

PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *Podocnemis expansa* E TESTES COM OS MARCADORES RAPD E ISSR

ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOL DE EXTRACCIÓN DE ADN GENOMICO DE *Podocnemis expansa* E TESTES CON LOS MARCADORES RAPD E ISSR

STANDARDIZATION OF PROTOCOL FOR DNA EXTRACTION OF *Podocnemis expansa* AND TESTS WITH RAPD AND ISSR MARKERS

OLIVEIRA, DEYLA PAULA ^{1*} Mestre, DIAS-OLIVEIRA, JAQUELINE DAS DORES¹ Doutora, MALVASIO, ADRIANA¹ Doutora, OLIVEIRA-JUNIOR, WALDESSE PIRAGÉ ^{1*} Doutor.

¹ Fundação Universidade Federal do Tocantins, Avenida NS 15. ALCNO 14, Campus Universitário de Palmas, Tocantins, 77.020 – 210.

* Correspondência: deylaoliver@gmail.com, waldessejunior@uft.edu.br

Recibido: 20-03-2012; Aceptado: 22-08-2012.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo comparar e padronizar um protocolo eficiente para a extração de DNA de tecido de *Podocnemis expansa* e testar o poder informativo dos marcadores moleculares RAPD e ISSR para a análise da estrutura genética da espécie coletadas no entorno do Parque Nacional do Araguaia, Tocantins, Brasil. O método de extração foi padronizado a partir do teste com três diferentes protocolos e permitiu a obtenção de DNA com boa qualidade e em quantidade adequada para as reações de RAPD e ISSR. A razão A_{260}/A_{280} das amostras apresentou um valor entre 1.8 a 2.3 indicando que estas apresentaram baixa contaminação por proteínas e que os DNAs poderiam ser utilizados para testar o poder informativo dos marcadores RAPD e ISSR. Os dois marcadores demonstraram ser uma ferramenta eficiente para estudos genéticos de *P. expansa*.

Palavras chave: extração de DNA, *Podocnemis expansa*, marcadores moleculares.

Resumen

Este trabajo tuvo como objetivo comparar y estandarizar un protocolo eficiente para la extracción de ADN de fragmentos de tejido de *Podocnemis expansa* y evaluar el poder informativo de los marcadores moleculares RAPD e ISSR para el análisis de la estructura genética de la especie colectada en el entorno del

Parque Nacional do Araguaia, Tocantins, Brasil. El método de extracción fue estandarizado a partir de la evaluación de tres diferentes protocolos permitiendo la obtención de ADN de buena calidad y en cantidad adecuada para las reacciones de RAPD e ISSR. La razón A_{260}/A_{280} de las muestras presentó un valor entre 1.8 a 2.3, indicando que estas presentan baja contaminación por proteínas y que los ADNs podrían ser utilizados para evaluar el poder informativo de los marcadores RAPD e ISSR. Los dos marcadores demostraron ser una herramienta eficiente para estudios genéticos de *P. expansa*.

Palabras clave: extracción de ADN, *Podocnemis expansa*, marcadores moleculares.

Abstract

This study aims to compare and standardize an effective protocol for DNA extraction from tissue of *Podocnemis expansa* and test the informative power of RAPD and ISSR markers to analyze the genetic structure of species collected in the vicinity the National Park Araguaia, Tocantins, Brazil. The extraction method was standardized by the test with three different protocols and allowed the acquisition of DNA with good quality and in adequate quantities for there actions of RAPD and ISSR. The A_{260}/AA_{280} ratio of the samples showed a value between 1.8 to 2.3 indicating that they had low contamination by proteins and the DNA could be used to test the in formative power of the RAPD and ISSR markers. The two markers proved to be an efficient tool for genetic studies of *P.expansa*.

Keywords: DNA extraction, *Podocnemis expansa*, molecular markers.

