

METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO DE DNA EM VIDEIRA PARA ANÁLISES RAPD E AFLP¹

Ana Veruska Cruz da SILVA²

RESUMO: O gênero *Vitis* é de grande importância econômica mundial e está se tornando assunto de diversos estudos genéticos. O objetivo do presente trabalho é avaliar a qualidade de DNA extraído de folhas jovens de 19 cultivares de videira, utilizando seis métodos de extração - Saghay-Marooof, Soleman e Allard (1984); Shillito e Saul (1988); Doyle e Doyle (1991); Lodhi et al. (1994); This, Cuisset e Boursiquot (1997) e Lin e Kuo (1998) - para análise RAPD e AFLP. O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria e sua qualidade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio (0,05 g/mL). Para análise PCR-RAPD utilizaram-se sete iniciadores de síntese (B12, B13, C12, D6, E10, J5 e UBC 301). Após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, os resultados foram visualizados em Gel-doc. Pela extração descrita por Shillito e Saul (1988) não se obteve DNA em nenhuma das cultivares, o mesmo aconteceu quando se utilizou a metodologia de Lin e Kuo (1998) quando as cultivares foram os porta-enxertos. Apesar das demais metodologias possibilitarem a extração de DNA suficiente, esses DNAs apresentaram-se degradados ou não amplificaram, com exceção de Lodhi et al. (1994), para análises PCR-RAPD, e Doyle e Doyle (1991), para análises AFLP.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Marcadores Moleculares, *Vitis*.

DNA EXTRACTION METHODOLOGIES IN VINE FOR RAPD AND AFLP ANALYSIS

ABSTRACT: The *Vitis* gender is one of the oldest domesticated plants and it is becoming the subject of extensive genetic studies related to its worldwide cultivation and economic importance. The objective of the present work was to determine the quality of DNA in leaves of 19 cultivar of grapevine using the extraction methodologies of Saghay-Marooof Soleman and Allard (1984); Shillito and Saul (1988); Doyle and Doyle (1991); Lodhi et al. (1994); Cuisset and Boursiquat (1997) and Lin and Kuo (1998) for RAPD and AFLP analysis. The DNA was quantified by spectrophotometer and its quality was evaluated by electrophoresis in agarose gel 0.8%. For analysis PCR-RAPD one used seven primers (B12, B13, C12, D6, E10, J5 and UBC 301). The results were visualized in Gel-doc after electrophoresis in agarose

¹ Aprovado para publicação em 25.08.06

² Engenheira Agrônoma, DSc., Professora Visitante do Deptº de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de Sergipe-UFS, São Cristóvão (SE). E-mail: anaveruska@hotmail.com

gel 1.5%. For the described extraction for Shilito and Saul (1988) DNA was not obtained in any cultivar by the extraction technique of Shilito and Saul (1998). The same was observed with rootstocks when it was used the methodology of Lin and Kuo (1998). Despite the use of too much methodologies to make possible the extraction of sufficient DNA, these DNAs presented itself degraded or did not amplify with exception of Lodhi et al. (1994), for analyses of PCR-RAPD, and Doyle and Doyle (1991) for analyses of AFLP.

INDEX TERMS: Molecular Markers, *Vitis*.

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que o genoma da videira é relativamente pequeno quando comparado a outras espécies perenes, e acreditava-se que isso poderia facilitar os estudos em genética molecular (LODHI et al., 1994). Porém, sua extração de DNA é bastante delicada, devido à presença de contaminantes, como polifenóis e polissacarídeos. Segundo Fang, Hammar e Rebecca (1992), estes compostos são responsáveis pela dificuldade na purificação do DNA, e sua presença resulta em amostras viscosas e de difícil digestão de endonuclease e amplificação da PCR.

A obtenção de bons resultados em análises moleculares como RAPD (Amplificação casualizada de DNA polimórfico) e AFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados por fluorescência) é condicionada a um DNA de boa qualidade. As extrações de DNA devem produzir amostras puras, de maneira a não inibir os tratamentos enzimáticos ou interferir nos padrões de amplificação da PCR e migração em gel de agarose/acrilamida.

A escolha do tecido vegetal é muito importante para uma boa extração. No caso de

videira, o uso de tecidos muito jovens resultam em baixas concentrações de DNA (LODHI et al., 1994). Segundo Ferreira e Grattapaglia (1995), esses critérios são ainda mais importantes em espécies que produzam grandes quantidades de metabólitos secundários que, em geral, interferem na extração de DNA.

