

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/308013926>

GelRed TM na coloração de DNA em *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) GelRed TM in DNA staining in *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae)

Article · May 2016

CITATIONS

0

READS

28

4 authors, including:



[Paulo Sarmanho Costa Lima](#)

Brazilian Agricultural Research Corporation (...)

24 PUBLICATIONS 67 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[Francilene Leonel Campos](#)

Universidade Federal do Piauí

9 PUBLICATIONS 25 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

GelRed™ na coloração de DNA em *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae)

GelRed™ in DNA staining in *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae)

Waldenrique Gomes de OLIVEIRA ¹; Paulo Sarmanho Costa LIMA ²; Cintia Martins PERINOTTO ³; Francilene Leonel CAMPOS ⁴

Recibido: 25/04/16 • Aprobado: 12/05/2016

Conteúdo

1. Introdução

2. Metodologia

3. Resultados e Discussão

4. Conclusão

Referências

RESUMO:

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae), é utilizada na produção de biodiesel. Objetivou-se ajustar o protocolo de extração de DNA vegetal de Doyle e Doyle (1987) e medir a eficiência do corante fluorescente de ácidos nucleicos GelRed™, considerado de baixo risco para a saúde humana, em substituição ao Brometo de Etídio (EtBr), na visualização de DNA extraído de *Jatropha curcas* L. As extrações de DNA foram realizadas nos laboratórios da Universidade Federal do Piauí, em Parnaíba, e no da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, em Teresina, Piauí. GelRed™ revelou-se nítido para a visualização das bandas, conferindo uma opção na substituição do EtBr.

Palavras-chave: brometo de etídio, espectrofotometria, biodiesel.

ABSTRACT:

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae) is used in the production of biodiesel. Aimed to adjust the plant DNA extraction protocol of Doyle and Doyle (1987) and measure the efficiency of fluorescent dye GelRed™ nucleic acids, considered low risk to human health, replacing Ethidium Bromide (EtBr) in DNA extracted from viewing *Jatropha curcas* L. DNA extractions were performed in the laboratories of the Federal University of Piauí, Parnaíba, and the Brazilian Agricultural Research in Teresina, Piauí. GelRed™ proved to be clear for viewing the bands, giving an option to replace the EtBr.

Keyword: ethidium bromide, spectrophotometric, biodiesel

1. Introdução

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é uma das fontes de bioenergia mais promissora. Esta oleaginosa de origem tropical é produtora de óleo e bem adaptada a diversas regiões do Brasil. É de polinização cruzada e apresenta indivíduos com 22 cromossomos ($2n=22$), (Carvalho et al., 2008)

De acordo com Dange et al. (2006) e Sharma (2006), o pinhão manso apresenta vantagens especiais que o destacam como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel, tais como, o fato de ser uma fonte de energia renovável, promover o balanço de dióxido de carbono do ambiente, emitir menos poluentes que os combustíveis fósseis, apresentar tecnologia simples de produção de combustível, possuir elevado conteúdo de óleo nas sementes comparativamente a outras espécies com potencial para biodiesel. Além disso, segundo os autores, o pinhão é capaz de sobreviver as mais variadas condições ambientais devido à dormência de suas sementes, tem um curto período para o início de produção, é uma planta perene.

O uso do pinhão manso na produção do biodiesel traz grandes possibilidades e perspectivas para o crescimento das áreas de plantio dessa cultura no semiárido nordestino, no qual ainda existem poucos estudos relativos à sua completa caracterização morfológica e molecular (DANTAS et al 2009).

Apesar das características citadas, sua domesticação teve início somente nos últimos 30 anos, e ainda não foram desenvolvidos cultivares dessa planta.

Um dos métodos mais eficientes para se descrever uma espécie é estudando a sua diversidade genética através de características fenotípicas e moleculares. Estas são informações importantes para que se possam conduzir programas de conservação e melhoramento genético das espécies, inclusive para o pinhão manso.

Existem várias metodologias disponíveis para o isolamento de DNA genômico de plantas, mas, na prática, esses procedimentos são empíricos em função da variabilidade existente na composição do tecido vegetal utilizado. Os métodos convencionais simples de extração não são necessariamente reproduzíveis para todas as espécies, sendo necessárias adaptações e modificações.