Introdução

Podocnemis expansa (Schweigger, 1812) é uma das espécies mais conhecidas de quelônios de água doce do Brasil, sendo considerada a maior tartaruga da América do Sul (LUZ, 2005). Sua distribuição está associada ao sistema hidrográfico da bacia Amazônica e do Orinoco, ocorrendo em rios da Colômbia, Venezuela, Guiana, Equador, Peru, Bolívia e Norte do Brasil, chegando a atingir a região central do território brasileiro (Goiás e Mato Grosso) (LUZ, 2005). No Estado do Tocantins, um dos pontos de ocorrência da espécie situa-se em uma região com relevante importância ecológica, onde ocorre uma transição de biomas, conhecido como região ecotonal, a Ilha do Bananal (GALVÃO, 2007).

P. expansa é um recurso alimentar disponível e de grande importância para as populações humanas em toda a sua área de ocorrência (SALERA JR. *et al.*,

2006). O interesse pela espécie vão desde o consumo direto de suas carnes, ovos, óleo ou manteiga da gordura dos ovos, produção de medicamentos e cosméticos e até a utilização dos cascos para utensílios domésticos, artesanatos e também como brinquedo de criança, além da importância simbólica para muitas comunidades (PRITCHARD e TREBBAU 1984; ESCALONA e FA, 1998; PEZZUTTI, 2003; SALERA JR. *et al.*, 2006).

Em virtude da intensa predação que a espécie vem sofrendo desde os tempos coloniais, o Governo Brasileiro, estabeleceu em 1979 um Projeto de Proteção e Manejo dos Quelônios da Amazônia, coordenado pelo Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal-IBDF (IBAMA, 1989). A partir de 2007, o projeto passou a ser coordenado pelo IBAMA abrangendo o Programa Nacional de Conservação dos Quelônios Continentais, envolvendo manejo conservacionista e pesquisas, priorizando as Unidades de Conservação e o RAN foi para o Instituto Chico Mendes para Conservação da Biodiversidade (RAN/ICMBio).

Em 1998, a Fundação Universidade Federal do Tocantins (UFT), contando com o apoio do RAN/IBAMA, iniciou trabalhos com a espécie *P. expansa* na Ilha do Bananal, entorno do Parque Nacional do Araguaia (PNA) (MALVASIO e SALERA-JÚNIOR, 2004). As pesquisas realizadas nessa localidade demonstraram que a interdisciplinaridade é fundamental para promover o melhor conhecimento de vários aspectos da biologia de *P. expansa*, o que auxilia na elaboração de uma política adequada para a conservação e manejo da espécie. O conhecimento da estrutura genética das populações de *P. expansa* do PNA é uma necessidade inerente, visto que o entendimento dos níveis de diferenciação populacional pode ajudar com informações genéticas que poderão ser utilizadas na escolha de medidas mais acuradas de manejo e conservação para a espécie na localidade.

Com o advento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), diversos marcadores moleculares tornaram-se disponíveis para a caracterização da estrutura genética de vários táxons (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998). O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia da utilização de *primers* mais curtos (dez pares de base) e de seqüência arbitrária, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio da região a ser amplificada (WILLIAMS *et al.*, 1990). A técnica foi descrita independentemente por dois grupos (WELSHE e MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS *et al.* 1990). WILLIAMS *et al.* (1990) patentearam a metodologia com o nome mais comumente utilizado *Random Amplified Polymorphic* (RAPD). Essa técnica possui grande potencial para detectar polimorfismo genético de espécies desconhecidas geneticamente, permitindo a obtenção de resultados de forma rápida (LACERDA *et al.*, 2002). Além disso, apresenta baixo custo, tornando-se uma ferramenta acessível a muitos laboratórios (LACERDA *et al.*, 2002).

Mais recentemente vem sendo utilizado a técnica denominada *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994; GUPTA *et al.*, 1994). Nesta técnica os SSRs, são utilizados como *primers* para amplificar principalmente regiões entre SSRs (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994, REDDY *et al.*, 2002), podendo ser ou não ancorados nas posições terminais 3' ou 5' de um a quatro bases degeneradas dentro das seqüências flanqueadoras (GUPTA *et al.*, 1994). As repetições de microssatélite utilizado como *primers* podem ser di-nucleotídeos, tri-nucleotídeos, tetra-nucleotídeos ou penta-nucleotídeos (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994). O ISSR é um método simples, rápido, reproduzível e que supera muito das limitações técnicas descritas para alguns marcadores, como o próprio RAPD (TSMURA *et al.*, 1996).