Uma diferença básica entre as metodologias existentes é a composição do tampão de extração que, normalmente, integra um agente tamponante para estabilizar o pH em torno de 8; um sal para dissociar as proteínas do DNA; um detergente para solubilizar as membranas e auxiliar na inativação de algumas enzimas; e um inibidor de DNAses para proteger o DNA (BERED, 1998).

Atualmente, existem diversas metodologias para extração de DNA de plantas, sendo que suas modificações objetivam, na maioria das vezes, resolver problemas específicos para cada espécie em estudo. No caso específico da videira, a metodologia descrita por Lodhi et al. (1994), utiliza NaCl e PVP (polivinilpirrolidona) para remover

polissacarídeos e polifenóis, respectivamente.

O objetivo do presente trabalho é avaliar seis metodologias de extração de DNA genômico em 19 cultivares de videira, visando a obtenção de DNA para realização de análises RAPD e AFLP.

2 MATERIALE MÉTODOS

O material vegetal utilizado (folhas) foi obtido na Embrapa Semi-árido, localizada em Petrolina, (PE). O experimento foi realizado no Laboratório de Micropropagação e Biologia Molecular, pertencente ao Departamento de Produção Vegetal da Universidade Estadual Paulista, em Jaboticabal (SP)

Utilizaram-se folhas jovens de videira, das cultivares Sultanina, Patrícia, Beauty Seedless, Dona Maria, Perlette, Benitaka, Superior Seedless, Christmas Rose, Catalunya, Alphonse Lavallé, Niagara Rosada, Vênus, Marroo Seedless, Red Globe, Isabel, Itália, IAC 766, IAC 572 e IAC 313.

As metodologias testadas foram as descritas por Saghay-Maroofo, Soleman e Allard (1984); Shillito e Saul (1988); Doyle e Doyle (1991); Lodhi et al.(1994); This, Cuisset e Boursiquot (1997) e Lin e Kuo (1998). A quantidade de DNA obtida nas seis metodologias de extração foi determinada em espectrofotômetro, medindo a absorbância nos comprimentos de onda 260nm e 280nm, utilizando a relação $1DO = 50 \text{ ng/}$ de DNA (M A N I A T I S ; F R I T S C H ; SAMBROOK,1982). Após a quantificação, foi preparada uma solução de trabalho de 500, onde o DNA foi diluído em água milli Q

filtrada para a padronização da concentração do DNA de cada amostra individual para 20 ng. O DNA original foi mantido em tampão TE e congelado a -20°C.

Para a determinação da qualidade do DNA, as amostras foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%. A corrida foi realizada em 0,5 TBE (Tris-borato-EDTA) a 100V, corando-se o gel em solução de 0,05 g/mL de brometo de etídio.

Para verificar o efeito da metodologia de extração na reproducibilidade do perfil de bandas, o DNA extraído foi utilizado para PCR. Na análise de PCR em RAPD, elegeram-se seis iniciadores aleatórios, de 10 pares de bases da marca 'Operon' (B12, B13, C12, D6, E10 e J5) e um iniciador da University of British Columbia (UBC 301).

Cada reação de PCR foi realizada em tubo previamente estéril, contendo: 50ng de DNA, tampão de PCR (GIBCO-BRL) 1X, $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, 1,0 U Taq DNA polimerase (GIBCO), 30 ng/L de iniciador, água milli-Q filtrada q.s.p. 20 L. Os DNAs foram amplificados utilizando termociclador (PTC-100 Programable Thermal Controler) e submetidos a um ciclo de 94°C por 1 minuto; 92°C por 1 minuto; 35° C por 1 minuto, seguido por 92°C por 1 minuto; 35°C por 1 minuto; 72°C por 2 minutos; 40 vezes (92°C por 1 minuto; 35°C por 1 minuto; 92°C por 1 minuto; 35°C por 1 minuto; 72°C por 2 minutos) e, finalmente, um ciclo de 72°C por 5 minutos.

As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese (100V por 1h30min.) em gel de agarose 1,5% , dissolvidas em solução contendo 89 mM ácido bórico; 89 mM Tris; 2,5 mM EDTA, contendo brometo de etídio (0,05 g/mL) e água milli-Q filtrada. Como padrão de peso molecular foi utilizado *ladder* de 1kb (GIBCO-BRL). A visualização dos resultados foi realizada em equipamento de fotodocumentação (Gel Doc 1000 Bio Rad).

