

CENTRO ESTADUAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA PAULA SOUZA
FACULDADE DE TECNOLOGIA DE CAMPINAS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

CAIO ZILIÃO PRADO

CRISTIANE DE OLIVEIRA BARBOZA

**OS PROCESSOS QUÍMICOS ENVOLVIDOS NA EXTRAÇÃO
DE DNA VEGETAL PARA ESTUDOS DE FITOPATOLOGIA
MOLECULAR**

CAMPINAS/SP
2022

CENTRO ESTADUAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA PAULA SOUZA
FACULDADE DE TECNOLOGIA DE CAMPINAS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

CAIO ZILIÃO PRADO
CRISTIANE DE OLIVEIRA BARBOZA

**OS PROCESSOS QUÍMICOS ENVOLVIDOS NA EXTRAÇÃO
DE DNA VEGETAL PARA ESTUDOS DE FITOPATOLOGIA
MOLECULAR**

Trabalho de Graduação apresentado por Caio Zilião Prado e Cristiane de Oliveira Barboza como pré-requisito para a conclusão do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos, da Faculdade de Tecnologia de Campinas, elaborado sob a orientação do Profa. Dra. Eliane Melo Brolazo

CAMPINAS/SP
2022

FICHA CATALOGRÁFICA
CEETEPS - FATEC Campinas - Biblioteca

B238p

BARBOZA, Cristiane de Oliveira

Os processos químicos envolvidos na extração de DNA. Caio Zilião Prado e Cristiane de Oliveira Barboza.

Campinas, 2022.

40 p.; 30 cm.

Trabalho de Graduação do Curso de Processos Químicos – Faculdade de Tecnologia de Campinas.

Orientador: Prof. Dra. Eliane Melo Brolazo.

1. DNA 2. Extração. 3. Fitopatologia. 4. PCR. I. Autor. II. Faculdade de Tecnologia de Campinas. III. Título.

CDD 630

Catálogo-na-fonte: Bibliotecária: Aparecida Stradiotto Mendes – CRB8/6553

TG PQ 22.2

Cristiane de Oliveira Barboza e Caio Zilião Prado

**Os processos químicos envolvidos na extração de DNA vegetal
para estudos de fitopatologia molecular**

Trabalho de Graduação apresentado como exigência parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos, pelo CEETEPS / Faculdade de Tecnologia – Fatec Campinas.

Campinas, 06 de dezembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA



Eliane Melo Brolazo
Fatec Campinas



Fábio Domingues Nasário



Edson Massola Junior
FATEC Campinas

AGRADECIMENTOS

A Deus que concede ao homem inteligência para por meio da ciência compreender a magnitude de Sua criação.

Aos nossos familiares pela compreensão e apoio durante o período de dedicação e estudos. Eu agradeço em particular à minha mãe Sonia que sempre me apoiou na busca de meus objetivos acadêmicos e profissionais, e é meu exemplo pessoal de persistência e luta.

Ao professor Dr. Alfredo Seiiti Urashima do Laboratório de Genética Molecular (LAGEM) da Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR, campus Araras, por nos dar a oportunidade de desenvolver os experimentos de extração de DNA vegetal em seu laboratório, bem como participar de aulas e palestras que contribuíram grandemente para a construção do conhecimento adquirido ao longo da realização desse trabalho.

À professora Dr^a Eliane Melo Brolazo por toda orientação prestada e pelas aulas de Microbiologia e Bioquímica que expandiram nossos horizontes para chegarmos até aqui.

À FATEC como instituição de ensino e a todos os seus professores e colaboradores.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a todos os profissionais das ciências e acadêmicos, que persistem com coragem na busca pelo conhecimento e pela solução de problemas para a construção de uma sociedade mais justa e de um mundo melhor.