No entanto, um DNA puro e de boa qualidade é pré-requisito para qualquer análise molecular (ARAS *et al.*, 2003). Porém, os protocolos convencionais de extração de DNA não são necessariamente reproduzíveis para todas as espécies, sendo necessário realizar algumas adaptações e padronizações (ARAS *et al.*, 2003). Além disso, o protocolo ideal deve ser aquele que possibilite rapidez, eficiência, baixo custo e que preferencialmente não necessite a utilização de produtos tóxicos, como fenol.

O presente estudo propôs (1) comparar e padronizar um protocolo para a extração de DNA a partir de fragmentos de tecido de *P. expansa*, (2) testar e comparar a capacidade informacional dos marcadores RAPD e ISSR para a análise da diversidade genética em uma população natural de *P. expansa* do entorno do Parque Nacional do Araguaia, Tocantins, Brasil.

Material e métodos

Área de estudo e coleta dos tecidos

Foram capturados 30 indivíduos de *P. expansa* de acordo com PORTELINHA (2007), IBAMA (1989) e PEZZUTI (2003), provenientes do rio Javaés, entorno do Parque Nacional do Araguaia, Ilha do Bananal - TO, durante o ano de 2006. A área situa-se entre os paralelos 9°50' S e 11°10' S e os meridianos 49°56' W e 50°30' W. e apresenta um regime climático tropical úmido de transição (Aw) com duas estações bem definidas: o verão (novembro a abril) meses em que predominam as chuvas, e o inverno (maio a outubro) onde marca-se o período da seca. O total pluviométrico anual fica em torno de 1.750 mm, e a temperatura média anual gira em torno de 24°C (SALERA JUNIOR *et al.*, 2009).

Dos animais capturados, foram retirados pequenos fragmentos de tecido das patas posteriores. Cada tecido coletado foi acondicionado em microtubos

contendo álcool 95%, para posterior extração dos DNAs e teste dos marcadores em laboratório.

Extração do DNA genômico

Foram comparados 3 protocolos para a extração do DNA de tecidos de *P. expansa*. O protocolo em teste (I) utilizou o tampão de lise nuclear (TLN) em sua metodologia e os outros dois (II e III) são protocolos tradicionais descritos por PECCININI-SEALE (2002) e SAMBROOK *et al.* (1989), respectivamente. Nesta etapa foram utilizadas apenas duas amostras de tecido de *P. expansa*, porém procurou-se padronizar a quantidade de tecido que seria utilizado para as extrações (aproximadamente 200 mg de tecido). Após essa etapa, foi escolhido para a extração das demais amostras de tecido da espécie (n=30) o protocolo que permitiu a obtenção de uma maior quantidade de DNA.

O protocolo I consiste da digestão do tecido com 800 µL de tampão de lise nuclear TLN (NaCl 400mM; EDTA 25mM; Tris-HCl 50mM, pH8,0), 50 µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 10% e 20 µL de proteinase K (10 mg/mL) que foram mantidos a 55°C por aproximadamente 12 horas. Após essa etapa, foram adicionados 300 µL de NaCl 7 M saturado ao material que foi homogeneizado e deixado por 15 minutos em gelo. A separação das fases foi feita após centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. Em seguida, aproximadamente 600 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo estéril e precipitados com 1000 µL de etanol absoluto. A solução foi estocada em freezer por no mínimo 3 horas, centrifugado a 10.000 g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70%, centrifugado a 10.000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi seco à temperatura ambiente. Aos tubos contendo DNA, adicionou-se 30 µL de tampão TE (10 mM de Tris - HCl pH 8,0; 1 mM de EDTA) acrescido de RNase (10 mg/mL), que foram mantidos à 37 °C por 1 hora e, então, armazenados à -20 °C.

Verificação da extração do DNA genômico

Os DNAs extraídos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta para verificar a integridade e qualidade dos DNAs.