Para análise AFLP, empregou-se o “AFLP Plant Mapping” (PE Applied Biosystems). O DNA genômico foi digerido utilizando-se a seguinte reação: 500 ng DNA, 1,25 L de tampão React 1 (Gibco BRL) (500 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM MgCl₂), 5U de Eco RI, 1U de Mse I, água milli-Q qsp 10 L. A reação foi incubada por 12 horas a 37°C e, em seguida, as enzimas foram inativadas por 10 minutos, a 65°C. Os fragmentos foram ligados a adaptadores (PE Applied Biosystems), utilizando-se de 1 L tampão T4 DNA Ligase (Gibco), 0,5 L T4 DNA ligase, 0,33 L do adaptador para o corte da Mse I, 0,33 L do adaptador para o corte da Eco RI e 3,67 L da reação de digestão. A ligação ocorreu por duas horas a 20°C, e, então, foi diluída 8,5 vezes. Procedeu-se a amplificação pré-seletiva dos fragmentos, com reações de 20 L. Utilizaram-se 3 L do produto da ligação diluído, 15 de Core Mix (PE Applied Biosystems), 1 L do iniciador para o adaptador Eco RI (1 M) e 1 L do iniciador para o adaptador Mse I (5 M). As condições de amplificação consistiram de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Após verificação da reação pré-seletiva em gel de agarose, os

produtos da amplificação pré-seletiva foram diluídos 10 vezes e utilizados para a amplificação seletiva, cuja reação foi semelhante à anterior; entretanto, utilizaram-se iniciadores de mesmas seqüências que os empregados anteriormente, porém, com adição de 3 bases na extremidade 3' e com marcação fluorescente. A amplificação foi realizada com uma etapa desnaturante inicial de 94°C por 2 minutos, seguida de 10 ciclos de 94°C por 20 segundos, 66°C (diminuindo 1 grau por ciclo) por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, 20 ciclos de 94°C por 20 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos e uma etapa final de 60°C por 30 minutos. A eletroforese das amostras foi realizada em seqüenciador ABI 377 (Perkin-Elmer) por 3 horas. As combinações de iniciadores testadas foram: ACC/CTC; ACC/CTT; ACC/CAT; ACC/CTA; AAG/CTC; ACT/CTC; ACT/CTA; ACT/CTG e AGG/CTT.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela quantificação por meio de espectrofotometria, verificou-se que os métodos de extração resultaram em concentrações de DNA consideráveis, isto é, de média a alta (Tabela 1). À exceção do método descrito por Shillito e Saul (1988), que não possibilitou leitura, as concentrações em mg/ μ L de DNA dos outros métodos testados variaram entre 34,1 para 'Niágara Rosada' (SAGHAI - MAROOF; SOLEMAN; ALLARD, 1984) a 2611 mg/ μ L para cv. Christmans Rose (LIN; KUO, 1998).

Tabela 1 - Concentração de DNA extraído de folhas de *Vitis* spp. em mg/ μ L obtida pelos métodos de Lin e Kuo (1997) - LK; Saghai-Marrof, Soleman e Allard (1984) - SM; This, Cuisset e Boursiquot (1997); Doyle e Doyle (1991) - DD e Lodhi et al. (1994). FCAV/UNESP, Jaboticabal, 2002.

