



COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

*Bruna Rafaela Barbieri*¹, *Mariana Gomes Brescansin*², *Larissa Siqueira Soares*¹, *Danielle Sayuri Yoshida Nanami*²,
*Carlos Alexandre Zanutto*³, *William Mário de Carvalho Nunes*⁴

RESUMO: Responsável por ocasionar perdas de até 30% da produtividade, o raquitismo-da-soqueira causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, é uma das doenças mais importantes para a cultura da cana-de-açúcar. O objetivo deste trabalho foi comparar dois métodos de extração de DNA da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* afim de formular uma resposta rápida sobre a presença da doença em áreas de cana-de-açúcar, visto que a mesma não apresenta sintomas típicos. Foram coletadas amostras de cana-de-açúcar de áreas sabidamente infestadas com a doença. Foi coletado o colmo mais velho da touceira a ser amostrada e a seiva foi extraída com o auxílio de um espremedor de limão. A extração do DNA total foi realizada a partir do caldo extraído e seguindo protocolo específico para a bactéria elaborado por Gao et al. (2008) com modificações, e também de acordo com protocolo CTAB adaptado e modificado de Murray e Thompson (1980), que é um método comum de extração de DNA. Após a extração as amostras foram submetidas à amplificação por meio de PCR convencional e o produto analisado em eletroforese com gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. O produto da amplificação foi revelado em fotocomentador equipado com luz ultravioleta e filtro de brometo. O experimento foi repetido três vezes e o resultado encontrado foi o mesmo em todas as repetições. Os resultados foram analisados com base na presença de bandas no gel e indicaram que a extração e amplificação é mais eficaz quando se faz uso de protocolo geral, como o CTAB, do que quando se utiliza protocolo específico para a bactéria em estudo. Desta forma, admite-se que o método de extração CTAB é o método mais eficaz para extrair o DNA da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, embora não seja específico para a mesma.

PALAVRAS-CHAVE: bactéria; PCR; raquitismo-da-soqueira; cana-de-açúcar.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar sendo que na safra 2014/15 apresentou uma área cultivada de aproximadamente 9 milhões de hectares. Sua produção está concentrada em São Paulo que representa 52% do total e o Paraná contribui com 7,1% do total (Conab, 2015).

A cultura da cana-de-açúcar é vulnerável a diversas doenças, dentre elas dá-se destaque ao raquitismo da soqueira (RDS do inglês – Ratoon Stunting Disease), cujo agente causal é uma bactéria denominada *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. O RDS é uma das doenças de maior importância na cultura, pois os prejuízos podem chegar a reduzir a produtividade em até 30%. Em todas as regiões em que se tem a cultura da cana-de-açúcar, acredita-se que a doença esteja também (DAVIS et al., 1984).

A ausência de sintomas típicos da doença torna a detecção da mesma impossível de ser visualizada a olho nu, sendo necessário análises laboratoriais para a confirmação da presença da bactéria na área, seja através de técnicas moleculares (PCR) e/ou sorológicas (Dot blot, ELISA etc.) (PAN et al., 1998).

O presente trabalho teve como objetivo comparar dois métodos de extração de DNA de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, sendo um método específico para a bactéria e outro comum à maioria dos organismos. A necessidade desse estudo foi vista, pois na literatura não há descrição detalhada sobre como se faz uma extração de DNA desta bactéria, sendo que a mesma só é confirmada através de análises laboratoriais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

¹ Mestrandas do Curso de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada NBA/UEM, Maringá - PR. Bolsista CNPq. brunarbarbieri91@hotmail.com

² Doutorandas do Curso de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada NBA/UEM, Maringá - PR. Bolsistas CNPq/CAPEs. mari.brescansin@gmail.com

³ Eng. Agrônomo, Dr. da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada NBA/UEM, Maringá - PR. cazanutto@uem.br

⁴ Orientador, Professor Doutor do Curso de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada NBA/UEM. Bolsista Produtividade CNPq. wmcnunes@uem.br



Amostras positivas para a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* foram coletadas de colmos de cana-de-açúcar da variedade Java em propriedade particular. Após a coleta, os colmos foram encaminhados ao laboratório do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada da Universidade Estadual de Maringá (NBA-UEM), higienizados e retirado dos internos basais a seiva do xilema com o auxílio de um espremedor de citrinos. Um total de 10 amostras foram utilizadas para o teste. Essa seiva foi submetida à extração de DNA, sendo que 5 amostras foram extraído DNA por meio de protocolo específico para a bactéria descrito por Gao et al. (2008) com modificações e 5 amostras foram extraído DNA de acordo com protocolo CTAB adaptado e modificado de Murray e Thompson (1980). Após a extração, as amostras foram submetidas à amplificação por meio de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) convencional de acordo com Pan et al. (1998).

