UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
MARIA FERNANDA POKOMAIER GONÇALVES

BIOLOGIA MOLECULAR ALIADA À AGRICULTURA: ATIVIDADES DESENVOLVIDAS EM UM LABORATÓRIO DE ANÁLISES GENÔMICAS E BIOTECNOLÓGICAS NO MUNICÍPIO DE TOLEDO/PR

Tubarão/SC
2022

MARIA FERNANDA POKOMAIER GONÇALVES

BIOLOGIA MOLECULAR ALIADA À AGRICULTURA: ATIVIDADES DESENVOLVIDAS EM UM LABORATÓRIO DE ANÁLISES GENÔMICAS E BIOTECNOLÓGICAS NO MUNICÍPIO DE TOLEDO/PR

Relatório de Estágio Técnico Profissional de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia da Universidade do Sul de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof. Maricelma Simiano Jung, Ms.

Tubarão/SC

2022

MARIA FERNANDA POKOMAIER GONÇALVES

BIOLOGIA MOLECULAR ALIADA À AGRICULTURA: ATIVIDADES DESENVOLVIDAS EM UM LABORATÓRIO DE ANÁLISES GENÔMICAS E BIOTECNOLÓGICAS NO MUNICÍPIO DE TOLEDO/PR

Relatório de Estágio Técnico Profissional de Conclusão de Curso foi julgado adequado à obtenção do título de Engenheiro Agrônomo e aprovado em sua forma final pelo Curso de Agronomia da Universidade do Sul de Santa Catarina.

Tubarão, 09 de junho de 2022.

Maricelma Simiano Jung, Ms.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Glacy Jaqueline da Silva, Dr.
LagBio – Análises Genômicas e Biotecnologia

Prof. Patrícia Menegaz de Farias, Dr.
Universidade do Sul de Santa Catarina

A todos que, com gestos singelos e honestos, contribuíram imensamente para minha formação pessoal, profissional e acadêmica...

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, àqueles que tiveram uma essencialidade inestimável e não mediram esforços durante toda minha graduação: *meus pais*. Não existem palavras que sejam suficientes para expressar a gratidão que tenho por vocês.

Aos demais familiares que prestaram apoio e estiveram comigo nesta caminhada, especialmente aos meus irmãos por estarem de prontidão para me ajudar nas adversidades.

Aos meus amigos de longa data que foram compreensíveis e tolerantes em momentos que, por motivos maiores, estive ausente.

Às minhas colegas e amigas de graduação - Luana Gonçalves Felipe, Randriele Souza e Yasmin Gauer Guedes - por todos os anos que estivemos juntas e unidas para vencer os cansativos semestres do curso e por todas as lembranças cômicas que acumulamos no decorrer de mais de cinco anos de faculdade.

Aos professores que se dedicaram na árdua tarefa de formar profissionais éticos e qualificados, que se reinventaram em tempos de pandemia e que transferiram seus conhecimentos para meu progresso pessoal e profissional, especialmente à professora Patrícia Menegaz de Farias por me instruir e incentivar durante a graduação.

À professora Maricelma por me orientar e contribuir para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas e amigos que fiz nas jornadas de laboratórios da universidade (Laboratório de Entomologia e Laboratório de Produção Vegetal), por toda parceria e conhecimento que conquistei junto a vocês.

À equipe da empresa LagBio que abriu as portas para eu realizar meu Estágio Técnico Profissional em Agronomia, pela confiança depositada, pelas partilhas de informações, pelos conselhos cedidos, pelos momentos de diversão e, principalmente, por me fazer sentir “em casa” mesmo estando a quilômetros de distância do meu lar. Em especial à supervisora Glacy pelo acolhimento e aporte cedido do início ao fim.

Àqueles que conheci através das oportunidades que a Agronomia me proporcionou, pessoas que passaram por meu caminho e deixaram lembranças indescritíveis.

A todos vocês... meu sincero sentimento de gratidão. Muito obrigada!

“A ciência e a tecnologia, ligadas intimamente por uma aliança simbiótica, permeiam todas as dimensões das nossas vidas” (WILSON, 2015).