Cultivar	LK		SM		This		DD		Lodhi	
	mg/ μ L	260/280	mg/ μ L	260/280	mg/ μ L	260/280	mg/ μ L	260/280	mg/ μ L	260/280
Sultanina	1206,4	1,27	113,6	1,34	179,2	1,30	337,4	1,55	517,9	1,82
Patrícia	1780,3	1,25	105,4	1,29	201,7	1,28	211,6	1,57	243,9	1,37
Beauty	1142,9	1,21	157,5	1,24	71,0	1,23	410,9	1,70	252,6	1,70
D.Maria	1614,7	1,15	87,4	1,24	32,0	1,11	80,4	1,21	330,6	1,45
Perlette	1841,4	1,23	100,8	1,25	111,8	1,19	393,7	1,70	605,5	1,52
Benitaka	878,8	1,20	169,6	1,33	155,9	1,18	110,1	1,46	165,2	1,45
Superior	1465,5	1,27	109,8	1,28	87,0	1,26	115,2	1,72	247,1	1,73
Christmas	2611,1	1,22	108,3	1,35	171,4	1,35	169,3	1,52	195,9	1,60
Rose										
Catalunia	2104,2	1,21	92,9	1,29	192,0	1,30	77,4	1,28	512,6	1,78
Alphonse	1778,5	1,20	126,3	1,31	172,6	1,25	99,2	1,54	481,0	1,67
Lavalle										
Niágara	1330,7	1,23	34,1	1,22	102,9	1,22	141,3	1,68	1.307	1,64
Rosada										
Vênus	1328,6	1,26	276,8	1,56	114,7	1,18	98,8	1,40	311,9	1,49
Marroo	1137,9	1,28	102,5	1,28	89,1	1,32	173,6	1,43	372,8	1,59
Red Globe	1397,6	1,30	86,5	1,26	202,5	1,39	175,5	1,24	578,3	1,73
Isabel	1904,9	1,20	73,8	1,31	178,9	1,22	949,3	1,84	611,4	1,61
Itália	1286,9	1,18	162,1	1,30	178,9	1,22	181,3	1,86	756,6	1,71
IAC 766	**	**	157,2	1,27	125,5	1,28	246,5	1,50	327,0	1,48
IAC 572	**	**	118,9	1,23	102,5	1,27	163,9	1,58	752,0	1,77
IAC 313	**	**	146,8	1,28	119,2	1,24	78,1	1,40	514,0	1,81

* 260/280 – relação DNA/proteína

** sem leitura

A metodologia de Lin e Kuo (1998), também conhecida como DNazol, apresentou as maiores concentrações de DNA, entretanto a relação 260/280 foi muito baixa e variou de 1,18 a 1,30, uma vez em que se considera ideal uma relação superior a 1,7 (SAMBROOK; MANIATIS; FRITSCH,

1989). Houve, inclusive, algumas amostras nas quais a leitura não foi possível como em 'IAC 313', 'IAC 766' e 'IAC 572', indicando uma má qualidade do DNA. Em abacaxizeiro, Gottardi (2001) utilizou essa metodologia com sucesso, obtendo DNA de qualidade, que possibilitou análises RAPD

para avaliar plantas matrizes da cv. Smooth Cayenne. Esta metodologia é a mais rápida de ser executada, além de apresentar outras vantagens como a ausência de compostos voláteis e tóxicos, como o 2 mercaptoetanol.

Quanto à metodologia de Saghai-Maroofo, Soleman e Allard (1984), a concentração de DNA obtida variou de 34,1 mg/μL em 'Niagara Rosada' a 276,8 mg/μL em 'Vênus', e a relação 260/280 variou de 1,23 a 1,58. Essa metodologia tem sido amplamente utilizada em outras espécies, como citros (SILVA; MACHADO; LEMOS, 2004), mamão (SANTOS et al., 2003) e maracujá (AUKAR; LEMOS; OLIVEIRA, 2003); porém, no caso da videira não foi possível a obtenção de DNA de qualidade.

Alguns trabalhos realizados com videira citam a extração de This, Cuisset e Boursiquot (1997) como padrão (LAHOUE; THIS; BOUQUET, 1998; THIS et al., 2000; NARVÁEZ et al., 2000). No presente estudo, as concentrações de DNA variaram de 71 mg/μL em Beauty Seedless a 202,5 mg/μL em Redglobe, com relação variando de 1,18 a 1,35.

Apesar de todas as metodologias possibilitarem a extração de DNA suficiente (com exceção de Lin e Kuo (1988), esses DNAs apresentaram-se degradados ou não amplificaram.

Utilizando as cultivares e os iniciadores testados no presente trabalho, e tendo como base a quantificação do DNA, as melhores metodologias para extração de DNA da videira foram as descritas por Doyle e Doyle (1991) e Lodhi et al. (1994).

Pela extração de Doyle e Doyle (1991) obtiveram-se concentrações mais expressivas de DNA, variando de 78,1 mg/μL para o porta-enxerto IAC 313 a 949,3 mg/μL para cultivar de mesa Isabel, e uma relação 260/280 variando de 1,40 a 1,86. Essa metodologia tem sido bastante utilizada em outras fruteiras, como o cajueiro (SILVA; GRILLI; DALPIAN, 2002) e o mamoeiro (ZAIDAN, 2002).

