



# OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA *Viola officinalis* (Mart.) Warb. VISANDO ACESSAR A COMUNIDADE MICROBIANA.

Hellen Ribeiro Martins dos Santos- Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Biologia, Ilhéus, BA. [elemmartins\\_bio@yahoo.com.br](mailto:elemmartins_bio@yahoo.com.br).

Monita Fiori de Abreu-Tarazi - Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Biologia, Ilhéus, BA.

Leandro Lopes Loguercio - Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Biologia, Ilhéus, BA.

## INTRODUÇÃO

A espécie *Viola officinalis* (Mart.) Warb., uma planta conhecida popularmente como ‘bicuiba rosa’, pertence a família Myristicaceae. Ocorre mais precisamente em áreas abertas, como clareiras, capoeiras e áreas desmatadas, pois apresenta hábito característico de plantas heliófitas, ou seja, espécies intolerantes a sombra. Por serem consideradas secundárias iniciais, podem auxiliar em planos de reflorestamento e criação de corredores ecológicos. A espécie é importante fonte de recurso alimentar para tucano, ouriço-preto e o jupará (RICHTER et al, 1975).

Assim como outras plantas, a *V. officinalis* pode oferecer habitat bastante variado para colonização e crescimento microbiano em sua superfície e seu interior. Os micro-organismos desempenham papel reconhecido nos ecossistemas, sendo peças fundamentais, por exemplo, nos ciclos biogeoquímicos do nitrogênio, fósforo, oxigênio e carbono. Além disso, podem proporcionar benefícios científicos e econômicos (SMITH, 2008). O número sempre crescente de novas espécies de bactérias e fungos é muito vasto e os hotspots são reservatórios ricos e inexplorados desses seres vivos com grande potencial biotecnológico e ambiental. Para uma caracterização adequada dessas comunidades microbianas, hoje em dia baseadas em métodos moleculares de alto processamento e resolução descritiva, faz-se necessário um adequado procedimento de extração de DNA de alto rendimento e qualidade.

Vários métodos de extração de DNA, como os baseados no brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) e no dodecil sulfato de sódio (SDS), já são conhecidos e foram otimizados para diversas espécies vegetais. Entretanto, poucos são os protocolos otimizados para espécies florestais endêmicas da Mata Atlântica nordestina. Considerando as diferenças estruturais e de composição química dos diversos tecidos, cada espécie biológica a ser estudada requer adaptações técnicas que levem ao desenvolvimento de metodologias adequadas para a extração de DNA que possibilite sua obtenção em quantidades e qualidades satisfatórias.

## OBJETIVO

Otimizar um protocolo de extração de DNA vegetal para *Viola officinalis*, a fim de se obter DNA de boa

qualidade, possibilitando o acesso à comunidade microbiana associada à planta.

## **METODOLOGIA**

Local de estudo:

O estudo foi realizado na região de Una, Sul da Bahia, que possui uma paisagem variegada. A cobertura florestal presente nessa região é um mosaico de fragmentos de floresta nativa, incluindo as florestas de crescimento primário e secundário, e áreas de plantações de cacau sombreado, principalmente sob o sistema 'cabruca' (MAY; ROCHA 1996).

Procedimentos:

