50µL.

Para demonstrar a ineficiência dos protocolos no isolamento de DNA genômico a partir das fontes testadas elaborou-se um gráfico com a média dos valores extraídos pelas 11 amostras testadas: (1.5) (1.5) (2.1) (2.1) (3.3) (4.1) (4.2) (5.1) (5.2) (6.1) (6.1). O teste de isolamento de DNA genômico a partir do câmbio foi realizado duas vezes (das quais resultam a soma de 11 amostras testadas): na primeira tentativa de isolamento os resultados foram insatisfatórios e, portanto, optou-se por repetir a extração introduzindo novas e mantendo-se algumas amostras já testadas a fim de certificar-se que erros no protocolo pudessem ter causado o resultado tão inferior do encontrado com folhas secas.

Como todos os resultados apresentaram-se uniformemente aquém do esperado e a fim de facilitar a visualização deste resultado, optou-se por demonstrar, por meio da média, os resultados do isolamento utilizando o câmbio vascular de *E. crista-galli* (Figura 4).

O isolamento de DNA genômico a partir de folhas frescas congeladas e conservadas em embalagem plástica contendo sílica gel igualmente não constituiu uma fonte promissora de material utilizando-se o protocolo modificado de Nienhuis et al. (1995), conforme se observa na Figura 4 (b).

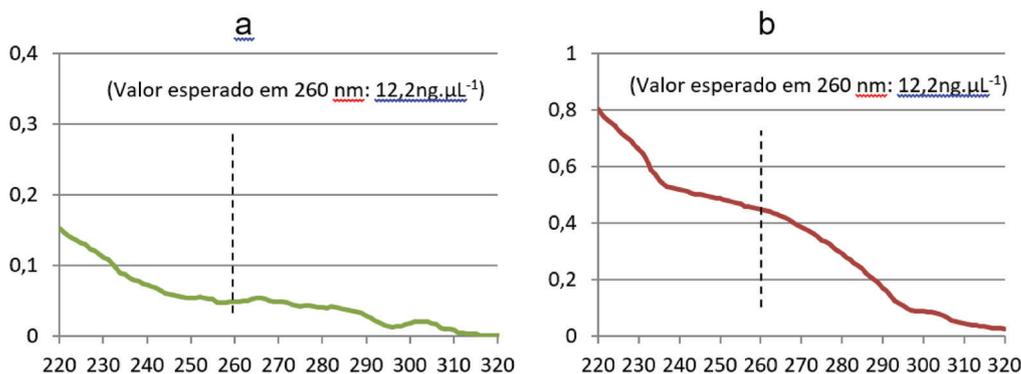


Figura 4. (a) Curva de absorvância da média de soluções de DNA obtidas de 11 amostras de câmbio de *Erythrina crista-galli* [(1.5) (1.5) (2.1) (2.1) (3.3) (4.1) (4.2) (5.1) (5.2) (6.1) (6.1)], utilizando o protocolo modificado de Nienhuis et al. (1995); (b) curva de absorvância da média de soluções de DNA obtidas de 08 amostras [(1.5) (1.5) (2.1) (2.1) (4.1) (5.1) (6.1) (6.1)], tendo como fonte de material folhas frescas de *Erythrina crista-galli*, mantidas congeladas, utilizando o mesmo protocolo.

Conclusões

A análise da qualidade e concentração das soluções de DNA genômico de folhas frescas mantidas congeladas e de câmbio vascular de *Erythrina crista-galli* L., pelos método de Nienhuis et al. (1995) e por meio do Kit Wizard® Genomic DNA resultam em diferenças pronunciadas, dentro dos fragmentos e entre os dois protocolos.

Não é possível determinar em campo diferenças fenotípicas ou ambientais marcantes entre matrizes e fragmentos de *Erythrina crista-galli* que permitam explicar rapidamente as diferenças verificadas nas extrações entre as amostras.

É possível que a profundidade das coletas de câmbio possa explicar a baixa concentração de material genômico nas amostras, bem como a alta concentração de polissacarídeos.

Uma otimização dos protocolos é necessária a fim de melhorar a qualidade do DNA isolado a ser usado nessas avaliações.