A metodologia de Lodhi et al. (1994) é na verdade uma modificação de Doyle e Doyle (1991). A esta foram acrescentados NaCl objetivando a remoção de polissacarídeos (FANG; HAMMAR; REBECCA, 1992), e PVP, para eliminar os polifenóis, que são problemas específicos encontrados na extração de DNA de videira. O hidrogênio complexo do PVP liga-se aos compostos fenólicos que podem, assim, ser separados por centrifugação (MALIYAKAL, 1992). Essa metodologia também foi utilizada com sucesso na extração de DNA em maçã (*Mallus domestica*), pêra (*Prunus persica*), ameixa (*Prunus domestica*) e framboesa (*Rubus idaeus*) (LODHI et al., 1994). No presente estudo, ela resultou em amostras onde obteve-se tanto altas concentrações de DNA - que variaram de 243,9 mg/μL em Patrícia a 1,307 ng/μL em Niagara Rosada, com uma relação 260/280 sendo satisfatória, de 1,47 a 1,86.

Para confirmação desses resultados, foi realizada uma quantificação em gel de agarose 0,8%, utilizando 10 μL de cada amostra, para a visualização do DNA

(presença ou ausência de degradação ou impurezas que interferem na migração), o que só foi possível quando se utilizou as amostras resultantes da extração de Lodhi et al. (1994), (Figura 1). O DNA obtido foi de boa qualidade, pois não houve rastros nos géis de quantificação, indicando baixo nível de degradação.

Após os resultados da quantificação e dos testes de padronização de metodologia para RAPD e AFLP, realizaram-se alguns testes com todas as cultivares, com diferentes iniciadores (Figura 2).

Se por um lado a presença de PVP foi adequada para análises RAPD, o mesmo não aconteceu para análises AFLP, onde a

metodologia de Doyle e Doyle (1991) apresentou melhores resultados, uma vez que só foi impossível conseguir êxito nas etapas de digestão e amplificação pré-seletiva quando utilizaram-se as amostras obtidas pela metodologia de Lodhi et al. (1994) (Figura 3).

Este fato pode ter sido resultado do uso de PVP, NaCl e/ou outras impurezas que provocaram a digestão parcial do DNA na extração de Lodhi et al. (1994), sendo que a técnica de AFLP é mais exigente na integridade do DNA do que o RAPD. A Figura 4 é um exemplo de um gel de AFLP utilizando DNA de qualidade, obtidos pela metodologia de Doyle e Doyle (1991).

FIGURAS



Figura 1- Padrões de bandejamento de fragmentos de DNA amplificados por RAPD utilizando-se o iniciador de síntese J5: (CN) controle negativo, (P) padrão de peso molecular de 1Kb, (1) Shillito e Saul, 1988; (2) This, Cursset e Boursiquot, 1997; (3) Doyle e Doyle, 1991; (4) Lodhi et al. 1994; (5) Saghai-Marooof, Soleman e Allard, 1984; (6) Lin e Kuo (1998).

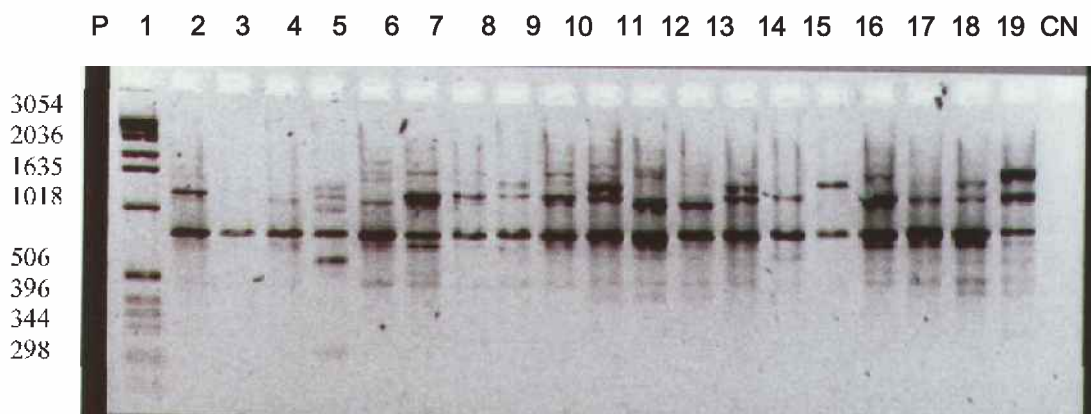


Figura 2- Padrões de bandejamento de fragmentos de DNA amplificados por RAPD, utilizando o “primer” UBC 301 para as amostras resultantes da extração de Lodhi et al. 1994: (P) padrão de peso molecular de 1Kb; canaletas com os diferentes cultivares de uva (Thompson seedless, Patrícia, Beauty Seedless, Brasil, Perlette, Benitaka, Superior Seedless, Christmans Rose, Catalonia, Alphonse Lavalle, Niagara rosada, Vênus, Marroo Seedless, Centennial Seedless, Isabel, Itália, IAC 766, IAC 572 e IAC 313); (CN) controle negativo.

