



AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA

GENÔMICO EM *Ocimum basilicum*

Marilha Vieira de Brito¹, Maria Fernanda da Costa Gomes², Gisele Holanda de Sá³, Marcones Ferreira Costa⁴, João Paulo Gomes Viana⁵, Camila Campêlo de Sousa⁶, Sulimary Oliveira Gomes⁷, Paulo Sarmanho da Costa Lima⁸, Sérgio Emílio dos Santos Valente⁹

¹Graduanda – Depto. de Biologia CCN-UFPI, marilhavieirabrito@hotmail.com

²Graduanda – Depto. de Biologia CCN-UFPI, fernanda_mf2@hotmail.com

³Graduanda – Depto. de Biologia CCN-UFPI, giselinha-12@hotmail.com

⁴Graduando – Depto. de Biologia CCN-UFPI, marconesbiologo@hotmail.com

⁵Mestrando – UFPI – Teresina – Piauí, jpgv2004@hotmail.com

⁶Mestranda – UFPI – Teresina – Piauí, camilacampelobr@hotmail.com

⁷ Mestranda - UFPI – Teresina – Piauí, sgomes_pi@hotmail.com

⁸Pesquisador da EMBRAPA – Teresina – Piauí, paulosarmanho@yahoo.com.br.

⁹Prof. Dr. – Depto. de Biologia - UFPI – Teresina – Piauí, svalente2@yahoo.com

Resumo: A espécie *Ocimum basilicum* popularmente conhecida como manjeriço ou alfavaca, é encontrada em regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e América do Sul. Essa espécie é economicamente importante devido à produção de grande quantidade de óleos essenciais. Tendo em vista sua importância econômica, fazem-se necessários estudos moleculares para fins de caracterização, filogenia e conservação de germoplasma. O objetivo deste estudo foi avaliar quatro protocolos de extração de DNA em *Ocimum basilicum*. Realizou-se extrações de DNA de acordo com quatro protocolos descritos na literatura, com modificações na quantidade de tecido foliar. Apenas três, dos quatro protocolos avaliados resultaram em DNA e dentre estes, dois podem ser ditos como os mais eficientes no isolamento de DNA de *Ocimum basilicum* em quantidades satisfatórias. O DNA extraído por todos os protocolos avaliados se apresentou degradado e com baixo grau de pureza, fato que pode ter relação com os altos teores de óleos essenciais e metabólitos secundários, característicos da espécie e razão de seu potencial econômico. Diante dos resultados, concluiu-se que dois dos métodos de extração de DNA avaliados foram eficientes no isolamento em quantidades satisfatórias, mas quanto a integridade e pureza das amostras, ainda faz-se necessária etapas de otimização dos protocolos padrões de extração.

Palavras-chave: alfavaca, dna, manjeriço

Introdução

A espécie *Ocimum basilicum* popularmente conhecida como manjeriço ou alfavaca, é encontrada em regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e América do Sul. Esta espécie é economicamente importante devido à produção de grande quantidade de óleo essencial e compostos diversos. A composição química dos óleos essenciais em plantas de manjeriço tem sido alvo de muitos estudos desde a década 1930 (LABRA et al., 2004).

O óleo essencial de manjeriço é amplamente utilizado nas indústrias de alimentos, perfumaria e fármacos além disso é também considerado como uma fonte de compostos de sabor e possui uma gama biológica bem como propriedades antioxidantes (LEE et al., 2005).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar quatro protocolos de extração de DNA genômico com intuito de identificar o protocolo mais eficiente, ou seja, aquele que isole DNA de qualidade e em quantidade adequada para a realização de futuros estudos moleculares que podem auxiliar no manejo de determinadas populações naturais e auxiliar em programas de melhoramento genético.

Material e Métodos

A coleta de folhas de *Ocimum basilicum* ocorreu no núcleo de plantas da UFPI. As amostras foram acondicionadas em isopor® com gelo e transportadas até o Laboratório de Análises de Solos (LASO), localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) onde foram conduzidas as extrações. A quantificação do DNA das amostras foi conduzida no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte / Teresina-PI.

Os protocolos testados foram descritos por Romano e Brasileiro (1998), Grattapaglia e Sederoff (1994) e Khanuja et al. (1989). Além destes protocolos, baseados no detergente CTAB(Brometo de Cetiltrimetilamonio), avaliou-se o protocolo descrito por Dellaporta et al. (1983) que utiliza o detergente SDS (Dodecil Sulfato de Sódio). Houve modificações na quantidade de tecido foliar em relação ao protocolo original, a qual foi estabelecida em 40 mg por amostra. Efetuaram-se as alterações proporcionais dos reagentes, visando tornar o processo de extração da forma menos trabalhosa e onerosa possível.