RESUMO

As fitopatologias representam um dos principais fatores que anualmente comprometem a produtividade das lavouras, uma vez que podem afetar negativamente o desenvolvimento da planta ou até mesmo levar à morte da mesma, gerando impactos financeiros para produtores e colocando em risco a segurança alimentar. Apesar dos avanços tecnológicos, a produção de alimentos no mundo ainda é um desafio a ser superado. Segundo dados da FAO-ONU, em 2017 havia cerca de 815 milhões (11% da população) vítimas de fome no mundo. Por esse motivo o entendimento claro de uma fitopatologia é um fator de extrema importância para assegurar a produtividade da lavoura. O emprego dos conhecimentos de biologia molecular vem contribuindo significativamente para expansão do conhecimento na área agrícola. A partir da técnica de extração de DNA vegetal é possível o isolamento do material genético do agente etiológico, dando base para entendimento mais aprofundado dos sintomas, diagnose, epidemiologia e definição das formas de controle mais eficazes para a fitopatologia. Nesse sentido, este trabalho irá detalhar as etapas necessárias para isolamento do DNA da bactéria Gram Negativa *Xylella fastidiosa*, agente etiológico causador da Clorose Variegada dos Citros (CVC) também popularmente conhecida como “amarelinho”, a partir da extração do DNA vegetal e todos os processos físico-químicos envolvidos, e realizar o PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Todo esse processo será realizado a partir do método adaptado de Murray & Thompson com substituição do reagente de extração/purificação Cloreto de Césio pelo Clorofórmio Álcool Isoamílico (CIA), com o objetivo de realizar o controle positivo da doença nos pomares da região de Araras, interior de São Paulo, a partir da utilização de um reagente que não seja radioativo e que represente menos riscos para a saúde de quem o manipular e menores impactos ambientais.

Palavras-chave: DNA; extração; fitopatologia; PCR.

ABSTRACT

Phytopathology represent one of the main factors that annually compromise the productivity of crops, since they can negatively affect the development of the plant or even lead to its death, generating financial impacts for producers and putting food security at risk. Despite technological advances, food production in the world is still a challenge to be overcome. According to FAO-UN data, in 2017 there were about 815 million (11% of the population) victims of hunger in the world. For this reason, a clear understanding of a phytopathology is an extremely important factor to ensure the crop productivity. The use of molecular biology knowledge has contributed significantly to the expansion of knowledge in the agricultural area. From the technique of plant DNA extraction, it is possible to isolate the genetic material of the etiological agent, providing a basis for a deeper understanding of the symptoms, diagnosis, epidemiology and definition of the most effective forms of control for phytopathology. In this sense, this work will detail the steps necessary for the isolation of the DNA of the Gram Negative bacterium *Xylella fastidiosa*, the etiological agent that causes Citrus Variegated Chlorosis (CVC) also popularly known as "amarelinho", from the extraction of plant DNA and all physical-chemical processes involved, and perform the PCR (Polymerase Chain Reaction). This entire process will be carried out using the method adapted from Murray & Thompson, replacing the Cesium Chloride extraction/purification reagent with Isoamyl Alcohol Chloroform (CIA), with the aim of achieving positive control of the disease in orchards in the Araras region, interior of São Paulo, from the use of a reagent that is not radioactive and that represents less risks to the health of those who handle it and less environmental impacts.

Keywords: DNA; extraction; PCR; phytopathology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Limpeza das folhas	17
Figura 2: Separação da nervura basal	17
Figura 3: Microtubos de 2,0mL preenchidos com os pedaços das nervuras até o volume de 1,0mL.....	18
Figura 4: Gel agarose mostrando o DNA do patógeno	21
Figura 5: Fragmentos de DNA amplificados através do PCR.....	21

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	JUSTIFICATIVA	13
1.2	OBJETIVO GERAL.....	14
1.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3	METODOLOGIA	17
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
	REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

A fitopatologia vegetal é o estudo científico das doenças infecciosas de plantas que se estende para diversos aspectos da interação entre fitopatógeno, espécie vegetal, ambiente e seus impactos na sociedade. Abrange a fisiologia de doenças, seu controle, a identificação e caracterização de patógenos, a biologia molecular, a morfologia, a genética, a transmissão de doenças, a ecologia e a epidemiologia, o controle químico e o biológico, a etnofitopatologia, a indução de resistência e outras subáreas dentro desse tema (AMORIM et al, 2018).

Desde que os cientistas James Watson e Francis Crick propuseram a estrutura tridimensional do DNA, a área da biologia molecular vem passando por grandes avanços tecnológicos. Sequências de nucleotídeos e a caracterização das propriedades químicas do DNA passaram a ser intensivamente utilizadas como alvos de pesquisas (ANDRADE & CALDEIRA, 2009). Com o desenvolvimento técnico-científico, progressos significativos têm sido alcançados através do isolamento, da análise e síntese de sequência de DNA, da introdução desses DNA recombinantes in vivo para o estudo da sua função e dos mecanismos que controlam a expressão dos genes (LIMA, 2008).