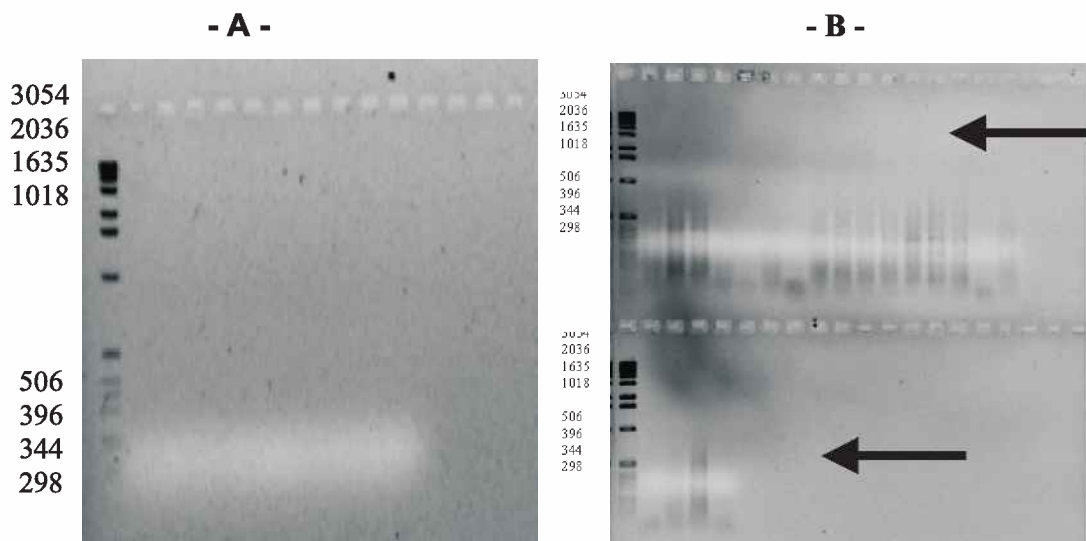


Figura 3- Géis da Pré-seletiva (AFLP) utilizando as extrações de Lodhi et al. (1994) A, e Doyle e Doyle (1991) - B. As setas indicam a observação da digestão completa do DNA.

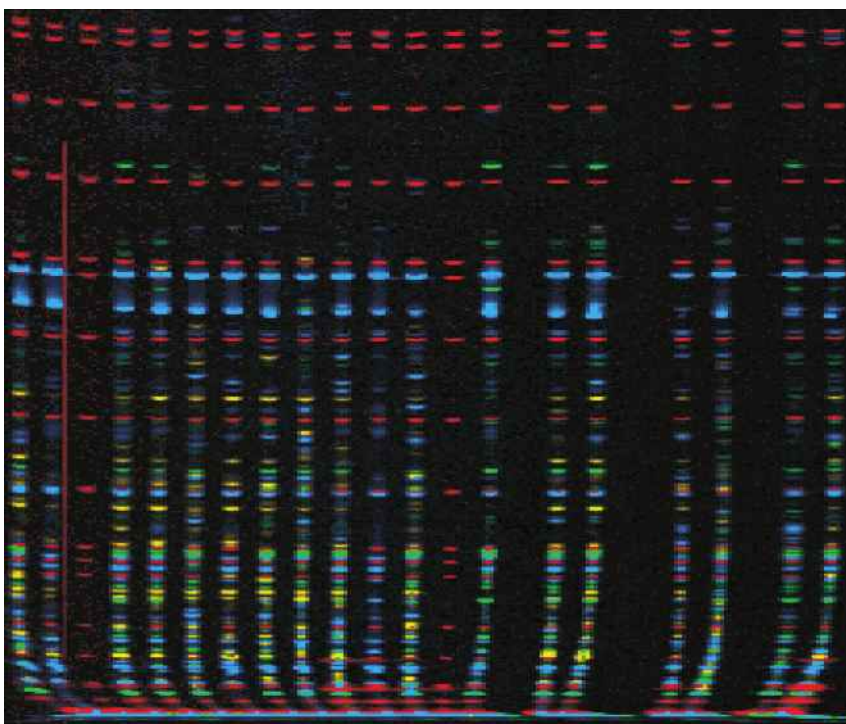


Figura 4- Exemplo de um gel AFLP (JOE AAG/CTC; NED ACC/CAT; FAM ACT/CTG) com DNA de 19 cultivares de videira obtidos da extração de Doyle e Doyle (1991).

