

EFEITO DO TIPO DE ARMAZENAMENTO DE FOLHAS DE CANA-DE-AÇÚCAR MICROPROPAGADA NA OBTENÇÃO DE DNA BACTERIANO CONTAMINANTE

Ana Karoline da Silva Sobral¹, Patrick Anderson Padilha Dantas², Paloma de Freitas Cavalcante³, Laureen Michelle Houllou⁴, Patrícia Virgínia Padilha Dantas^{5*}

1. Estudante de Ensino Médio da Escola Poeta Manoel Bandeira
2. Estudante de Licenciatura em Ciência Biológicas da UFPE
3. Técnica do Laboratório de Diagnose e Fidelidade Genética do CETENE
4. Pesquisadora do Laboratório de Diagnose e Fidelidade Genética do CETENE
5. Pesquisadora do Laboratório de Diagnose e Fidelidade Genética do CETENE / Orientador

Resumo:

A biologia molecular é umas das principais formas de detecção da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* causadora do raquitismo-da-soqueira em cana-de-açúcar, sendo a detecção molecular dependente da integridade do DNA bacteriano utilizado. O presente trabalho buscou avaliar a influência de diferentes formas de armazenamento de amostras de tecidos de cana-de-açúcar micropropagada na qualidade do DNA bacteriano extraído. As extrações de DNA foram feitas com intervalos diferentes após a coleta (imediatamente, com um dia, com sete dias e com 15 dias). Todas as amostras foram submetidas dois tratamentos de armazenamento, a 24°C e a -20°C. A melhor qualidade do DNA bacteriano extraído foi observada nas amostras armazenado a temperatura ambiente.

Palavras-chave: Micropropagação, extração de DNA, bactéria.

Apoio financeiro: Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste e Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações.

Introdução:

A cana-de-açúcar é uma gramínea, com alto valor econômico para a produção de Bioetanol (GOLDEMBERG, 2009). O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar, entretanto a ocorrência de doenças que podem acometer a cultura pode comprometer o aumento de produtividade das áreas plantadas (MARIN et al., 2016). Neste contexto, a cultura de tecidos vegetais é uma rota para obtenção de plantas livres de microrganismos que causem doenças à cana-de-açúcar, tendo destaque a técnica de micropropagação (SNYMAN et al., 2011). Esta técnica consiste numa clonagem *in vitro* capaz de gerar mudas fitossanitariamente seguras e com alta qualidade agrícola (ANIS; AHMAD, 2016).

O raquitismo-soqueira é uma doença

da cana-de-açúcar causada pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), com sintomas semelhantes aos de outras doenças, o que dificulta seu diagnóstico visual (TIWARI et al., 2012). Ao mesmo tempo, a bactéria é fastidiosa o que dificulta a diagnose por isolamento, e a Lxx ainda pode infectar a planta de forma latente quando a planta está em condições ideais de cultivo, como durante a micropropagação. Este comportamento dificulta a detecção de mudas limpas da presença da Lxx, exigindo uso de técnicas como a detecção molecular por PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (HOULLOU et al., 2015).

A PCR é uma técnica que consiste na amplificação de regiões específicas do DNA em um genoma, e pode ser utilizada para detecção mesmo quando apenas traços do DNA alvo estão presentes na amostra (GARIBYAN; AVASHIA, 2013). Para uso na PCR o DNA alvo precisa ser extraído das amostras com o maior grau de integridade e pureza possível (CHENG et al., 1995). Deste modo, a extração do DNA bacteriano, a partir de amostras de cana-de-açúcar é uma etapa crucial para detecção da bactéria Lxx no material micropropagado. Em uma rotina de propagação em larga escala, o grande volume de amostras a ser avaliado inviabiliza a execução da extração de DNA imediatamente após a coleta. O armazenamento de amostras vegetais a fim de preservar o DNA presente nas mesmas, pode ser feito através de agentes químicos, como os tampões conservantes, e físicos, como resfriamento (NAGY, 2010).

O presente trabalho tem por objetivo comparar a integridade do DNA bacteriano extraído a partir de amostras de folhas de cana-de-açúcar micropropagada, após tempos e condições de armazenagem diferentes.

Metodologia:

Foram coletadas amostras de folhas de cana-de-açúcar micropropagada de um mesmo pote com 45 dias de cultivo em meio

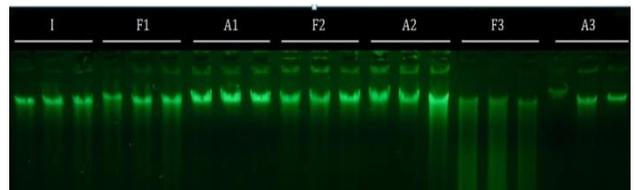
de cultura MS de multiplicação. Foram pesadas triplicatas das amostras em microtubos de polipropileno contendo 100mg de material vegetal. As triplicatas foram armazenadas em dois tratamentos, sendo eles em temperatura ambiente (24°C) e em Freezer (-20°C). Foram avaliados os efeitos do armazenamento sobre as amostras através de extrações que foram executadas nos dois tratamentos delimitados com 24 horas, uma semana e duas semanas após a coleta. Além das extrações dos tratamentos, foi estabelecida uma extração de controle imediata após a coleta para comparação frente às amostras armazenadas.