A extração de DNA de acordo com protocolo específico com modificações procedeu-se da seguinte forma: Uma alíquota de 1,5mL de seiva foi adicionada em micro tubo de 2,0mL. Procedeu-se uma centrifugação a 3000rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo micro tubo. Uma centrifugação a 12000rpm por 10 minutos foi realizada e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuscitado em 300µL de água ultrapura. Adicionou-se 600µL de tampão CTAB 2% preaquecido a 65°C. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por uma hora sendo que a cada 20 minutos era realizada uma mistura. Após esse período adicionou-se 600µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e misturou invertendo os tubos 100 vezes. Após, as amostras foram centrifugadas a 12000rpm por 10 minutos, sendo que ao término da centrifugação recuperou-se aproximadamente 700µL do sobrenadante e o transferiu para um novo tubo adicionando 700µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) misturando e invertendo os tubos 100 vezes. Centrifugou-se as amostras novamente a 12000rpm por 10 minutos, recuperou-se aproximadamente 650µL do sobrenadante e transferiu para um novo tubo. O DNA foi precipitado com 450µL de etanol 100% gelado e as amostras incubadas a -20°C em overnight. Após esse período as amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 12000rpm por 10 minutos a 4°C. O pellet foi lavado duas vezes com 500µL de etanol 70% e centrifugado por 10 minutos a 12000rpm descartando o sobrenadante. O pellet foi seco com 500µL de etanol 100%, centrifugado a 12000rpm por 5 minutos, descartando o sobrenadante e deixando os tubos inclinados por 5 minutos. Após, o pellet foi ressuscitado em 30µL de água ultrapura e armazenado a -20°C para posterior amplificação.

O protocolo de extração CTAB adaptado e modificado procedeu-se da seguinte forma: Em cada micro tubo foi adicionado 400µL da amostra e 800µL de tampão de extração CTAB/Sarcosyl preparado minutos antes de iniciar o procedimento. As amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho-maria por 30 minutos a 60°C agitando a cada 10 minutos. Após retirar do banho, adicionou-se 800µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). As amostras foram agitadas e centrifugadas a 8000rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, aproximadamente 900µL do sobrenadante foi transferido para um novo micro tubo e misturou-se com 900µL de tampão de precipitação CTAB. As amostras foram deixadas a temperatura ambiente durante 30 minutos. Após submeteu-se a uma nova centrifugação a 11000rpm por 10 minutos descartando o sobrenadante. O sedimento foi dissolvido em 400µL de TE alto sal e incubado a 65°C até total dissolução. O DNA foi precipitado com 800µL de etanol absoluto gelado e incubado a -20°C em overnight. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 12000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 400µL de etanol 100% gelado e centrifugou-se a 12000rpm por 5 minutos. Após, os tubos ficaram inclinados por 5 minutos para secar o DNA. O pellet foi dissolvido em 50µL de TE 1/10 + RNase e mantido por 1 hora a 37°C. As amostras foram armazenadas a -20°C para posterior amplificação.

A amplificação das amostras se deu por meio de PCR convencional utilizando um termociclador. Todas as amostras foram submetidas a mesma amplificação. Um volume total de 25µl foi utilizado para a reação, sendo que 6µL correspondia ao DNA extraído e 19µL correspondia a 12µL de água destilada; 2,5µL de T10X PCR MgCl₂; 1,3µL de MgCl₂ 5mM; 1µL de DNTP; 1µL do primer LXX1; 1µL de primer LXX2; 0,4µL de Taq DNA polimerase. O amplicon foi obtido por reação da PCR com desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão final de 5 minutos a 72°C. O produto amplificado foi submetido a eletroforese com gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio juntamente com o marcador molecular (Ladder). Após a eletroforese o gel foi fotografado em fotodocumentador equipado com luz ultravioleta e filtro de brometo, onde foi possível verificar a presença ou ausência de bandas nas amostras.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados foram analisados com base na presença ou ausência de banda no gel. Foram consideradas amostras positivas aquelas que apresentaram banda na altura de 500pb aproximadamente e negativas aquelas que não apresentaram altura de banda.