O DNA genômico encontra-se associado a diversas proteínas e enzimas, que agem na arquitetura da molécula, no seu processo de replicação, na manutenção da sua integridade em outros processos afins (LEWIN, 2009). A extração de DNA é a primeira etapa para a utilização de genomas em diferentes técnicas de biologia molecular e a sua pureza e qualidade são sempre os pré-requisitos principais. Dessa forma, inúmeros componentes nucleares necessitam ser dissociados do DNA para que sua análise seja fiel e isenta de contaminantes (ARBI et al., 2010). Para tal, existem diferentes métodos de isolamento de DNA, pois os protocolos devem ser adequados à espécie de planta ou ao tecido vegetal. No entanto, em todos os procedimentos, o objetivo têm sido obter grandes quantidades de DNA, de forma rápida, eficiente e com alta integridade (LIMA, 2008).

No que se refere à biologia molecular, a extração de DNA vegetal é a técnica que permite o isolamento do material genético do agente etiológico para posteriores estudos, e será abordada em detalhes ao longo deste trabalho.

1.1 JUSTIFICATIVA

Com o aumento das discussões de questões relacionadas à temas ambientais, é fundamental trazermos à tona termos que se enquadrem neste assunto para que eles também sejam parte do cotidiano acadêmico e das discussões que permeiam a sociedade.

Tendo em vista o modelo proposto por MURRAY & THOMPSON em 1980, esse trabalho tem o propósito de estabelecer um método alternativo para extração de DNA vegetal, substituindo o uso de Cloreto de Césio - que é radioativo trazendo riscos para a saúde do manipulador e maiores impactos ambientais - como reagente no processo de purificação do DNA pelo Clorofórmio Álcool Isoamílico (CIA).

Este trabalho utilizará a fitopatologia como ferramenta de discussão sendo fundamental para promover essa ciência auxiliando no cuidado da produção agrícola e elevando a qualidade dos alimentos. Além disso, a fitopatologia também corrobora com o tema da agricultura, que suporta fatores sociais e econômicos.

Por fim, com o avanço da engenharia genética, novas tecnologias têm transformado a fitopatologia ao permitir novas descobertas neste cenário como as que serão executadas neste trabalho, além de servir como fonte para futuras pesquisas referentes ao tema.

1.2 OBJETIVO GERAL

- Realizar modificações no método inicialmente proposto por MURRAY & THOMPSON em seus estudos na década de 1980, de forma a substituir o uso do Cloreto de Césio como reagente no processo de purificação do DNA pelo Clorofórmio Álcool Isoamílico (CIA).

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as etapas e os processos físico-químicos envolvidos no isolamento do DNA da bactéria Gram Negativa *Xylella fastidiosa*, a partir da extração de DNA vegetal de folhas de citros.
- Realizar a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Comparar a eficiência do método alternativo proposto com a substituição do reagente Cloreto de Césio pelo Clorofórmio Álcool Isoamílico (CIA) no sentido de ser capaz de identificar a presença de DNA da bactéria Gram Negativa *Xylella fastidiosa* na amostra contaminada analisada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A principal preocupação na elaboração do método de extração de DNA vegetal é garantir pureza e rendimento da amostra a um custo que seja acessível e razoável para o propósito do experimento, sobretudo em instituições de ensino e pesquisa que normalmente dispõem de recursos limitados.

A técnica de PCR criada em meados da década de 1980 possibilitou a amplificação do DNA impulsionando a descoberta de dados moleculares para as mais variadas espécies (CAIXETA et al., 2016). Destes, destacam-se o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), o STS (*Sequence Tagged Sites*), o SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e os microsatelites.

Além de possibilitar o estudo de uma maior quantidade de características, estes marcadores podem obter inúmeros polimorfismos genéticos sem que o ambiente influencie nos resultados mesmo em uma cultura de células, conforme analisado por FALEIRO (2007). As novidades tecnológicas no campo de sequenciamento de DNA - ou sequenciamento de nova geração - também são importantes para a genética da conservação e melhoramento vegetal, pois, entre outros fatores, permitem a análise do genoma das plantas, das variantes alélicas e até mesmo a clonagem baseada em mapeamento genético (CARVALHO; SILVA, 2010; GIUSTI; KETTENER; FUCHS-FERRAZ, 2016). Para que isso seja possível, o DNA precisa ser extraído do núcleo da célula vegetal, sem sofrer danos e precisa estar livre de qualquer tipo de contaminante.