Um dos protocolos mais utilizados para a extração de DNA vegetal é o baseado no uso do detergente CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987). A maioria dos protocolos descritos que utilizam esse protocolo de CTAB padrão realizam algumas alterações, visando resolver os problemas específicos da espécie em estudo.

Os métodos mais utilizados com sucesso para diferentes espécies são os que derivam basicamente do método descrito por Dellaporta *et al.* (1983), e aqueles baseados no uso do detergente CTAB (brometo de ciltetrametilamônio), descrito por Doyle e Doyle (1987), onde esse detergente solubiliza as membranas, formando com o DNA um complexo que facilita uma posterior precipitação (WEISING *apud* ROMANO e BRASILEIRO, 1999; DANTAS, 2011).

A principal diferença entre os protocolos de extração de DNA de plantas está na 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).

Os principais problemas encontrados no isolamento do DNA vegetal são, geralmente, relacionados ao co-isolamento de polissacarídeos, substâncias fenólicas e compostos secundários (VIDAL *et al* 2003). Além disso, durante a realização desses protocolos são utilizadas substâncias que exigem cuidados especiais durante o seu manuseio e estocagem. Por exemplo, o nitrogênio líquido, que necessita de uma câmara especial para o seu armazenamento, ou o corante de ácidos nucleicos brometo de etídio, que é uma substância carcinogênica e mutagênica, o que implica cuidados de biossegurança não somente do manipulador, mas de todos que compartilham o uso do laboratório, cujos cuidados incluem, o uso de mascara, luvas, óculos de proteção, além de um ambiente isolado para este fim (TEIXEIRA, et AL, 1998).

Atualmente sugerem-se alternativas para a substituição do brometo de etídio. O corante GelRed™ configura-se como uma destas opções pelo fato de não apresentar risco a saúde, ser de fácil manuseio e descarte, por ser ultrasensível, extremamente estável e ambientalmente seguro (BIOTIUM,INC.,2011).

Faz-se necessário então, protocolos de purificação de DNA ideais para cada organismo, capazes de extrair DNA em qualidade e quantidade adequadas, de forma rápida e eficiente, além da identificação de marcadores que permitam quantificar a variabilidade genética destes (DANTAS,2011, XAVIER et AL., 2004).

O presente trabalho teve como objetivo geral o ajuste do protocolo de extração de DNA de Doyle e Doyle (1987) tornando-o mais específico para o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), utilizando o corante de nucleotídeos GelRed™ visando à obtenção de DNA de alta qualidade, em quantidade, de forma rápida e eficiente. Gerar dados que serão suporte para um estudo de caracterização molecular e um posterior estudo de divergência genética que irá sugerir dentre estas variedades promissoras possíveis progenitores em um programa de melhoramento genético a ser desenvolvido nesta região.

2. Metodologia da Pesquisa

A coleta dos 18 acessos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) foi realizada no Perímetro Irrigado dos Tabuleiros Litorâneos do Piauí, localizado a 2°55' de latitude Sul e 41°50' de longitude Oeste, a 40 metros acima do nível do mar, na cidade de Parnaíba. Possui os seguintes tipos de solo: latossolo amarelo, podzólico vermelho amarelo e areia quartzosa, As folhas jovens foram coletadas e armazenadas em gel de CTAB 2x, depositadas em geladeira no Laboratório Células e Moléculas da

Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Veloso, Parnaíba PI, e posteriormente procedeu-se a extração de DNA genômico.

2.1. Extração e Visualização do DNA Genômico

As extrações e visualizações foram realizadas no Laboratório de Células e Moléculas da Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Veloso, Parnaíba PI, assim como na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, no Laboratório de Biologia Molecular, Teresina, PI.

O DNA genômico das folhas foi extraído utilizando-se como base o método proposto por DOYLE e DOYLE, 1987, com modificações.

