

Uso da enzima Tth DNA polimerase para amplificação direta de DNA de leveduras contido em vinho

Taís Letícia Bernardi¹, Patrícia D. C. Schaker², Ana Paula Todeschini³, Patrícia Valente⁴, Gildo Almeida da Silva⁵

A detecção ou identificação de micro-organismos do vinho, principalmente leveduras, por meio de técnicas de biologia molecular, na maioria das vezes consiste numa tarefa difícil e de custo elevado. Isto ocorre porque o vinho possui inúmeras substâncias com efeito inibitório sobre os componentes da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A maioria dos protocolos de PCR para amplificação de vinho disponíveis consistem no uso de kits de purificação do DNA. Esses kits são de difícil aquisição e de elevado custo, impedindo muitas vezes, que esta técnica seja adotada como procedimento de rotina. Com o objetivo de desenvolver um protocolo para amplificação direta de vinho, a enzima Tth DNA polimerase foi testada em diferentes concentrações. Esta enzima foi escolhida pela sua alta eficiência na amplificação de DNA de tecidos e secreções humanas, material conhecido por possuir elevado número de compostos inibidores. As reações foram preparadas com 6,0U de enzima Tth DNA polimerase e oligonucleotídeos universais para leveduras. A água da reação foi substituída por soluções contendo diferentes concentrações de vinho: 75, 50, 25, 20, 15, 10 e 5%. Foi utilizado DNA de *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1vvt/97 extraído por método químico. Para fins comparativos, o mesmo procedimento foi realizado com a enzima Taq DNA polimerase. Entre todas as concentrações de vinho testadas, não foi possível observar produto de amplificação do fragmento de 375 pb da região 18S do rDNA, independente da enzima. Estes resultados indicam que as substâncias presentes no vinho exercem um forte efeito inibidor sobre a PCR e que nem mesmo o uso da enzima Tth DNA polimerase possibilitou a amplificação em concentrações mais elevadas. Tratamentos da amostra e diferentes procedimentos precisam ser desenvolvidos para que amplificação direta seja conseguida.

¹ Doutoranda Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, UFRGS. Rua Sarmento Leite, 500, 90150-170 Porto Alegre, RS. Estagiário Embrapa Uva e Vinho. Bolsista CAPES. tislecia@yahoo.com.br

² Graduanda UERGS. Rua Benjamin Constant, 229, 95700-000 Bento Gonçalves, RS. Estagiária Embrapa Uva e Vinho

³ Graduanda UNIJUÍ. Estagiária Embrapa Uva e Vinho. RS 344, Km 39, CP 489, 98900-000 Santa Rosa, RS. todeschiniana@hotmail.com

⁴ Docente UFRGS. Rua Sarmento Leite, 500, 90150-170 Porto Alegre, RS. patricia.valente@ufrgs.br

⁵ Pesquisador Embrapa Uva e Vinho, CP 130, 95700-000 Bento Gonçalves, RS. gildo@cnpv.embrapa.br