4 CONCLUSÃO

Para análise RAPD, a melhor metodologia de extração de DNA genômico testada em videira é a proposta por Lodhi et al.(1994), e, para AFLP, a descrita por Doyle e Doyle (1991).

REFERÊNCIAS

- AUKAR, A.P.de A.; LEMOS, E.G. de M.; OLIVEIRA, J.C. Genetic variations among passion fruit species using rapd markers. *Revista Brasileira de Fruticultura*. v. 24, n.3, p.738-740, 2003.
- BERED, F. Extração de DNA-considerações e prática. In: MILACH,S. (Ed.) *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141p.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, Moscou, v.1, p.13-15, 1991.
- FANG, G.; HAMMAR, S.; REBECCA; R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *BioTechniques*, v.13, p.52-56, 1992.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética*. Brasília, DF: Embrapa-Cenargen, 1995. 220p.

GOTTARDI, M.V.C. *Avaliação de plantas matrizes de abacaxizeiro cv. Smooth Cayenne, utilizando marcadores RAPD e padrões isoenzimáticos*. 2001. 81f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

LAHOGUE, F.; THIS, P.; BOUQUET, A. Identification of a codominant Scar marker linked to the seedlessness character in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.97, p. 950-959, 1998.

LIN, J.J.; KUO, J. A new reagent for simple isolation of plant genomic DNA. *Plant Biotechnology*, v.20, n.2, p. 46-48, 1998.

LODHI, M.A.; GUANG-NING, YE; WEEDEN, N.F.; REISCH, B.I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, Dordrecht, v.12, n.1, p.6-13, 1994.

MALIYAKAL, E.J. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Research*, v.20, p.2381, 1992.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. *Molecular cloning a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545p.

NARVÁEZ, C.R.; VALENZUELA, J.B. ; MUÑOZ, C.; MINRICHSEN, P.R. Comparasion of RAPD and AFLP as methods for genetic identification on *Vitis* based on the analysis of anonymous genomic sequences. *Agricultura Técnica*, v.60, n. 4, p. 320-340, 2000.

SAGHAI-MARROF, M.A.; SOLEMAN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribossomal DNA spacer lenght polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromossomal location, and population Dynamics. *PANS*, London, v.81, p. 8014-8018, 1984.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANTOS, S.C.; RUGGIERO, C.; SILVA, C.L.S.P.; LEMOS, E.G.M. A microsatellite library for *Carica papaya* L. cv. Sunrise Solo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.25, n.2, p. 263-267, 2003.

SHILLITO, R.D.; SAUL, M.W. Protoplast isolation and transformation. In: SHAW, C.H. (Ed.). *Plant molecular biology: a pratical approach*. Oxford: IRL Press, 1988. p.181.

SILVA, A.V.C. da; GRILLI, G.V.G.; DALPIAN, T. Utilização de marcadores RAPD para caracterização de clones comerciais de cajueiro. *Horticultura Brasileira*, v.20, n.2, p.296, 2002. Suplemento. CD-Room.

SILVA, C.L.S.P.; MACHADO, M.A.; LEMOS, E.G.M. Expressão protéica diferencial entre plântulas apomíticas e zigóticas de citros. *Revista Brasileira de Fruticultura*. v.26, n.1, 2004.

THIS, P.; CUISSET, C.; BOURSIQUOT, J.M. Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, v.48, p.492-501, 1997.

_____; LAHOGUE, F.; ADAM-BLONDON, A.F.; DOLIGEZ, A.; BOUQUET, A. Towards marker-assisted selection for seedlessness in grapevine. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v. 528, p. 221-229, 2000.

Z A I D A N, H u m b e r t o A c t i s. *Micropropagação e uso de marcadores moleculares na determinação do sexo do mamoeiro*. 2002. 154f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.