Fez-se uso para a extração de DNA 500 µg de folhas frescas, maceradas na presença de 200 µl de CTAB 2x. Depois de macerado o material foi transferido para microtubos Eppendorf de 1,7 ml contendo 800µl de CTAB 2x + 4µl de β- mercaptanoetanol previamente aquecidos em banho-maria durante 10 min a 60-64°C, homogeneizado e deixados em banho-maria por 20 min com a mesma temperatura. Posteriormente, adicionou-se 800µl de solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) às amostras e levadas ao shaker durante 1 hora. Em seguida, centrifugou-se as amostras a 13000 rpm por 5 min à temperatura ambiente, retirou-se o sobrenadante para um novo microtubo Eppendorf de 1,7 ml, no qual foi adicionado 2/3 ou mais do volume, aproximadamente 500µl, das amostras de isopropanol gelado e deixado as amostras em freezer de um dia para o outro. Retornou-se as amostras à temperatura ambiente e centrifugou-se a 13000 rpm por 5 min à temperatura ambiente seguido do descarte da parte líquida por inversão, deixando somente o *pellet*, e da lavagem do material com álcool etílico 70%, aproximadamente 400 µl, homogeneizando bem por 5 min, centrifugando-se novamente por 5 min à 13000 rpm e descartando-se o álcool. Esse processo de lavagem foi repetido 2 vezes. Após a lavagem as amostras secarem com os microtubos Eppendorf abertos de um dia para o outro e, para finalizar a extração, foram ressuspendido em 100 µl de TE - BORATO 100 em até 48 horas.

O DNA extraído dos acessos de pinhão manso foram corados com GelRed™, diluído a 1:1000 (1 µl de GelRed™ para 1000 µl de água miliQ), numa proporção de 1 µl de GelRed™, 2 µl de corante (azul de bromotimol) e 5 µl de amostra no poço do gel; e brometo de etídio, 2 µl de EtBr misturado ao gel, 2 µl de corante (azul de bromotimol) e 5 µl de amostra no poço do gel, em géis de agarose 0.8% (0,8g de agarose para 100 ml de TBE 0,5X – Tris-Borato 0,045 mM, EDTA 1 mM pH 8,0). Os acessos foram expostos à corrida em eletroforese, a 120 V.

As bandas resultantes das corridas foram observadas em um transluminador UV LTB – 20X20ST. O registro dos resultados foi realizado utilizando sistema de foto-documentação. As foto-documentações dos géis corados com EtBr e GelRed™ foram realizadas, respectivamente, no Laboratório Células e Moléculas da UFPI, pelo sistema de captura de imagem L-PIX – HE da Loccus do Brasil, e no Laboratório de Biologia Molecular da EMBRAPA.

Posteriormente à extração, visualização e registro do DNA genômico foi realizada a análise espectrofotométrica.

2.2. Análise Espectrofotométrica

A análise espectrofotométrica foi realizada na EMBRAPA, Teresina, PI. Foram analisados os 18 acessos de pinhão manso no equipamento NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), que quantifica ácidos nucleicos quantitativamente e qualitativamente, sem distinção de DNA e RNA, assim como proteínas, polissacarídeos, medindo assim a pureza do material.

Para a determinação da concentração de DNA foi utilizada a leitura em espectrofotômetro, medindo-se a absorbância em comprimento de onda de 260 nm (A₂₆₀)

Para se obter a concentração de DNA de cada amostra foi feita a leitura na absorbância com comprimento de onda de 260 nm, que mede a quantidade de ácidos nucleicos presente na amostra, em seguida a leitura foi feita na absorbância de 280 nm, que mede a quantidade de polissacarídeos na amostra. A razão entre as leituras A₂₆₀ e A₂₈₀ em um DNA puro deve estar entre 1,8 e 2,0. Razão menor significa contaminação com proteínas, razão maior indica contaminação com fenol.

A quantidade e qualidade de DNA extraído dos 18 acessos de pinhão manso foi verificada por meio de espectrofotometria e por migração de 5 µl das amostras em gel de agarose 0,8% corados com 2µl

de EtBr e 1µl de GelRed™, realizado, respectivamente, no Laboratório Células e Moléculas da UFPI, e no Laboratório de Biologia Molecular da EMBRAPA.

3. Resultados e Discussão

O detergente CTAB 2x utilizado durante a coleta dos acessos permitiu a conservação do material fresco por todo o período de testes, na forma de gel, sendo os ácidos nucleicos suficientemente preservados de degradação, como indicado no resultado do gel de agarose nas Figuras 1 e 2, e na análise espectrofotométrica na Tabela 1, assim como na sua utilização durante a maceração do material. Uma vantagem é o melhor manuseio assim como uma mais fácil estocagem desse detergente se comparado, por exemplo, com o nitrogênio líquido, que exige uma câmara própria para seu armazenamento.