É possível extrair o DNA de diversas maneiras de acordo com a sua espécie e subgrupo tendo em vista que a escolha do protocolo depende da quantidade de DNA requerida, além do número de amostras e da presença de outras substâncias (SEMAGN, 2014). É importante destacar que, conforme já analisado por DOYLE (1987), na maioria dos protocolos disponíveis foi realizado o rompimento de membranas celulares por meio do uso do detergente CTAP.

De acordo com MURRAY & THOMPSON (1980), “com o crescente uso de técnicas de DNA recombinante na pesquisa com plantas, a preparação de longas e puras cadeias de DNA tem se tornado uma preocupação maior. Uma vez que as mesmas forças requeridas para quebrar a parede celular também podem danificar o DNA, cuidado considerável deve ser tomado para garantir rendimento e comprimento do DNA”.

Por fim, atualmente no mercado é possível adquirir kits para extração de DNA de plantas com quantidade suficiente para análises moleculares (LICKFELDT et al., 2002). Entretanto, estes kits possuem alto custo dificultando sua utilização por grande parte dos laboratórios.

No que se refere aos métodos tradicionais, há a utilização de reagentes tóxicos aumentando de forma significativa o tempo para obtenção do DNA, além do aumento de custos e chances de erros (TAMARI et al., 2013).

Ao analisar vegetais que possuem polissacarídeos e metabólitos secundários, como fenóis e terpenos, tais métodos podem apresentar uma alta taxa de ineficiência para a obtenção do DNA puro (SOUZA et al., 2012). Os polissacarídeos são responsáveis por inibir a ação das enzimas de restrição fazendo com que a amostra de DNA fique mais viscosa dificultando as análises eletroforéticas (ROMANO; BRASILEIRO, 1999).

Os compostos fenólicos oxidam o DNA presentes na célula vegetal, escurecendo as amostras, reduzindo sua vida útil e impossibilita análises moleculares (SAHU; THANGARAJ; KATHIRESAN, 2012). Para que o DNA extraído se torne mais puro, é possível adicionar ao tampão diferentes concentrações de agentes antioxidantes como PVP e/ou -mercaptoetanol e/ou proteases, além de realizar etapas de purificação com clorofórmio (ROMANO; BRASILEIRO, 1999), reagentes altamente tóxicos, diminuindo, a segurança e a confiabilidade do método (KOTCHONI; GACHOMO, 2009).

3 METODOLOGIA

Para isolamento do DNA da bactéria Gram Negativa *Xylella fastidiosa* a partir da extração do DNA vegetal das folhas de citros utilizou-se os seguintes materiais:

- Banho-Maria, centrífuga e concentrador de DNA, capela exaustora;
- Fluxo laminar, termociclador;
- Cuba e fonte de eletroforese, fotodocumentador.

As etapas abaixo foram realizadas para isolamento do DNA das bactérias presentes no material vegetal infectado.

Foram coletadas folhas dos citros, que passaram por um processo de limpeza para remoção de poeira e outros contaminantes, com papel umedecido com álcool 70%.

Figura 1 - Limpeza das folhas



Fonte: autoria própria

Como é de conhecimento, a fitopatologia a ser estudada ataca o sistema vascular da planta, portanto somente foram utilizadas para composição da amostra a nervura basal de 5 a 10 folhas de citros. A nervura basal foi separada com a tesoura e posteriormente picada em pedaços pequenos com a lâmina até completar o volume de 1,0mL de um microtubo de 2,0mL.

Figura 2: Separação da nervura basal



Fonte: autoria própria

Figura 3: Microtubos de 2,0mL preenchidos com os pedaços das nervuras até o volume de 1,0mL



Fonte: autoria própria

Para extração foi adicionado no microtubo de 2,0mL um volume de 1,4mL de tampão de extração CTAB contendo 0,2% de beta-mercaptoetanol, e mantido por 2 horas em banho-maria a 65°C, cuja função é reduzir a contaminação provocada pelos polifenóis;

Depois disso a amostra foi centrifugada a 8000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Para recuperação de 900uL do sobrenadante adicionou-se (volume/volume) de Clorofórmio Álcool Isoamílico (CIA) na proporção de 24:1 (800uL). Nessa etapa no método original proposto por Murray & Thompson era utilizado o Cloreto de Césio, que nesse método alternativo foi substituído pelo reagente CIA. A amostra então foi homogeneizada invertendo os tubos por 2 minutos manualmente. A função do CIA é atuar como agente desnaturante das proteínas da amostra.