Foram coletadas folhas de 90 indivíduos localizados no interior dos fragmentos florestais da região de Una. As plantas utilizadas para coleta foram georreferenciadas, sendo suas folhas destacadas e levadas ao laboratório, onde foi realizada a extração de DNA genômico total, segundo protocolo modificado de Ferreira e Grattapaglia (1998). O protocolo de extração consistiu de uma maceração de ~150 mg de tecido foliar fresco em nitrogênio líquido, em microtubos de 1,5 mL; incubação por 30 min em banho-maria a 65°C com 700 µL de tampão de extração pré aquecido (Tris-HCl, 100 mM, pH 8,0; EDTA, 20 mM; NaCl, 1,4 M; CTAB, 2%; PVP, 1% e 2 µL/mL de β-mercaptoetanol). Após esse tempo os tubos foram retirados do banho-maria. Em uma capela de exaustão foram acrescentados 600 µL de solução de clorofórmio e álcool isoamílico (CIA), na proporção de 24 : 1, respectivamente. Os tubos foram agitados durante 5 min. A seguir, procedeu-se a centrifugação dos tubos à velocidade de 13.000 rpm, durante 5 min. Os tubos foram então retirados e, com o auxílio de uma pipeta, a fase superior (aquosa) foi retirada e transferida para um novo tubo. Nesse novo tubo foram adicionados 1/10 do volume de uma solução contendo CTAB (10%) e NaCl (1,4 M). O conteúdo dos tubos então foi homogeneizado por inversão. Em seguida, a extração com 600 µL de CIA foi repetida. Para precipitação do DNA, foram acrescentados 2/3 do volume de solução aquosa de isopropanol frio (-20°C). Os tubos foram centrifugados novamente a 7.000 rpm durante 5 min. Após o descarte do sobrenadante, o pélete foi lavado duas vezes em 1,0 mL de etanol a 70%, e uma vez em 1,0 mL de etanol absoluto durante 5 min. Posteriormente, os péletes foram secos, ressuspendidos com 30 µL tampão TE (Tris-HCl, 10 mM, pH 8,0; EDTA, 0,1 mM) e armazenados em freezer (-20°C). O produto das extrações foi visualizado em gel de agarose 0,8% em tampão TBE (Tris-Borato, 90 mM e EDTA, 2 mM). Durante o carregamento do gel foram utilizados 2 µL da solução de extração com DNA, 2 µL corante 'gel green' e 2 µL de tampão de carregamento (azul de bromofenol a 0,02 %), para um volume total de 6 µL / amostra. Após 50 min, os géis foram visualizados e fotografados e os produtos obtidos foram quantificados mediante comparação com quantidades conhecidas de DNA de fago λ (25, 50, 100 ng).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A partir da modificação feita no protocolo, foi possível observar que com a adição de uma nova etapa utilizando CTAB 10% + NaCl 1,4M, foi possível a obtenção de DNA com melhor qualidade e quantidade do que sem esta etapa, sendo obtidas concentrações de DNA com até 70 ng/µL em algumas amostras.

A presença de polissacarídeos, fenóis e compostos secundários em plantas como a *V. officinalis* representam o principal problema encontrado no processo de extração de DNA vegetal, pela potencial ação

que estes contaminantes apresentam, tanto nas etapas de extração em si, afetando o rendimento do DNA, quanto na inibição de enzimas e na interferência em diversos outros procedimentos moleculares posteriores. Por exemplo, folhas de diversas espécies vegetais possuem níveis variados de polissacarídeos que são inibidores da reação de PCR e os protocolos tradicionalmente utilizados para extração de DNA vegetal, embora removam as proteínas, nem sempre removem efetivamente esses polissacarídeos (Demeke & Adams, 1992). De modo geral, protocolos baseados na utilização de detergente CTAB, quando aplicados a tecidos maduros de plantas levam à obtenção de um produto final viscoso e problemático em reações de PCR. Por isso, entende-se que a simples inclusão de uma etapa adicional de CIA permitiu otimizar este protocolo de extração de DNA para *Virola officinalis*.

## CONCLUSÃO

Com a modificação realizada no protocolo de extração, foi possível obter melhores resultados que permitem a obtenção de maiores quantidades de DNA de boa qualidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DEMEK, T.; ADAMS, R.P. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotechnology*, 12(3), 1992, p. 333-334.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p

MAY, P.H.; ROCHA, R.B. O sistema agrossilvicultural do cacau-cabruca. In: I.V. Lopes, G.S.B. Filho e D. Biller (eds). *Gestão ambiental no Brasil: experiência e sucesso*. Fundação Getúlio Vargas Editora, Rio de Janeiro, 1996, p.35-61.

RICHTER, H.G.; NOCK, H.P.; REICHMANN NETO, F. Bicuiba (*Virola oleifera*). I - Aspectos dendrológicos da espécie e descrição macro e microscópica da madeira. *Floresta*, v.6, 1975, p.36-42.

SMITH, D.; RYAN, M.J.; STACKEBRANDT, E. The ex situ conservation of microorganisms: aiming at a certified quality management. In: Horst W. D, Edgar J. S. (eds). *Biotechnology, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK [<http://www.eolss.net>], 2008.