As amostras dos 18 acessos de pinhão manso foram avaliadas quanto à concentração de DNA obtida no processo de extração pela leitura em gel de agarose e posterior comparação com a leitura espectrofotométrica.

A análise da integridade e qualidade dos DNAs extraídos, verificada pela eletroforese em gel de agarose 0,8%, corados com GelRed™ e EtBr, está apresentada, respectivamente, nas Figura 1 e Figura 2.

Conforme podemos constatar pela análise da Figura 1, existe nas amostras uma contaminação por polissacarídeos, que, de acordo com Romano e Brasileiro (1999), pode ser observada pela retenção de DNA no poço do gel.

Vários autores como, Kidwell e Osborn; Mercado *et al.* *apud* Barbosa (2009); Romano e Brasileiro (1999), descrevem problemas no isolamento e purificação de DNA vegetal de boa qualidade, sendo estes resultantes principalmente do co-isolamento de polissacarídeos, compostos fenólicos e compostos secundários. Os polissacarídeos são difíceis de serem retirados durante a extração de DNA genômico. O detergente CTAB é utilizado para esse fim, já que polissacarídeos e ácidos nucleicos possuem solubilidade diferenciada na presença desse detergente. O uso de gradiente de cloreto de cério (CsCl) durante a extração do material genômico vegetal também configura-se como uma alternativa para a remoção dos polissacarídeos (ROMANO e BRASILEIRO, 1999).

Observa-se no gel de agarose corado com GelRed™ (Figura 1) a formação de rastro de DNA degradado, que, segundo Romano e Brasileiro (1999), pode ser efeito de degradação por DNases ou pela quebra mecânica durante a extração com clorofórmio. Além da formação de bandas de RNA, efeito da falta do uso de RNases durante a extração do DNA dos acessos.

Os resultados obtidos com a leitura do gel corado com o EtBr (Figura 2), reafirmam os resultados da extração do DNA genômico de folhas jovens de pinhão manso, uma vez que podem ser observados no gel a retenção de DNA no poço, indicando a presença de polissacarídeos nas amostras, e a formação de rastro de DNA degradado, formado pela ação de DNases ou pela quebra mecânica durante a extração. Porém o gel corado com GelRed™ se mostrou mais eficiente em permitir a visualização destas contaminações, além do fato de o gel corado com EtBr não evidenciar a contaminação das amostras por RNA. Este resultado sugere uma maior eficiência no uso de GelRed™ em comparação com o EtBr, uma vez que o padrão das bandas foi equivalente e a análise feita pelo gel corado com GelRed™ mostrou ser mais completa na obtenção de informações sobre a qualidade do DNA extraído.

Obteve-se a leitura realizada em gel de agarose a partir da observação de fragmentos de DNA pela comparação com marcadores de peso molecular. Estes permitem inferir uma estimativa visual do tamanho dos fragmentos presentes nas amostras analisadas. O tamanho e intensidade dos fragmentos produzidos pelas amostras de DNA extraídas dos acessos de pinhão manso foram comparados com o fragmento produzido pelo marcador de peso molecular e pelo ladder 100 pb (Ludwing Biotec), indicando uma menor quantidade de ácidos nucleicos em comparação ao ladder.

A concentração de DNA de cada amostra foi feita a partir da leitura na absorvância com comprimento de onda de 260 nm, em seguida a leitura foi feita na absorvância de 280 nm, onde, segundo Beltrão *et al.* (2007), medem, respectivamente, a quantidade de ácidos nucleicos e a quantidade de polissacarídeos presentes nas amostras. A relação existente entre a leitura a 260 nm e 280 nm (A260/A280), permite estimar a pureza da amostra de DNA (PIRES, 2008).

A concentração média de DNA extraído das folhas dos acessos de pinhão manso pelo protocolo adaptado de Doyle e Doyle (1987) está apresentada na Tabela 1, assim como as leituras na

absorbância com comprimento de onda de 260 nm e 280 nm, e as relações entre elas, A260/A280.