Os DNA foram quantificados por absorvância (ABS) a 260nm em espectrofotômetro Amersham Biosciences Ultrospec 1100 pro. Em seguida, suas concentrações foram calculadas pela fórmula:

$$[\text{DNA}] = 50 \mu\text{g/mL} \times D \times A_{260}$$

Onde [DNA] é a concentração do DNA (ng/mL), D é o fator de diluição usado para fazer a leitura espectrofotométrica e A260 é a leitura obtida no comprimento de onda de 260 nm (ROMANO e BRASILEIRO, 2000).

A relação de absorbância A260/A280 foi determinada para verificar a qualidade do DNA e possível contaminação com proteínas.

Reações de PCR com os marcadores RAPD e ISSR

Foram utilizados 4 *primers* RAPD e 3 *primers* ISSR (Tabela 1) para verificar a possibilidade da amplificação via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (INNIS *et al.*, 1990) com os DNAs extraídos pelo protocolo padronizado. Os *primers* aqui descritos foram selecionados a partir de testes realizados anteriormente (dados não mostrados), no qual se testaram 33 *primers* RAPD (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) e 34 *primers* ISSR.

Tabela 1. Relação dos *primers* RAPD e ISSR selecionados para a amplificação e suas respectivas seqüências nucleotídicas

Marcador	Primer	Seqüência (5 → 3)
RAPD	OPM 20	AGG TCT TGG G
RAPD	OPM 10	TCT GGC GCA C
RAPD	OPT 16	GGT GAA CGC T
RAPD	OPT 20	GAC CAA TGC T
ISSR	SPAR 01	ACT GAC TGA CTG ACT G
ISSR	(GACA) 4	GACA GACA GACA GACA
ISSR	(AACC) 4	AACC AACC AACC AACC

As reações de amplificação das 30 amostras de DNA de *P. expansa* foram realizadas em um termociclador PxE 0.2 (*Thermo Electron Corporation, Inc*). As reações continham 1X de tampão da Taq DNA polimerase (Tris-HCl 100 mM, pH 8,5, KCl 500 mM) (LGC do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil), 2,5 mM de MgCl₂ (LGC do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil), 0,25 mM de dNTPs (LGC do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil), 0,2 µM de *primers*, 1,5 U de enzima Taq DNA polimerase (UFAM-AM), DNA (50 a 100 ng) e água-ultrapura.

O ciclo de amplificação de RAPD foi composto por uma etapa de desnaturação inicial de 40 s a 94 °C, seguido de 3 ciclos de 94 °C por 40 s, 35 °C por 1 min e 72 °C por 2 min e por 37 ciclos de 94 °C por 40 s, 37 °C por 1 min 37 °C por 1 min, 72 °C a 2 min e uma extensão final de 72 °C por 5 min e incubação a 4 °C por 10 min.

As reações de ISSR foram submetidas a um ciclo inicial de 94 °C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de 92 °C por 1 min, 35 °C por 1 min e 72 °C por 2 min e uma extensão final de 72 °C por 5 min e incubação a 4 °C por 10 min.

Os produtos resultantes das ampliações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% para RAPD e 1,5% para ISSR. Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografadas com câmera digital para posterior interpretação das bandas amplificadas.

Análises das bandas amplificadas

As bandas resultantes das reações de RAPD e ISSR foram avaliadas quanto a sua ausência ou presença (0 ou 1) no gel de agarose 2% e 1,5%, respectivamente. Em seguida, foram construídas matrizes binárias para os dados gerados.

Resultados

Extração do DNA

O rendimento do DNA extraído com os três protocolos (I, II e III) variou de 90 a 400 ng (Tabela 2). O protocolo I foi o que apresentou o melhor rendimento (320 e 400 ng/mL) e por esse motivo foi o protocolo escolhido para a extração das demais amostras de tecido de *P. expansa* (Fig. 1).

A razão A_{260}/A_{280} obtidas variaram de 1.8 a 2.3 estando dentro da faixa recomendada (Tabela 2).