Todas as 10 amostras eram controle positivo para a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. As amostras 1 a 5 são as amostras cujo DNA total foi extraído de acordo com o protocolo CTAB adaptado e modificado de Murray e Thompson (1980), o qual não é específico para a extração de DNA desta bactéria. Porém se mostrou mais eficiente que o protocolo específico descrito por Gao et al. (2008), representado pelas amostras 6 a 10 que mesmo sendo padrão positivo não demonstraram presença de banda (Figura 1). Esses resultados indicam que o protocolo específico para a bactéria não extrai de forma eficiente o DNA da mesma, e o protocolo CTAB mesmo



não sendo específico se mostrou mais eficiente, pois foi possível verificar a presença de banda no gel analisado. Li et al. (2014) analisou 1270 amostras contaminadas com raquitismo-da-soqueira e fazendo uso de protocolo CTAB e das mesmas condições de amplificação obteve cerca de 75% de resultados positivos em suas análises. Em seu trabalho, Dias (2012) avaliou cinco métodos de extração de DNA, dentre eles o descrito por Gao et al. (2008) e verificou que nenhum dos métodos avaliados se equiparou a eficácia da extração pelo método CTAB que foi utilizado como padrão.

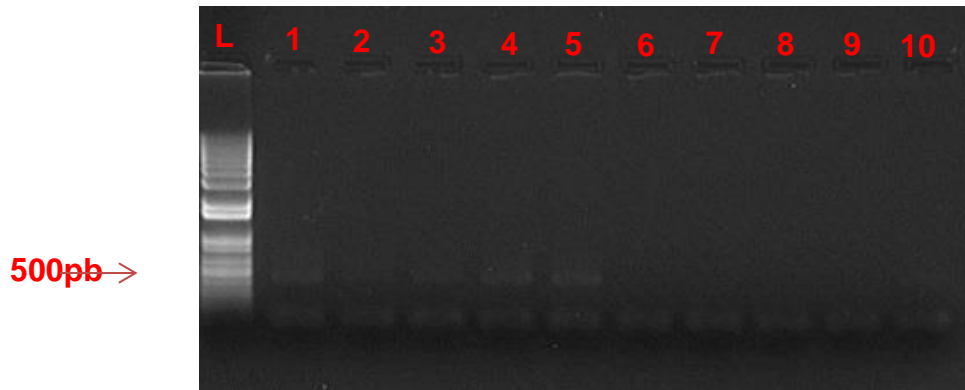


Figura 1. Produtos da amplificação por PCR do DNA da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, revelados em gel de agarose 1%. Amostras 1 a 5 são positivas; 6 a 10 negativas e L marcador de DNA (Ladder).

Fonte: Barbieri, 2015.

4 CONCLUSÃO

A extração realizada de acordo com protocolo específico não se mostrou eficiente, uma vez que não houve produto de amplificação em nenhuma amostra analisada, sendo que todas as amostras eram padrão positivo para a bactéria. No entanto o protocolo CTAB que é um protocolo inespecífico para a bactéria se mostrou altamente eficiente, uma vez que apresentou amplificação em todas as amostras analisadas. Porém são necessário estudos futuros comparando outros métodos de extração, buscando sempre a eficiência, agilidade e reprodutibilidade do mesmo.

REFERÊNCIAS

- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. (2015). **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_04_13_08_45_51_boletim_cana_portugues_-_4o_lev_-_14-15.pdf>. Acesso em: 10 de agosto de 2015.
- DAVIS, M. J.; GILLASPIE, A. G.; VIDAVER, A. K.; HARRIS, R. W. *Clavibacter*, a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp.nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *Cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermudagrass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 107-117, 1984.
- DIAS, VANESSA DUARTE. **Otimização da detecção de raquitismo-da-soqueira e escaldadura das folhas em cana-de-açúcar utilizando PCR**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Goiás, 2012.
- GAO, S.-J.; PAN, Y.-B.; CHEN, R.-K; CHEN, P.-H.; ZHANG, H.; XU, L.-P. Quick detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* by PCR and nucleotide sequence analysis of PCR amplicons from Chinese *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* isolates. **Sugar Tech**. v.10, p.334-340, 2008.
- LI, W.-F.; SHEN, K.; HUANG, Y.-K.; WANG, X.-Y.; YIN, J.; LUO, Z.-M.; ZHANG, R.-Y.; SHAN, H.-L. Incidence of sugarcane ratoon stunting disease in the major cane-growing regions of China. **Crop Protection**. v.60, p.44-47, 2014.
- MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**. V.8, p.4321-4325, 1980.



PAN, Y.-B.; GRISHAM, M.P.; BURNER, D.M.; DAMANN JR, K.E.; WEI, Q. A polymerase Chain Reaction Protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the Causal Bacterium of Sugarcane Ratoon Stunting Disease. **Plant Disease**. v.82, p.285-290, 1998.