O valor médio para a razão entre os picos de absorbância na análise espectrofotométrica a 260 nm e a 280 nm encontrados para as soluções de ácidos nucleicos extraídas de folhas jovens das plantas de pinhão-mando foi de 2,0085, aproximadamente, 2,01. O que configura, de acordo com os valores descritos por Sambrook *et al.* (1989); Conde (2008), amostras de DNA de boa qualidade, com elevado grau de pureza, chegando bem próximo dos valores ideais para as razões de absorbância A260/A280, que é de 1,8 e 2, apresentando apenas uma pequena quantidade de contaminações.

Valores menores ou maiores podem indicar contaminações nas amostras testadas. Quanto a essas contaminações existem divergências, pois alguns autores afirmam que valores menores que essa razão indicam contaminação por proteínas e fenóis (SAMBROOK *et al.* 1989; RAMOS, 2009), outros afirmam que valores menores indicam contaminação apenas por proteínas e valores maiores indicam contaminação por fenóis (BELTRÃO *et al.* 2006; CHIARI *et al.* 2009).

O β -mercaptoetanol utilizado durante a extração do DNA genômico do pinhão manso configura uma solução para evitar a ação dos fenóis, segundo Romano e Brasileiro (1999), o que sugere que as amostras extraídas estejam livres desses contaminantes. Segundo os autores o clorofórmio desnatura as proteínas tornando-as insolúveis à fase aquosa, onde se encontram os ácidos nucleicos.

Fato é que, as razões de A260/A280 com valores entre 1,8 e 2, indicam um DNA puro, com ausência de compostos fenólicos, contaminação por proteínas e carboidratos.

Os dados obtidos com a quantificação de ácidos nucleicos (Tabela 1) indicam um grau de pureza elevado, apresentando uma pequena quantidade de contaminação por polissacarídeos, como observado na leitura dos géis de agarose (Figuras 1 e 2). Com exceção do acesso 3, fora da razão de pureza ideal, apresentando contaminação do DNA genômico.

Pode-se observar uma grande variação nos resultados da leitura do gel em relação à análise espectrofotométrica, que indicou uma grande quantidade de ácidos nucleicos nos acessos, enquanto que a leitura do gel sugere um valor bem menor. Como os acessos 9, 11 e 18 que apresentaram as maiores concentrações de ácidos nucleicos, ou o acesso 15 que apresentou o maior grau de pureza na análise espectrofotométrica, diferindo dos resultados obtidos com as leituras em géis de agarose. Essa diferença encontrada na quantidade de ácidos nucleicos da leitura em gel e da análise espectrofotométrica pode ser explicada pela presença de contaminação das amostras por RNA, consequência da não utilização de RNAses durante o processo de extração do DNA genômico dos acessos. Fato esse que pode ser comprovado por não haver, na espectrofotometria, distinção entre DNA e RNA durante a quantificação dos acessos.

Segundo GASPARETTO e BARBOSA-TESSMANN (1995), as principais vantagens do método espectrofotométrico é o fato de permitir mensurações quantitativas, comparações diretas e a eliminação da subjetividade. Os espectrofotômetros são significativamente mais acessíveis, em termos de custo, quando comparado a outros equipamentos utilizados em técnicas analíticas, permitindo aos laboratórios de pequeno e médio porte, então, dispor desses equipamentos, cuja utilização é relativamente simples. As análises espectrofotométricas são seguras, fáceis de serem executadas, rápidas e de baixo custo.

Ambos os métodos podem apresentar desvantagens que podem interferir na análise dos resultados obtidos. A análise realizada em gel de agarose pode ser menos precisa que a com o espectrofotômetro, pois depende da observação de fragmentos e comparação com marcadores de peso molecular conhecido, fato que, pode ocasionar desigualdade nos resultados das concentrações em relação às medidas no espectrofotômetro.

Já a espectrofotometria, realiza a quantificação de ácidos nucleicos sem haver distinção entre DNA e RNA durante a análise dos acessos. Fato esse que pode explicar a diferença observada quando comparado os resultados obtidos no presente trabalho com a quantificação espectrofotométrica e a leitura do gel de agarose.

4. Conclusão

O gel de CTAB 2x mostrou ser eficiente para os fins determinados, conservação do material durante e pós-coleta.