RESUMO

A biologia molecular é um campo interdisciplinar da biotecnologia. O princípio da BM (biologia molecular) foi impulsionado pela divergência entre pesquisadores das áreas de biofísica, genética e bioquímica em compreender e definir os mecanismos de expressão e transmissão da hereditariedade, bem como o arranjo das proteínas no interior das células, haja vista que as linhas de pesquisa da biologia molecular se baseiam na organização, estruturação e funcionamento do DNA de seres vivos. Assim, o Estágio Técnico Profissional em Agronomia teve por objetivo acompanhar as atividades desenvolvidas em um laboratório privado de análises genômicas e biotecnológicas, bem como auxiliar a execução de procedimentos laboratoriais e prestar apoio às ações realizadas no local. O desenvolvimento do estágio foi categorizado em etapas que consistiram em: execução de atividades práticas, revisão teórica sobre a temática abordada no estágio, redação, conclusão e apresentação oral do relatório de estágio. Em relação aos ambientes de realização das atividades, ocorreram em dois espaços: nas dependência do Laboratório e em ambiente externo, tal como em áreas experimentais situadas em propriedades de clientes. As ações executadas em laboratório tiveram como escopo análises de biologia molecular, dando ênfase à análise de PCR. Em ambiente extrínseco a atuação da acadêmica ocorreu através de visitas aos clientes e/ou parceiros, em áreas experimentais conduzidas pela empresa e eventos no qual a empresa esteve presente. Como conclusão, ao final do estágio, foram realizadas pela acadêmica 417 análises de PCR para identificar linhagens de trigo qualificadas à panificação, 96 análises de PCR para definir a diversidade de bactérias diazotróficas em nódulos de acácia-negra e 815 análises para quantificação de DNA extraído de sementes de trigo. Além disso, a realização do estágio proporcionou à acadêmica o enriquecimento de informações referentes aos campos de biologia molecular e biotecnologia, bem como a experimentação prática de análises laboratoriais não praticadas durante o período de graduação.

Palavras-chave: Gene. Reações de Polimerase em Cadeia. *Triticum aestivum*.

ABSTRACT

Molecular Biology is an interdisciplinary field of Biotechnology. The principle of BM (Molecular Biology) was driven by the divergence between researchers in the fields of biophysics, genetics and biochemistry in understanding and defining the mechanisms of expression and transmission of heredity, as well as the arrangement of proteins within cells, given the that the research lines of Molecular Biology are based on the organization, structuring and functioning of the DNA of living beings. Thus, the Professional Technical Internship in Agronomy aimed to monitor the activities carried out in a private laboratory for genomic and biotechnological analysis, as well as assisting in the execution of laboratory procedures and providing support for actions carried out on site. The development of the internship was categorized into stages that consisted of: execution of practical activities, theoretical review on the topic addressed in the internship, writing, conclusion and oral presentation of the internship report. In relation to the environments where the activities were carried out, they took place in two spaces: on the premises of the Laboratory and in an external environment, such as in experimental areas located on clients' properties. The actions performed in the laboratory had molecular biology analyzes as scope, emphasizing the PCR analysis. In an extrinsic environment, the academic performance took place through visits to customers and/or partners, in experimental areas conducted by the company and events in which the company was present. In conclusion, at the end of the internship, 417 PCR analyzes were carried out by the academician to identify wheat lines qualified for bread making, 96 PCR analyzes to define the diversity of diazotrophic bacteria in black wattle nodules and 815 analyzes to quantify DNA extracted from wheat seeds. In addition, the completion of the internship provided the academic with the enrichment of information regarding the fields of Molecular Biology and Biotechnology, as well as the practical experimentation of laboratory analyzes not practiced during the graduation period.

Keywords: Gene. Polymerase Chain Reactions. *Triticum aestivum*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento cronológico de atividades desenvolvidas no período de realização do Estágio Técnico Profissional em Agronomia em um laboratório privado de análises genômicas e biotecnológicas no município de Toledo, estado do Paraná. 27
Tabela 2 – Resultados obtidos a partir de reações de PCR formuladas com primer By8. 51
Tabela 3 - Resultados obtidos a partir de reações de PCR formuladas com primer α-Secalin. 52