Novamente a amostra foi centrifugada a 12800 rpm por 5 minutos, temperatura ambiente. Para recuperação de 600uL do sobrenadante foi adicionado 0,6 do volume de isopropanol (420uL), cuja função é promover a precipitação do DNA. A amostra então foi homogeneizada invertendo os tubos por 2 minutos manualmente e mantidas *overnight* sob refrigeração a -4°C.

Após isso, centrifugou-se novamente a 12800 rpm por 20 minutos a 4°C, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se ao pellet 1mL de álcool 70%, cuja função é purificação do pellet.

Novamente as amostras foram centrifugadas a 12800 rpm por 10 minutos a 4°C e secas no concentrador de DNA em temperatura ambiente.

Então foram utilizados 50uL de tampão de extração TE 1X para ressuspender o DNA e as amostras foram mantidas hidratando "overnight" no escuro em temperatura ambiente.

Concluído o isolamento do DNA da bactéria, foi realizado o PCR. O PCR é uma técnica que consiste na replicação de sequências específicas de DNA utilizando equipamentos termocicladores. Para realizar a reação acrescentam-se às amostras de material genético sequências iniciadoras complementares (também conhecidas como primers), desoxirribonucleotídeos e DNA-polimerase termo resistente. Para realização do mesmo foram seguidas as etapas descritas abaixo.

Foi preparada uma mistura dos reagentes descritos abaixo, em microtubo de 1,5mL ou 2mL, multiplicando a quantidade de cada reagente pelo número de amostras, incluindo controle positivo, controle negativo, controle do mix e mais algumas sobras (varia de acordo com o número total de amostra). Para *Xylella fastidiosa*, conforme adaptação do método de Minsavage et al., (1994) e Pooler & Hartung, (1995), foram utilizadas as seguintes quantidades de reagentes para o preparo de 01 amostra:

- Água milli Q (autoclavada): 5,8uL
- Tampão 10 X da Taq Polimerase: 2,0uL – função: enzima utilizada na amplificação de fragmentos de DNA através da técnica de PCR;
- dNTPs (10mM mix): 2,0uL – função: reduzir o Mg²⁺ livre, interferindo assim com a atividade da polimerase e diminuindo o anelamento do “primer”;
- MgCl₂ (25mM): 2,0uL – função: funciona como cofator da enzima DNA polimerase podendo afetar as temperaturas de denaturação das fitas de DNA e o anelamento dos primers;
- RST31 (5uM): 1,0uL (Minsavage et al, 1994) e RST33 (5uM): 1,0uL (Minsavage et al, 1994) – função: primer. O primer auxilia na separação das fitas de DNA, permitindo a ligação da DNA polimerase e aumentando a fita de DNA que está sendo duplicada, no caso a do patógeno. O primer hibridiza-se à fita de DNA original, permitindo que a DNA polimerase adicione os desoxirribonucleotídeos à extremidade 3’;
- CVC-1 (5uM): 1,0 (Pooler & Hartung, 1995) – função: DNA do agente causador da fitopatologia utilizado como padrão;
- 272-2 int (5uM): 1,0 (Pooler & Hartung, 1995);
- Taq-polimerase (5U/uL): 0,2uL – função: enzima utilizada na amplificação de fragmentos de DNA através da técnica de PCR;
- DNA: 4,0uL – função: amostra analisada;

- Volume total: 20uL

Após preparo dos reagentes, a mistura foi bem homogenizada e pulsada. 16,0uL da mistura foi aliqotada em cada microtubo e o DNA de cada amostra foi aliqotado no microtubo correspondente. O material foi levado ao termociclador no programa:

95°C, 1 minuto: desnaturação inicial

95°C, 30 segundos, 40 ciclos: desnaturação

55°C, 1 minuto, 40 ciclos: hibridização

72°C, 45 segundos, 40 ciclos: extensão

72°C, 5 minutos: extensão final

Após isso, as amostras foram guardadas no freezer.