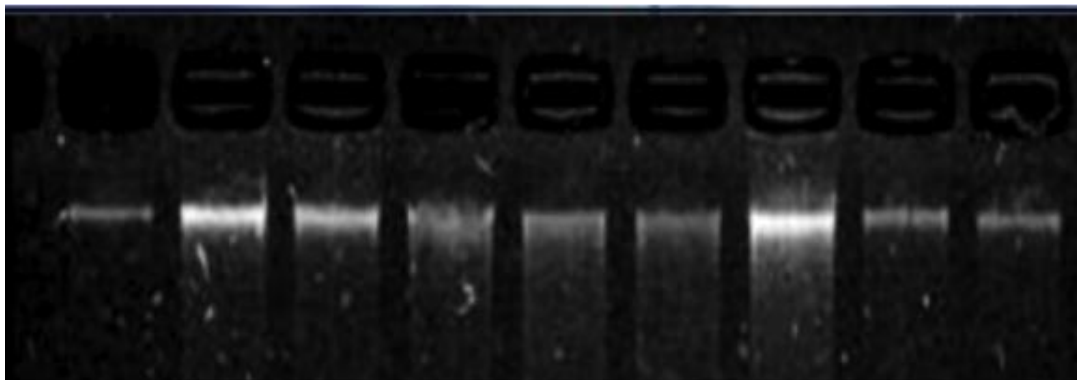


Figura 1. Perfil eletroforético do DNA de 9 indivíduos extraídos com o uso do protocolo

I

Tabela 2. Protocolos testados, concentração do DNA (ng/mL) e pureza do DNA (expresso pela razão A_{260nm}/A_{280nm}), extraído de dois tecidos de *P. expansa* com os três protocolos de extração de DNA

Amostras	Protocolos	Concentração (ng/mL)	Razão A_{260nm}/A_{280nm}
1	I *	320 ng/mL	1,8
2	I	400 ng/mL	1,8
1	II **	250 ng/mL	1,9
2	II	90 ng/mL	2.3
1	III ***	290 ng/mL	1,9
2	III	290 ng/mL	2,1

* Tampão TLN; ** PECCININI-SEALE (2002); *** SAMBROOK *et al.* (1989).

Amplificação por RAPD e ISSR

As amplificações com os 4 *primers* RAPD selecionados (OPM 20, OPM 10, OPT 16, OPT 20) geraram um total de 21 bandas, 10 das quais foram polimórficas (48%). O número médio de segmentos amplificados por *primer* foi de 5.3 (Fig. 2). Já nas análises realizadas com os 3 *primers* ISSR (SPAR 01, GACA₄, AACC₄), foram obtidos 16 bandas, 10 das quais foram polimórficas (62%), com média de 5.3 por *primer* (Fig. 3).

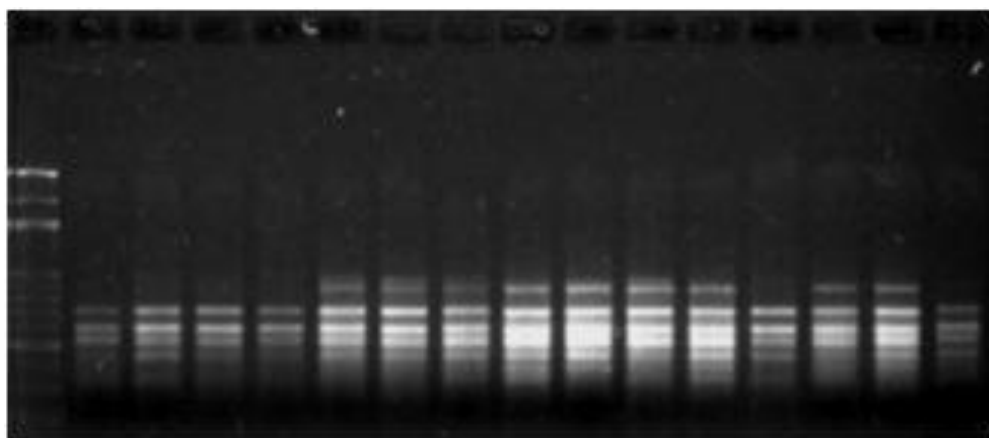


Figura 2. Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% demonstrando o padrão de amplificação de 13 animais, utilizando o *primer* RAPD (OPM10). A 1ª amostra da esquerda representa o padrão de massa molecular de 100pb.