As extrações foram executadas com uma pré-etape de maceração para rompimento mecânico dos tecidos vegetais a fim de permitir a ação dos reagentes de extração sobre as células bacterianas contidas nestes tecidos. As amostras foram congeladas por 2 min em nitrogênio líquido e maceradas por 5 minutos utilizando o macerador automático Tissue Lyser (Qiagen®). A extração de DNA foi realizada através do kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit da Promega®, segundo protocolo do fabricante, sendo utilizada a enzima lítica Lisozima (Ludwig Biotec.) para degradação da camada de peptidoglicano externa à membrana celular de células bacterianas Gram positivas, que é o caso da *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Ao término de cada extração, foi obtido um volume final de 100 µL de DNA eluído para cada amostra.

A verificação de eficácia da extração e qualidade do material extraído foi avaliada por meio de eletroforese em gel de Agarose (Avati -Biometrix) a 1% (p/v) a 100V por 30 minutos, em tampão de corrida 1X TBE (pH 8,0). Cada amostra teve 5µL de seu DNA eluído misturados a 1µL do corante Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia) e mais 1µL de 6X Tampão de amostra (Sinapse Inc.), para então seguirem à deposição nos poços e corrida no gel. Foi observada a ocorrência e a definição de bandas no gel sob Transiluminador Ultra-Violeta (Loccus®) para avaliação da integridade do DNA extraído, sendo considerada indicadora de integridade a formação de bandas bem definidas e com pouco ou nenhum rastro no gel de corrida. Foram corridos géis de cada extração separadamente para conferência de efetividade de cada processo, e ao término das avaliações, um único gel contendo todas as amostras extraídas foi corrido sob as mesmas condições previamente descritas, sendo este último gel fotografado através do sistema de foto-documentação L-PIX HE (Loccus Biotecnologia).

Resultados e Discussão:

Através da eletroforese das amostras (Figura 1), é possível verificar que as amostras mantidas a 24°C apresentaram menos rastros indicativos de degradação, e, portanto forneceram DNA com melhor integridade do que as congeladas. Uma vez que as amostras não receberam crioprotetores, a formação de cristais de gelo no citoplasma bacteriano pode ter causado injúrias aos componentes celulares (PRAKASH; NIMONKAR; SHOUCHE, 2013), expondo o DNA a



processos de degradação.

Figura 1. Eletroforese das extrações. (I) Imediata; (F1) congelada e (A1) temperatura ambiente após 24 h; (F2) congelada e (A2) temperatura ambiente após 1 semana; (F3) congelada e (A3) temperatura ambiente após 2 semanas.

Conclusões:

O armazenamento de amostras de cana-de-açúcar em temperatura ambiente permitiu a obtenção de DNA bacteriano com integridade superior à observada nas amostras congeladas.

Referências bibliográficas

- GOLDEMBERG, J. Biomass and energy. crop area in Brazil. **BioScience**, v. 66, n. **Química nova**, v. 32, n. 3, p. 582-587, 2009.
- MARIN, F. R. et al. Prospects for increasing sugarcane and bioethanol production on existing 4, p. 307-316, 2016.
- SNYMAN, S. J. et al. Applications of in vitro culture systems for commercial sugarcane production and improvement. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, n. 2, p. 234-249, 2011.
- ANIS, M.; AHMAD, N. **Plant Tissue Culture: A Journey from Research to Commercialization**. In: *Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement*. Springer Singapore, 2016. p. 3-13.

TIWARI, A. K. et al. Ratoon stunting disease (*Leifsonia xyli*) of sugarcane. **Plant Knowledge Journal**, v. 1, n. 1, p. 20, 2012.

HOULLOU, L. M. et al. Electrotherapy treatment for ratoon stunting disease (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) elimination in sugarcane micropropagation. **International Journal of Current Research**, v.7, n. 9, p. 19888-19892, 2015.

GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. Polymerase chain reaction. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 3, p. 1-4, 2013.

CHENG, S. et al. Template integrity is essential for PCR amplification of 20-to 30-kb sequences from genomic DNA. **Genome Research**, v. 4, n. 5, p. 294-298, 1995.

NAGY, Z. T. A hands-on overview of tissue preservation methods for molecular genetic analyses. **Organisms Diversity & Evolution**, v. 10, n. 1, p. 91-105, 2010.

PRAKASH, O.; NIMONKAR, Y.; SHOUICHE, Y. S. Practice and prospects of microbial preservation. **FEMS microbiology letters**, v. 339, n. 1, p. 1-9, 2013.