Após conclusão da reação de amplificação do DNA, foi realizada a eletroforese em gel para visualização dos resultados conforme etapas descritas a seguir. Para eletroforese, foi adicionado 4,0uL do tampão de carregamento em todas as amostras amplificadas. Eletroforese em gel é uma técnica na qual fragmentos de DNA são arrastados por uma corrente elétrica através de uma matriz de gel, e que separa os fragmentos de DNA de acordo com o tamanho.

Para realização da eletroforese foi preparado o gel de agarose 1,2% dissolvido em TBE 0,5X e dissolvido em micro-ondas até que o gel ficasse totalmente incolor, sem nenhum cristal de agarose. O gel foi resfriado (temperatura suportável ao contato com a pele de aproximadamente 40°C) e despejado na bandeja, após colocação dos pentes. As bolhas foram retiradas borrifando álcool 70% no mesmo. Após polimerização, a bandeja com gel foi transferida para a cuba e adicionado o tampão TBE 0,5X até cobrir o gel.

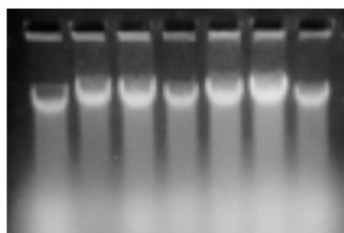
No primeiro pente pipetou-se *Ladder* (padrão de DNA) de 1kb sempre no primeiro poço de cada pente, no segundo poço o controle do mix, no terceiro poço o controle negativo, no quarto poço o controle positivo e nos poços seguintes o restante das amostras. Após o término das aplicações das amostras foi pipetado parte dos DNAs para avaliação da qualidade. Os fios da cuba foram acoplados nos polos correspondentes da fonte da eletroforese e o processo se iniciou. A fonte foi desligada, o gel foi retirado e foi feito o processo de corar em brometo de etídeo. O DNA foi visualizado em luz ultravioleta, e as imagens foram mantidas no banco de imagens.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eletroforese consiste na migração de moléculas ionizadas, de acordo com suas cargas elétricas e pesos moleculares em campo elétrico. Moléculas com carga negativa migram para o polo positivo (ânodo) e moléculas com carga positiva migram para o polo negativo. Como o DNA é molécula de carga negativa, seus fragmentos movem-se na direção do eletrodo positivo. Já que todos os fragmentos de DNA têm a mesma quantidade de carga por massa, os fragmentos menores atravessam o gel de Agarose mais rapidamente do que os maiores. Os grupos de moléculas de mesmo tamanho que migram na matriz de agarose assumem a forma do poço e constituem as formas chamadas de bandas de DNA. Um ponto importante a ressaltar é o fato de a Agarose ser um polissacarídeo neutro, cuja estrutura química permite a formação de um gel altamente resistente mesmo em baixas concentrações, e esse gel é o mais recomendado para separação de fragmentos de 0,2 a 50 kb.

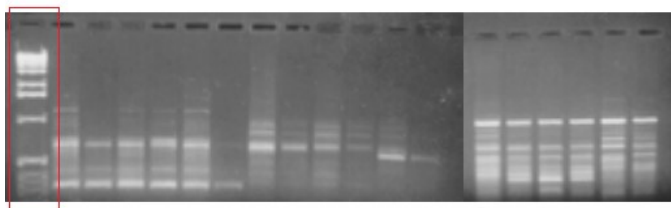
Nas extrações podem-se obter grandes moléculas, que incluem cromossomos inteiros ou cromossomos fragmentados. Amostras de boa qualidade formam bandas íntegras, enquanto amostras degradadas ou com presença de moléculas de RNA apresentam rastros ao longo do gel. Com a aplicação do método, foi possível a obtenção de um DNA incolor, livre de substâncias viscosas que frequentemente se ligam a ele durante a sua precipitação. A pureza do DNA obtido foi satisfatória, visível no gel de agarose (figura 4) e mostrando-se amplificável através de PCR - *Polymerase Chain Reaction* (figura 5).

Figura 4: Gel agarose mostrando o DNA do patógeno



Fonte: autoria própria

Figura 5: Fragmentos de DNA amplificados através do PCR



Fonte: autoria própria

Na figura 5 a primeira banda em destaque indica o DNA do patógeno, ou seja, a amostra padrão. As demais colunas referem-se às amostras analisadas. É possível identificar a presença de DNA do patógeno nas amostras a partir da comparação da semelhança das bandas (presença ou ausência).