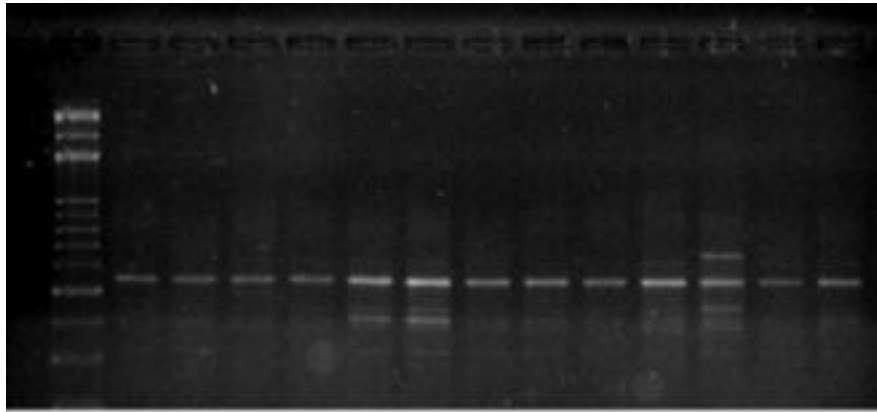


Figura 3. Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% demonstrando o padrão de amplificação de 15 animais, utilizando o primer ISSR (AACC)4. A 1ª amostra da esquerda representa o padrão de massa molecular de 100pb.

Discussão

Por meio dos três protocolos de extração de DNA, foram obtidos uma quantidade de DNA suficiente para a realização das reações de PCR utilizando marcadores dominantes como o RAPD e ISSR, que segundo FERREIRA E GRATAPAGLIA (1998) fica na faixa de 5 a 10 ng.µL⁻¹ por reação. Porém, considerando fatores como rendimento de DNA, custo, rapidez, praticidade, quantidade de DNA e sustentabilidade, o protocolo de extração de DNA mais qualificado para tecido de *P. expansa* foi o protocolo I. Justamente por não utilizar fenol, como os demais, e por apresentar precipitação salina combinada com etanol, este mostrou-se menos laborioso, mais barato e ecologicamente mais adequado por gerar menos resíduos tóxicos.

As razões de A_{260}/A_{280} , obtidas com o protocolo I, indicaram baixa concentração de proteínas, estando no intervalo entre 1.8 a 2.0, definido como satisfatório por SAMBROOK *et al.*, (1998). Sabe-se que a obtenção de DNAs com altas quantidades de proteínas tornam a amostra impura e não adequada para a realização da reação de PCR produzindo amplicons com intensidades fracas no gel, o que não foi observado no presente estudo.

O efeito da qualidade e quantidade do DNA na geração e reprodutibilidade de produtos amplificados de RAPD foram testados por WEEDEN *et al.* (1992). Os autores observaram que a qualidade do DNA tem um grande efeito na geração e resolução do produto amplificado.

A técnica de extração de DNA testada nesse trabalho (protocolo I) forneceu material com qualidade e quantidade suficientes para gerar produtos amplificados de RAPD e ISSR, certificando o método.

A partir dos produtos amplificados, pôde-se também constatar que os marcadores RAPD e ISSR apresentaram amplicons polimórficos, o que é uma capacidade informativa promissora para a geração de dados da estrutura genética de *P. expansa*. Vale notar que nos testes realizados o marcador ISSR mostrou-se mais polimórfico que o marcador RAPD, talvez indicando uma maior aplicabilidade nos estudos de divergência genética.

O uso desses marcadores resulta em diversas vantagens práticas como: simplicidade, rapidez, baixo custo e não requer instalações sofisticadas para a sua execução. Por isso, esses marcadores poderão ser utilizados em análises genéticas iniciais de espécies não caracterizadas geneticamente, como a população de *P. expansa* do entorno do Parque Nacional do Araguaia, Ilha do Bananal, Tocantins.