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa de localização do Parque Tecnológico Biopark situado no município de Toledo, região oeste do estado do Paraná, sul do Brasil. 26
Figura 2 - Preparo de soluções estoques para extração de DNA da cultura do trigo: A – Soluto Tris em becker graduado (Phox®) com capacidade para 1000ml sobre um agitador magnético (Ethik Technology®); B - Adição de 70% do volume (700ml) de solvente (água destilada) requerido; C – Solução em agitação para homogeneização da solução. 29
Figura 3 - Preparo das soluções estoques para extração de DNA da cultura do trigo: A – Calibração do pHmetro (Gehaka®); B - Averiguação do potencial hidrogeniônico das soluções estoques; C – Complementação do volume de solvente para 1000ml após verificação de pH da solução. 29
Figura 4 - Maceração de sementes de trigo para extração de DNA: A – Seleção de sementes de trigo e adição de solução tampão; B – Processo de maceração de sementes de trigo em um cadinho; C – Produto da maceração de sementes de trigo. 31
Figura 5 - Maceração de sementes de trigo para extração de DNA: A – Sementes maceradas depositadas em microtubos com capacidade volumétrica de 2ml; B – Centrífuga em funcionamento (13.200 rpm durante 15 minutos) de acordo com protocolo de extração de DNA de sementes de trigo; C – Transferência do material sobrenadante para novos microtubos. ... 31
Figura 6 - Etapas conclusivas da extração de DNA do trigo: A – Microtubos (2ml) dispostos em bancada após a adição de isopropanol gelado; B – Centrífuga em atividade de acordo com protocolo para extração de DNA de trigo (13.200 rpm durante 10 minutos); C – Inversão dos microtubos em papel absorvente para secagem do subnadante. 32
Figura 7 - Preparação de gel de agarose: A – Reagente Agarose (Kasvi®); B – Solução tampão TAE diluído 50 vezes; C – Solução para formulação de gel de agarose: 3g de Agarose com adição de 200ml de solução tampão em um frasco de Erlenmeyer. 34
Figura 8 - Preparo de reações de PCR: A e B – Pipetagem dos componentes da reação de PCR em microtubos contendo 0,2µl de DNA de trigo; C – Microtubos dispostos no interior do termociclador; D – Vista panorâmica do termociclador. 36
Figura 9 - Ciclos do termociclador conforme finalidade das análises de PCR: A Programação para identificação de linhagens qualificadas à panificação; B – Ciclos para identificação de linhagens qualificadas à panificação em funcionamento. 37
Figura 10 - Etapas sucessoras aos ciclos do termociclador: A – adição de corante (azul de bromofenol); B – Transferência das amostras para os poços do gel de agarose; C – Eletroforese