Pela precisão dos resultados obtidos permitindo identificar material genético do patógeno nas amostras de citros contaminadas que foram analisadas, pôde-se observar que o método adaptado de Murray & Thompson demonstrou funcionar adequadamente para a finalidade desejada (pesquisa acadêmica e prestação de serviços analíticos para a comunidade realizados pelo LAGEM-UFSCAR).

O protocolo desenvolvido com a substituição do reagente Cloreto de Césio por Clorofórmio Álcool Isoamílico (CIA) para purificação do DNA permitiu a obtenção de DNA de boa qualidade e não interferiu na identificação do patógeno na aplicação da técnica de eletroforese. O DNA foi isolado a partir de folhas de citros contaminadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*, e a aplicação desse método alternativo tem servido de base para o estudo genético das populações de citros da região de Araras e para monitoramento do CVC. Com os resultados obtidos, abre-se a perspectiva de análise genética de populações de citros de uma forma relativamente mais simples, utilizando um reagente alternativo (CIA) menos prejudicial à saúde se comparado ao Cloreto de Césio que era o reagente utilizado no método de purificação proposto inicialmente por Murray & Thompson na década de 1980.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após aplicação do protocolo, concluímos que os serviços analíticos prestados pela instituição de ensino (LAGEM-UFSCAR) são de extrema relevância para monitoramento da doença CVC na região. Como ainda não há uma forma de controlar a bactéria *Xylella fastidiosa*, a principal recomendação para os citricultores é a utilização de manejo da doença, baseado em três estratégias: utilização de mudas saudáveis, poda de ramos com sintomas iniciais em plantas com mais de dois anos e erradicação de plantas mais novas e controle das cigarrinhas. De fato, o monitoramento genético das plantas permite a identificação de mudas saudáveis e sua comercialização, evitando que mudas infectadas sejam plantadas e provoquem a disseminação da doença. No que tange a utilização de mudas saudáveis, para evitar que o citricultor corra o risco de levar a bactéria *Xylella fastidiosa* para a sua propriedade e perca árvores antes que elas comecem a produzir, o primeiro passo é adquirir mudas que estejam livres da doença. Para isso, é preciso verificar se o viveiro adota todas as medidas de segurança para a produção de mudas teladas, se é certificado e respeita as regras sanitárias estabelecidas pela Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo. Nesse sentido, o serviço realizado pelo LAGEM-UFSCAR permite oferecer aos produtores de mudas cítricas, os serviços de exames diagnósticos de Clorose Variegada dos Citros por meio da identificação do DNA do patógeno na amostra de folhas de citros enviadas para análise. O laudo de sanidade é uma exigência estadual para comercialização de mudas em São Paulo e é de extrema importância para a continuação do processo. Graças à eficiência do método adaptado para chegar a resultados assertivos é possível prestar serviço de qualidade aos produtores e é uma forma de monitorar e controlar a doença nos pomares paulistas, assim, essa pesquisa poderá melhorar também o trabalho daqueles que convivem diariamente com este cenário.

Além disso, é importante destacar que esse trabalho só foi possível devido a todo o aprendizado obtido durante o curso de Processos Químicos e seus desdobramentos. A análise técnica desses problemas demonstrou sinergia com tudo aquilo que foi visto durante o curso e, sem dúvidas, serviu como inspiração para que essas páginas fossem escritas. As práticas laboratoriais que foram aprendidas como parte do curso foram fundamentais para a realização da parte prática deste trabalho, também foram aprimoradas as técnicas de manuseio e funcionamento de novos equipamentos, tais como a cuba de eletroforese e o termociclador. As aulas de Bioquímica e Microbiologia foram de grande importância para o estudo e entendimento da bactéria causadora do CVC. Por fim, para que este trabalho fosse escrito e fundamentado, as matérias de Metodologia de Pesquisa foram essenciais.

REFERÊNCIAS

AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; REZENDE, JAM. Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos. v.1. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2018.

ANDRADE, M.A.B.S. & CALDEIRA, A.M.A.(2009). O modelo de DNA e a Biologia Molecular: inserção histórica para o Ensino de Biologia. *Filosofia e História da Biologia*,4: 139-165.

ARBI, G.; NACEUR, B.; CHOKRI, M.; MOHAMED, B.; MOHAMED, N. (2009) A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from *Allium roseum*L. (Alliaceae). *Afr. J. Biotechn.*,8(17): 4020-4024.