Agradecimentos

Permissão para a coleta das amostras de tecidos de *P. expansa* foi concedida pelo RAN/IBAMA. O Grupo Quelônios da Ilha do Bananal apoiou com a logística em campo. Este estudo fez parte da monografia de graduação de D.P.O em Ciências Biológicas, Fundação Universidade Federal do Tocantins. D.P.O. obteve a bolsa de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e A.M bolsa de produtividade do CNPq (processo n. 503650/2009/9).

Referências

ARAS, S.; DURAN A.; YENILMEZ, G. 2003. Isolation of DNA for RAPD analysis from dry leaf material of some *Hesperis* L. specimens. *Plant Molecular Biology Reporter* 21:461a-461.

ESCALONA, T.; FÁ, J.E. 1998. Survival of nests of the terecay turtle (*Podocnemis unifilis*) in the Nichare-Tawadu Rivers, Venezuela. *Journal of Zoology* 244:303-312.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3. ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasil.

GALVÃO, S.B. 2007. *Aspectos da biologia, criações comerciais e do consumo de quelônios no estado do Tocantins: alternativas de manejo e sustentabilidade*. 2007. Monografia Bacharel em Engenharia Ambiental. Universidade Federal do Tocantins, Brasil.

GUPTA, M.; CHYI, Y.S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J.L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primer of simple sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 89:998-1006.

INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. 1990. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, USA.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVAVEIS-IBAMA. 1989. *Projetos Quelônios da Amazônia: Manual Técnico-BAMA*. Brasília, Brasil.

LACERDA, D.R.; ACEDO, M.D.P.; LEMOS-FILHO, J.P.; LOVATO, M.B. 2002. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. *Lundiana* 3(2):87-92.

LUZ, V.L.F. 2005. *Criação comercial de tartaruga e tracajá: manual técnico*. SEBRAE. Cuiabá; Brasil

MALVASIO, A; SALERA-JUNIOR, G. 2004. *Entrevista com a equipe do Projeto Quelônios da Ilha do Bananal*. Terras indígenas e Unidades de Conservação da Natureza, Brasil.

PECCININI-SEALE, D. 2002. *Técnicas citogenéticas, enzimáticas e moleculares*. Em: *Técnicas de coleta e preparação de vertebrados*. São Paulo: Arujá Instituto Pau Brasil de História Natural, Brasil.

PEZZUTI, J.C.B. 2003. *Ecologia e Etnoecologia de Quelônios no Parque Nacional do Jaú, Amazonas, Brasil*. Tese, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.

PRITCHARD, P.C.H.; TREBBAU, P. 1984. *The Turtles of Venezuela*. S.1p. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. USA.

PORTELINHA, T.C.G. 2007. *Estudo das populações de Podocnemis expansa e Podocnemis unifilis no Rio Javaés, Tocantins*. Monografia Bacharel em Engenharia Ambiental. Universidade Federal do Tocantins, Brasil.

REDDY, M.P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128:9-17.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E.F.; MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

SALERA-JUNIOR, G.; MALVASIO, A.; PORTELINHA, T.C.G. 2009. Avaliação de padrão irregular dos escudos do casco em *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae). *Acta Amazonica* 39(2):429-436.

SALERA-JUNIOR, G.; MALVASIO, A.; GIRALDIN, O. 2006. Relações cordiais. *Ciência Hoje* 39(226):61-63.

TSUMURA, Y.; OHBA, K.; STRAUSS, S.H. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglasfir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor Appl Genet.* 92:40-45.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. 1999. Extração de DNA de plantas. *Biotecnologia* 2(9):40-43.

WEEDEN, N.F., TIMMERMAN., G.M.; HEMMAT, M.; KNEEN, B.E., LODHI, M. A. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers. Págs: 12-17. Em: *Applications of RAPD technology to plant breeding, Joint Plant Breeding. Symposia Series, Minneapolis, USA.*

WELSH, J.; McCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.

ZIETKIEWICZ., E.; RAFALSKI., A.; LABUDA., D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-Anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.