em funcionamento: fontes elétricas conectadas a cuba para transferência de corrente elétrica (200v). 39
Figura 11 - Instruções para utilização do marcador de peso molecular 1Kb: padrão para interpretação e comparação do tamanho de banda (à direita). 39
Figura 12 - Leitura e interpretação das análises de PCR: A e B – Linhagens de trigo com presença e ausência de gene responsável pela qualidade de panificação: reações preparadas com primer By8 (imagem B editada); C e D – Linhagens de trigo com presença e ausência de gene responsável pela qualidade de panificação: reações preparadas com primer α-Secalin (imagem D editada). 40
Figura 13 - Leitura das análises de PCR em bactérias diazotróficas coletadas em nódulos de acácia-negra. 41
Figura 14 - Resultado da quantificação de DNA extraído de sementes de trigo: à direita – amostras com presença de DNA, à esquerda – amostras com ausência de DNA. 42
Figura 15 - Extração de prolina: A – Material vegetal (folha) de soja e ácido sulfosalicílico 3%; B – Material vegetal macerado; C – Produto da maceração de folhas de soja com adição de ácido sulfosalicílico (volume completado para 25ml); D - Vórtex utilizado para homogeneização das amostras. 43
Figura 16 - Agitação do material extraído: A – Centrífuga programada para rotacionar 5.000 rpm durante sete minutos; B – Tubos alocados no interior da centrífuga; C – Sobrenadante, resultante da extração de prolina, transferido para novos tubos de Falcon. 44
Figura 17 - Reagente utilizados na determinação de prolina: A – Ninhidrina ácida; B – Ácido acético glacial. Aquecimento das amostras em banho-maria: C – Amostras submersas em água fervente; D – Equipamento para banho-maria a aproximadamente 100ºC. 45
Figura 18 - Conclusão da determinação de prolina: A -Tolueno e B – Ácido sulfosalicílico 3% adicionados nas amostras; C – Amostras arranjadas em placas para realizar a leitura; D – Equipamento Elisa para leitura das amostras. 46
Figura 199 - Vista frontal da Universidade do Oeste do Paraná – Unioeste, localizada em Marechal Cândido Rondon, região oeste do Paraná. 47
Figura 20 - Show Rural Coopavel 2022: A e B – máquinas agrícolas em exposição; C – Vista panorâmica do evento; D – Slogan Show Rural Coopavel 2022. 49
Figura 21 - Estande dos expositores Show Rural Coopavel 2022: A – Empresa Bayer; B – Empresa Biotrigo; C – Embrapa. 49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **13**
1.1 OBJETIVOS 15
1.1.1 Objetivo geral **15**
1.1.1.1 Objetivos específicos 15
2 JUSTIFICATIVA DO ESTÁGIO **16**
3 IDENTIFICAÇÃO DO ESTÁGIO **17**
3.1 DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESTÁGIO 17
3.2 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ATUAÇÃO DO ESTÁGIO 17
3.3 DESCRIÇÃO DA ESTAGIÁRIA 17
4 REFERENCIAL TEÓRICO **18**
4.1 ADVENTO DA BIOTECNOLOGIA 18
4.2 PILARES DA BIOTECNOLOGIA: BIOLOGIA MOLECULAR 19
4.3 FERRAMENTAS DA BIOLOGIA MOLECULAR: REAÇÃO DE PCR 21
4.4 QUALIDADE TECNOLÓGICA DO TRIGO 23
5 METODOLOGIA **26**
6 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS **28**
6.1 ATIVIDADES INTERNAS 28
6.1.1 Preparo de soluções para extração de DNA **28**
6.1.2 Extração de DNA de trigo (*Triticum* sp.) **30**
6.1.3 Preparo de gel de agarose **33**
6.1.4 Análise de PCR: preparo de reações e interpretação de resultados **34**
6.1.5 Quantificação de DNA de trigo **41**
6.1.6 Determinação de aminoácido prolina **43**
6.2 ATIVIDADES EXTERNAS 47
6.2.1 Presença em apresentação de tese de doutorado **47**
6.2.2 Visitação de uma indústria de fertilizantes organominerais bioativos **48**
6.2.3 Participação do Show Rural COOPAVEL **49**
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO **51**
8 CONCLUSÃO **54**
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS **55**
REFERÊNCIAS **56**

APÊNDICE A - Protocolo simplificado para preparo de soluções utilizadas no procedimento de extração de DNA genômico de trigo (*Triticum* spp.).....61
APÊNDICE B – Caracterização das reações de PCR para identificação de linhagens de trigo qualificadas à panificação: reações preparadas com reagente Master Mix. 62
APÊNDICE C – Caracterização das reações de PCR para identificação de linhagens de trigo qualificadas à panificação: reações preparadas com Taq polimerase. 63
APÊNDICE D – Caracterização das reações de PCR para identificação de diversidade de bactérias diazotróficas presentes em nódulos de acácia-negra. 64

1 INTRODUÇÃO

Embora a biotecnologia seja considerada como uma tecnologia contemporânea, alguns episódios, como a descoberta de processos fermentativos para produção de pão e cerveja, evidenciam que sua origem é datada há mais de seis mil anos (OLIVEIRA; FERREIRA, 2020). O surgimento desta ciência é atrelado, principalmente, aos adventos da medicina humana, especialmente com o desenvolvimento do antibiótico penicillium, no entanto, a utilização da mesma na agricultura vem apresentando crescimento constante devido às contribuições no aumento de produtividade dos alimentos, na atenuação de danos ao meio ambiente (VARGAS *et al*., 2018) e na redução de custos de produção (FERREIRA *et al.*, 2020).

Neste cenário de utilização de princípios biotecnológicos para o desenvolvimento agrícola, Carrer *et al*. (2010) constataram que estratégias elaboradas com embasamento na biotecnologia atenuarão as três grandes crises socioambientais previstas para 2050: redução no número de reservas de petróleo, escassez de água potável para consumo humano e carência de alimentos para o abastecimento da população; reflexo do acréscimo populacional de dois bilhões de pessoas projetado para o referente ano (NAÇÕES UNIDAS BRASIL, 2019). Em adição, Yassitepe *et al*. (2020) enfatizam que ferramentas de biotecnologia, tais como marcadores moleculares, edição gênica, transgenia e microbioma e técnicas de fenotipagem, são essenciais para acelerar a disponibilização de genótipos que minimizam os impactos gerados pelas crises supracitadas.