BARATTO, C.M. & MEGIOLARO, F.(2012).Comparação de diferentes protocolos de extração de dna de bactérias para utilização em RAPD-PCR. *Unoesc & Ciência*,3(1):121-130.

BARRETTA, Janaina Natalia. Fitopatologia e segurança alimentar: contribuições, lacunas e perspectivas. ESALQ-USP, 2022.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Eds.). *Marcadores moleculares*. Viçosa: Editora UFV, 2016. p. 9-93.

CARVALHO, M.C.C.G.; SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Ciência Rural*, v. 40, n. 3, p. 735-744, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010000300040>.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, v. 19, p. 11-15, 1987.

FALEIRO, F.G. Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

GIUSTI, J.; KETTENER, K.; FUCHS-FERRAZ, M.C.P. Influência do sequenciamento de nova geração no futuro da genética da conservação. *Revista RG News*, v. 2, n. 2, p. 88-99, 2016.

KOTCHONI, S.O.; GACHOMO, E.W. A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plants. *Molecular Biology Reports*, v. 26, p. 1633-1636, 2009. <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9362-9>.

LEWIN, B. (2009). *Genes IX*. 9.ed. Porto Alegre: Artmed.

LICKFELDT, D.W.; HOFMANN, N.E.; JONES, J.D.; HAMBLIN, A.M.; VOIGT, T.B. Comparing three DNA extraction procedures for cost, efficiency, and DNA yield. *HortScience*, v. 37, p. 822-825, 2002. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.37.5.822>.

LIMA, M. (2008). *Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular*. Embrapa Algodão. Campina Grande.

MICHEREFF, Sami J. *Fundamentos de Fitopatologia*. 2001. Disponível em: <https://www.bibliotecaagptea.org.br/agricultura/defesa/livros/FUNDAMENTOS%20DE%20FITOPATOLOGIA.pdf>. Acesso em: Abr/2022.

MIRANDA, E.A.G.C. Transferibilidade e validação de marcadores microssatélites derivados de EST para duas espécies de *Campomanesia (Myrtaceae)* do Cerrado. 2014. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2014.

MOMENI, H.; SHIRAN, B.; KOHGARD, M.; KHODDAMBASHI, M. Development of a rapid and efficient method for DNA extraction from plants containing high amount of polyphenols and secondary methabolite. Protocol online. 2011.

MURRAY, M.G. and THOMPSON, W.F., Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Carnegie Institution of Washington, Department of Plant Biology, Stanford, CA 94305, USA, 1980.

Procedimento Operacional Padrão para Análise Molecular de Citros - POP-016, Laboratório de Genética Molecular - UFSCAR, revisão 25/04/2019.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de plantas do Cerrado: soluções para problema comumente encontrados. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v. 2, n. 9, p. 40-43, 1999.

ROSA, D.D. (2008). Método rápido de extração de DNA de bactérias. *Summa phytopathol.* 34(3):259-261.

SAHU, S.K.; TANGARAJ, M.; KATHIRESAN, K. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *ISRN Molecular Biology*, article ID 205049, 2012. <https://doi.org/10.5402/2012/205049>.

SEMAGN, K. Leaf tissue sampling and DNA extraction protocols. In: BESSE, P. (Ed.). *Molecular plant taxonomy: methods and protocols*. New York: Human Press, 2014. p. 53-67. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-767-9_3.

SOUZA, Diego Cerveira de. *Extração de DNA de plantas do cerrado: metodologia inédita e eficiente*. Universidade Federal de Uberlândia, 2019.

SOUZA, H.A.V.; MULLER, L.A.C.; BRANDÃO, R.L.; LOVATO, M.B. Isolation of high quality and polysaccharide-free DNA from leaves of *Dimorphandra mollis* (Leguminosae), a tree from the Brazilian Cerrado. *Genetics and Molecular Research*, v. 11, n. 1, p. 756-764, 2012. <https://doi.org/10.4238/2012.March.22.6>.

TAMARI, F.; HINKLEY, C.S.; RAMPRASHAD, N. A comparison of DNA extraction methods using *Petunia hybrida* tissues. *Journal of Biomolecular Techniques*, v. 24, p. 113-118, 2013. <https://doi.org/10.7171/jbt.13-2403-001>.

XIN, Z.; CHEN, J. A high throughput DNA extraction method with high yield and quality. *Plant Methods*, v. 8, n. 26, 2012. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-26>.