As modificações feitas ao protocolo de Doyle e Doyle (1987) tornaram possível a extração de um DNA genômico de boa qualidade, obtido de forma eficiente, simples e objetiva, permitindo o seu uso em posteriores análises e ampliações. Para obtenção de melhores resultados sugere-se ainda o

uso de RNase e Proteinase K durante o processo de extração do DNA genômico visando-se a obtenção de um DNA de melhor qualidade e com maior grau de pureza. Estas substâncias necessitam de altas temperaturas para ativá-las, podendo ser inseridas no início do processo de extração, indo para o banho-maria juntamente com o material macerado e só posteriormente acrescentando o CTAB 2X e o β -mercaptoetanol.

O corante de ácidos nucleicos GelRed™ mostrou ser um excelente substituto para o brometo de etídio, uma vez que obteve-se ótimos resultados na coloração de géis corados com o mesmo, apresentando ainda as vantagens de não ser mutagênico, e ser manuseado e descartado com menos riscos.

A partir dos resultados obtidos com os testes de concentrações do gel de agarose, assim como de diluições do GelRed™, não se prendendo as recomendações do fabricante, sugere-se a utilização de outras concentrações de GelRed™, tendo em vista a obtenção de um melhor padrão de bandas na análise a ser realizada.

A quantificação por espectrofotometria indicou bons resultados na extração do DNA de folhas jovens de pinhão manso, indicando valores bem próximos dos ideais, com apenas uma pequena quantidade de contaminação, que de acordo com a leitura em gel de agarose, deve-se a presença de polissacarídeos. Durante a extração do DNA genômico foi feito uso do detergente CTAB com a finalidade de romper as paredes celulares, assim como separar o DNA dos polissacarídeos. Sugere-se como uma alternativa para obter melhores resultados o uso de gradiente de cloreto de cério (CsCl) utilizado também para esse fim.

Referências Bibliográficas

- Barbosa, I.M.P. **Supressão do gene tropinona redutase ii e desenvolvimento de método para avaliar calisteginas em plantas de batata silvestre (*solanum commersonii* subsp. *Malmeanum bitt.*)**. Tese de doutorado – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas - Pelotas, 123 p. 2009.
- Beltrão, F.A.S.; Silva, D.S.; Lamoca-Zarate, R.M.; Felix, L.P.; Beltrão, A.E.S. **Avaliação da diversidade genética através de RAPD de acessos de maniçoba (*manihot pseudoglaziovii* pax & hoffm) e de duas espécies afins de interesse forrageiro**. Revista caatinga — ISSN 0100-316x. Universidade federal rural do semi-árido (ufersa). Pró-reitoria de pesquisa e pós-graduação. Caatinga (Mossoró, Brasil), v.20, n.2, p.118-126, abril/junho 2007.
- Beltrão, N. E. M.. **Considerações gerais sobre o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) e a necessidade urgente de pesquisas, desenvolvimento e inovações tecnológicas para esta planta nas condições brasileiras**. Campina grande: Embrapa-CNPQ, documentos. 2006.
- Beltrão, N. E. M.; Severino I. S.; Veloso, J. F.; Junqueira, N.; Fidelis, M.; Gonçalves, N. P.; Saturnino, H. M.; Roscoe, R.; Gazzoni, D.; Duarte, J. De O.; Drumond, M. A.; Anjos, J. B. **Alerta sobre o plantio de pinhão manso no Brasil**. Campina grande: Embrapa algodão, documentos, 155. 15 p. 2006.
- Bered, f. **Extração de dna – considerações e prática**. In: milach, s. (ed.) Marcadores moleculares em plantas. Porto alegre, 1998, 141 p.
- Biotium, Inc. Gelredtm. **Simply the best nucleic acid gel stain**. Disponível em: www.uniscience.com.br/corantes-de-acidos-nucleicos-e-produtos-para-genomica/gelred-concentrado. Acesso em: 24.05.2011.
- Carvalho, C.R. *et al.* **Genome size, base composition and karyotype of *jatropha curcas* L. An importat biofuel plant**. Plant science, limerick, v. 174, p. 613-617. 2008.
- Carvalho, D.S. **Comportamento genético de progênes de meio-irmãos de pinhão manso no recôncavo baiano, brasil**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, área de concentração: Fitotecnia. p. 51. 2010.
- Chiari, I.; Valle, J.V.R.; Resende, R.M.S. **Comparação de três métodos de extração de dna genômico para análises moleculares em *stylosanthes guianensis***. Circular técnica 36. Campo Grande, MG. 6 p. 2009.
- Conde, S.J. **Inter-relação da modulação gênica entre triiodotironina (t3) e estradiol (e2) em cultura primária de adenocarcinoma de mama**. Tese de doutorado em fisiopatologia em clínica médica. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu. 89 p. 2008.