Agradecimentos

Agradeço às equipes do Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BioRep) do Departamento de Veterinária e ao Laboratório de Marcadores Moleculares do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria, RS pelo apoio em equipamentos necessários à realização deste trabalho.

Bibliografia

BORÉM, Aluizio; CAIXETA, Eveline T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV. 2006.

BORGES, Érika C.; ROMANHA, Álvaro J.; DIOTAIUTI, Liléia. Uso do Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) no estudo populacional do *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911. **Cad. Saúde Pública** [online]. Vol. 16, Supl. 2000. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-311X2000000800012&script=sci_arttext, acesso em 26 Fev 2015.

DANNER, Moeses Andriago; SASSO, Simone Aparecida Zolet; BITTENCOURT, Juliana Vitória Messias; CITADIN, Idemir; SACHET, Marcos Robson. Proposta de protocolo para extração de DNA de jabuticabeira. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 363-367, 2011. Disponível em <http://www.bioline.org.br/pdf?cf11038>, acesso em 26 Fev 2015.

FERREIRA, Márcio Elias; GRATTAPAGLIA, Dario. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p, 1998.

LODHI, Muhammad A; YE, Guang-Ning.; WEEDEN, Norman F.; REISCH, Bruce I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.12, p. 6-13, 1994.

MAZZA, Maria Cristina Medeiros; BITTENCOURT, Juliana Vitória Messias. Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 41, p. 12-17, jul./dez, 2000. Disponível em: <http://www.cnpf.embrapa.br/publica/boletim/boletarqv/boletim41/mazza.pdf>, acesso em 26 Fev 2015.

MELLO, Luciano Moura de. **Superação de dormência e influência da temperatura, substrato e fotoperíodo na germinação de sementes de *Erythrina crista-galli* Linn. (FABACEAE)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, 2011.

MELLO, Luciano Moura de; CANTOS, Alexandra Alves; SILVA, Ana Carolina S. da; MENEGUELLO, Geri Eduardo; VILLELA, Francisco Amaral. Maturação fisiológica, aspectos biométricos e insetos associados a frutos, flores e sementes de Corticeira-do-banhado (*Erythrina crista-galli* L., FABACEAE), em Bagé, RS. **Informativo ABRATES**, vol. 23, n. 3, 2013. Disponível em: <http://www.abrates.org.br/informativo/artigos-publicados/30-informativo-abrates-volume-23-numero-3>, acesso em 26 Fev 2015.

MELLO, Luciano Moura de; REINIGER, Lia Silveira; MENEGUELLO, Geri Eduardo; MOTA, Monalize Salete; VILLELA, Francisco Amaral. Isolamento de DNA genômico a partir de folhas secas de *Erythrina crista-galli* L., FABACEAE (Corticeira-do-banhado). **Revista Thema** (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-Rio-Grandense), vol. 12, n. 1, 2015. Disponível em: <http://revistathema.ifsul.edu.br/index.php/thema/article/view/282>, acesso em 12 Dez 2015.

MELO, Marília Freitas de Vasconcelos. **Diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Erythrina velutina* Willd.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão. 2010.

NIENHUIS, James; TIVANG, Jan; SCKROCH, Paul; SANTOS, João B. Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Madison, v. 120, n. 2, p. 300-306, 1995. Disponível em: <http://journal.ashspublications.org/content/120/2/300.full.pdf>, acesso em 26 Fev 2015.

PAGE, Andrew F. Detection and avoidance of polysaccharides in Plant Nucleic Acid extractions. **Thermo Fisher Scientific - NanoDrop Products**, Wilmington, 2010. Disponível em: <http://www.thermo.com.cn/Resources/201305/3110520421.pdf>, acesso em 26 Fev 2015.

SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David W. Spectrophotometry of DNA or RNA. In: **Molecular Cloning**. 3 ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold spring Harbor Laboratory Press. n. 3, A8.20-A8.21, 2001.

SCIENTIFIC, Thermo. **NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual**. 2010. Disponível em: <http://www.nanodrop.com/Library/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf>, acesso em 26 Fev 2015.

TAI, Thomas H.; TANKSLEY, Steven D. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 8, p. 297-303, 1990.

THOMSON, Darelle; HENRY, Robert. Use of DNA from dry leaves for PCR and RAPD analysis. **Plant Molecular Biology Reporter**. n. 11, p. 202-206. 1993.