Partindo deste contexto, a biologia molecular se apresenta como um campo interdisciplinar da biotecnologia. O princípio da BM (biologia molecular) foi impulsionado pela divergência entre pesquisadores das áreas de biofísica, genética e bioquímica em compreender e definir os mecanismos de expressão e transmissão da hereditariedade, bem como o arranjo das proteínas no interior das células, haja vista que as linhas de pesquisa da biologia molecular se baseiam na organização, estruturação e funcionamento do DNA de seres vivos, assim como os processos celulares (SILVA; COSTA, 2018).

Por sua vez, o ácido desoxirribonucleico (DNA) é formado por monômeros denominados de nucleotídeos. Os nucleotídeos são constituídos por três tipos de moléculas: um fosfato, um açúcar (desoxirribose) e uma base nitrogenada: purina (adenina e guanina) e pirimidinas (timina e citosina). Quando unidos, os monômeros formam macromoléculas designada como polímero biológico (HEPP; NONOHAY, 2016). Segundo Naoum (2011), um filamento de DNA estendido pode apresentar aproximadamente dois metros de comprimento; considerando a grandeza de uma molécula de DNA, bem como sua baixa quantidade na maioria dos tecidos

vivos (VIEIRA, 2022) as pesquisas com pretensão de compreender o funcionamento deste ácido nucleico são limitadas devido à dificuldade de se analisar um filamento completo de DNA.

Nessa conjuntura, após o surgimento da biologia molecular algumas técnicas foram desenvolvidas para dar suporte às pesquisas desenvolvidas nesse campo da ciência, entre elas a PCR. A reação em cadeia de polimerase (PCR) tem sido empregada com a finalidade de amplificar e multiplicar, *in vitro*, regiões específicas do genoma de organismos, quaisquer que sejam, permitindo estudos que sequenciem moléculas de DNA e analisem a diversidade genética de populações (OLIVEIRA *et al*., 2007).

No setor agrícola, vários métodos de pesquisa foram favorecidos a partir da técnica de PCR, entre eles, o de marcadores moleculares de plantas. Este método permite mapear rapidamente as diferenças na sequência de bases do DNA possibilitando identificar características únicas em cada genótipo favorecendo o desenvolvimento de novas variedades de plantas, uma vez que a técnica de marcadores moleculares amplificados a partir de uma análise de PCR proporciona uma redução de até dois anos em programas de melhoramento genético (CALVO, 1998).

Em adição, a otimização dos programas de melhoramento genético de plantas decorrente do delineamento de técnicas oriundas da biologia molecular resultou em avanços na agricultura com o desenvolvimento de cultivares superiores em produtividade, resistentes a pragas e adaptadas a diversos ambientes (GUIMARÃES, 2004). Além disso, a amplificação de DNA beneficia setores secundários do ramo agrícola como, por exemplo, o vitivinícola. Em 2017, o Brasil ocupou a 14ª colocação no ranking mundial de produção de vinhos; tendo em vista a relevância do setor de produção de vinhos no país, a identificação de leveduras responsáveis pelo processo de fermentação alcoólica, para posteriormente incorporá-las no processo, pode ser realizada com o auxílio da técnica de PCR (ROMPKOVSKI, 2019).

Outra contribuição desta técnica molecular para o desenvolvimento da cadeia agrícola brasileira está na aplicação da PCR para o diagnóstico de agentes patogênicos a bovinos (HAAS; TORRES, 2016), auxiliando na correta identificação de microrganismos para se obter sucesso no tratamento de enfermidades de ruminantes.

Partindo do exposto, ressalta-se a relevância da aplicação da técnica de PCR para a amplificação e multiplicação de regiões específicas de DNA, tanto de animais quanto de plantas, para o progresso da agricultura mundial.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Acompanhar as atividades desenvolvidas em um laboratório privado de análises genômicas e biotecnológicas – LagBio, localizado no município de Toledo, região oeste do estado do Paraná.