Dange, V.; Suthar, D.; Reddy, P.S. **Biodiesel through *Jatropha curcas*: a critical analysis**. Focus os *Jatropha*, Índia, v. 9, n. 10, p. 31-36, June 2006.

Dantas, A.C.M. **Extração e análise de DNA vegetal**. Disponível em: <http://www.lfdgv.ufsc.br/pratica%20dna.pdf>. Acesso em: 17.05.2011.

Dantas, B.F. *et al.* **Maturação de frutos e sementes de pinhão-mansão**. In: I Congresso Brasileiro de Pesquisas de Pinhão-Mansão, 172. 2009. Brasília, DF, **anais ...** Brasília, DF: ABPPM, 2009.

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

Gasparetto, A.; Barbosa-Tessmann, I.P. **Utilização de espectrofotometria para avaliação da alteração de cor em resina composta**. *Rev. Odontol. Unesp, São Paulo*, 24(2) 241-251, 1995.

Gusmão, C.A.G. **Desempenho do pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) de segundo ano submetido a diferentes doses e relações NPK**. Dissertação (mestrado) – Programa de pós-graduação em Produção vegetal no semiárido, universidade estadual de montes claros – unimontes, jacaúna, mg, brasil. 81 p. 2010.

Heller, J. **Physic nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1**. Institute of plant genetics and crop plant research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome. 1996. 66p.

Oliveira, V.D. **Variabilidade genética de pinhão manso cultivado em dois agroecossistemas de sergipe**. Dissertação (mestrado em agroecossistemas) – Programa de pós-graduação em Agroecossistemas, Pró-reitoria de Pós- graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, v, 33 f. : il. 45p. 2010.

Pires, V.M.R. **Estrutura e função de módulos não catalíticos envolvidos na degradação da parede celular vegetal: o efeito de enzimas exógenas na valorização nutritiva de dietas à base de *lupinus albus* para leitões**. Tese de doutoramento em Ciências Veterinárias especialidade em ciência e tecnologia animal. Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa. 360 p. 2008.

Ramos, E.A.S. **Hipermetilação de ilhas de cpg dos genes *cxcl12* e *esr1*: correlação com os dados clínico-patológicos em câncer de mama**. Dissertação de mestrado. Área de concentração em patologia do Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR. 130 p. 2009.

Romano, &. Brasileiro, A.C.M. **Extração de DNA de plantas: soluções para problemas comumente encontrados**. Biotecnologia ciência e desenvolvimento, Brasília, n. 9, p. 40-43, 1999.

Sambrook, K.J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Second Edition. Ed. Cold spring harbor laboratory press, New York. 1989.

Sharma, N. **The *Jatropha* experience: Andhra Pradesh**. Focus os *Jatropha*, India, v. 9, n. 10, p. 9-15, June 2006.

Teixeira, K.R.S.; Pires, W.O.; Baldani, J.I. **Descontaminação de substâncias tóxicas: fenol e brometo de etídio**. Embrapa. Comunicado técnico. Nº 25, p. 1-3. Dez./1998.

Vidal, M.S.; Coutinho, T.C.; Hoffman, I.V. **Comparação entre protocolos de extração de dna de algodão para emprego em ensaios com marcadores moleculares**. Ministério da agricultura, Pecuária e Desenvolvimento. Circular técnica 74. Campina grande, PB. 5 p. 2003.

Xavier, G. R.; Silva, F. V.; Zilli, J. E.; Rumjanek, N. G. **Adaptação de método para extração de DNna de microrganismos associados a raízes de plantas**. Embrapa agrobiologia. Documentos 171. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 24 p. 2004.

1. Universidade Federal do Piauí (UFPI) waldenrike@hotmail.com

2. Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária (EMBRAPA CPAMN) sarmanho@cpamn.embrapa.br

3. Universidade Federal do Piauí (UFPI) martins.c@ufpi.edu.br

4. Universidade Federal do Piauí (UFPI) francilene@ufpi.edu.br