Ao final das extrações as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8%, sob corrente de 110 V durante 1 hora e 20 minutos, utilizando o agente intercalante GelRED® e o carreador Azul de Bromofenol. Os padrões de bandas foram visualizados

utilizando luz ultravioleta (UV) e o marcador de DNA (fago λ) com concentração conhecida de 100 ng/ μ L. Esses padrões foram fotografados com equipamento MiniBISPro®.

Resultados e Discussão

Com os resultados obtidos após a eletroforese em gel de agarose, foi possível constatar que o método proposto por Grattapaglia e Sederoff (1994) não foi eficiente na obtenção de DNA em *Ocimum basilicum*. Já com a aplicação dos protocolos descritos por Dellapota et al. (1983) e Romano e Brasileiro (1998) foi possível ter sucesso na obtenção de DNA em quantidade adequada para uso em estudos moleculares. As amostras submetidas ao método de Khanuja et al. (1999) também apresentaram DNA, no entanto, não em tanta quantidade quanto aos outros dois métodos mencionados.

Todos os métodos avaliados não resultaram em DNA de qualidade, tendo em vista que a retenção de DNA nos poços em algumas canaletas são indicativo da presença de polissacarídeos ou proteínas que tornam as amostras mais viscosas. Além disso, a baixa qualidade das amostras pode ser explicada pela presença de DNA degradado, observado como uma faixa ao longo das canaletas no gel. Diante destes resultados, etapas de otimização nos protocolos padrões podem ser viáveis para extração de DNA de *Ocimum basilicum*.

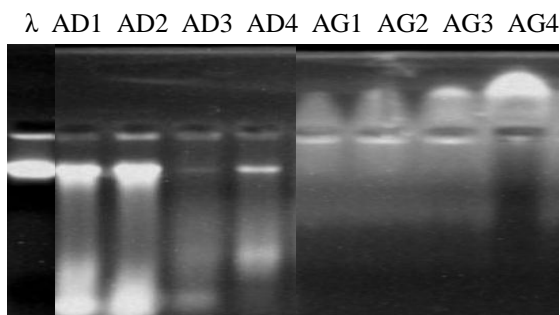


Figura 1: Perfil eletroforético do DNA genômico total de *Ocimum basilicum*, em gel de agarose a 0,8%, com a presença do marcador de DNA (fago λ). AD = extração de DNA em alfavaca utilizando o protocolo de Dellaporta et al. (1983), AG = extração com o protocolo de Grattapaglia e Sederoff (1994).

λ AR1 AR2 AR3 AR4 AK1 AK2 AK3 AK4

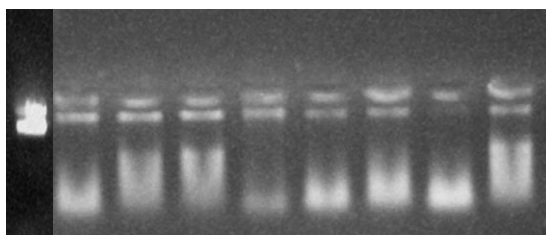


Figura 2: Perfil eletroforético do DNA genômico total de *Ocimum basilicum*, em gel de agarose a 0,8%, com a presença do marcador de DNA de fago λ . AR = extração de DNA em alfavaca utilizando o protocolo de Romano e Brasileiro (1998) et al. (1983), AK = extração com o protocolo de Khanuja et al. (1999).

Conclusão

Para extração de DNA de *Ocimum basilicum*, recomenda-se o uso dos protocolos descritos por Romano & Brasileiro (1998) e Dellaporta et al. (1983) pois com a aplicação destes é possível obter DNA em quantidade satisfatória. Com relação à qualidade do DNA obtido, conclui-se que é necessário avaliar os protocolos descritos com modificações no tampão de extração e/ou procedimento padrão em busca do método otimizado para a espécie.

Referências Bibliográficas

LABRA, M.; MIELE, M.; LEDDA, B.; GRASSI, F.; MAZZEI, M.; SALA, F.; Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. **Plant Science.**, v. 167, n. 4, p. 725 – 731, 2004.

LEE, S. J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K.G.; Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry.**, v. 91, n. 1, p. 131 – 137, 2005.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J. & HICKS, J.B. 1983. A plant minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter** 1 (4): 19-20.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. 1994. In: **Ferreira, M. E. & Grattapaglia, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas.** 2a ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN.

ROMANO, E. & BRASILEIRO, A.C. 1998. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: **Brasileiro, A.C.M. & Carneiro, V.T.C. Manual de transformação genética de plantas. 1998.** Brasília. EMBRAPA-SPI/EMBRAPA- CENARGEN.

KHANUJA, S.P.S.; SHASANY, A.K.; DAROKAR, M.P. & KUMAR, S. 1999. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. **Plant Molecular Biology Reporter** 17: 1-7.