1.1.1.1 Objetivos específicos

- Auxiliar na execução de procedimentos laboratoriais e prestar apoio às ações realizadas na empresa;
- Ter ciência das linhas de pesquisa e dos serviços fornecidos pela LagBio;
- Adquirir embasamento teórico sobre biotecnologia dando ênfase às pesquisas e serviços realizados no laboratório;
- Realizar treinamento sobre a manipulação dos instrumentos e equipamentos laboratoriais;
- Compreender e praticar as análises de biologia molecular desenvolvidas no laboratório, com ênfase em análises de PCR;
- Acompanhar visitas externas realizadas aos clientes, parceiros, áreas experimentais e participação em eventos.

2 JUSTIFICATIVA DO ESTÁGIO

A ampla área de atuação profissional de um engenheiro (a) agrônomo (a) proposta por academias de ensino através do plano curricular de curso, estritamente na Universidade do Sul de Santa Catarina – Unisul, campus Tubarão, sul de Santa Catarina, é qualificada por apresentar caráter diversificado proporcionando aos acadêmicos do curso de Agronomia um cenário optativo frente à carreira profissional. Partindo deste contexto, a grade curricular do curso de Bacharel em Agronomia possui a unidade de aprendizagem (UA) de Estágio Técnico Profissional em Agronomia, por meio da qual os estudantes podem participar de atividades externas ao ambiente da universidade. A significância desta fase está atrelada à autonomia que o acadêmico possui para direcionar a realização do estágio, conforme suas preferências e perfil profissional, oportunizando-o de seguir carreira posteriormente à conclusão do estágio e da graduação.

A carga horária de 300 horas atribuída à UA de Estágio Técnico Profissional permite aos estudantes vincular os conceitos teóricos com a prática, uma vez que as informações compartilhadas em ambiente universitário são engrandecidas através do convívio com profissionais que atuam no mercado de trabalho.

Neste cenário, o estágio técnico, norteador deste atual documento de Relatório de Estágio, foi desenvolvido em um laboratório localizado na região oeste do estado do Paraná, situado no município de Toledo, obtendo como viés, sobretudo, a área de conhecimento em biologia molecular aplicada à agricultura. A integração entre pesquisa e prestação de serviços resultou em inovação no Laboratório LagBio. No setor privado brasileiro a empresa é pioneira em análises metagenômicas, além de possuir em seu portifólio análises de PCR que auxiliam o sequenciamento genético de microrganismos e vegetais. As técnicas utilizadas na empresa vêm conquistando espaço no cenário do agronegócio brasileiro, visto que o crescimento e modernização do setor agrícola está atrelado às ferramentas tecnológicas e de precisão, resultando em êxito na oferta de produtos agropecuários conforme a demanda carecida pelo mercado consumidor global. Ainda, salienta-se a significância da realização do estágio no ramo de pesquisa em biotecnologia uma vez que o período que foi dedicado às atividades laboratoriais e revisão de literatura resultaram no aprimoramento de informações e no desenvolvimento de habilidades inéditas à estudante.

Diante o exposto, justificou-se a realização do estágio para a formação acadêmica e profissional, além da experiência pessoal da acadêmica, visto que a rede de relacionamento é amplificada, novos conhecimentos são adquiridos ou otimizados e a experiência obtida nesta fase é acrescentada no currículo profissional.

3 IDENTIFICAÇÃO DO ESTÁGIO

3.1 DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESTÁGIO

Nome fantasia: LagBio – Análises Genômicas e Biotecnologia
Ramo da atividade: Laboratório de análises genômicas e biotecnologia
Endereço: Rodovia PR 182, KM 320/321 - Biopark, sala 212
Município: Toledo
Estado: Paraná
Contato: contato@lagbio.com.br
CNPJ: 36.988.138/0001-98
Responsável legal: Glacy Jaqueline da Silva
Seguradora do estágio: 02.102.498/0001-29 - Metropolitan Life Seguros e Previdência

3.2 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ATUAÇÃO DO ESTÁGIO

Através da realização do estágio a acadêmica atuou na área de pesquisa atrelada à prestação de serviços, essencialmente aos produtores rurais, a partir do fornecimento de análises genômicas e biotecnológicas de solos, plantas e bioinsumos. Para tanto, a empresa LagBio, na qual foi realizado o estágio, mantém fito em análises que sequenciam geneticamente amostras edáficas e vegetais a fim de identificar microrganismos patogênicos e/ou benéficos ou definir molecularmente as características genômicas de uma espécie, conforme interesse do cliente.

3.3 DESCRIÇÃO DA ESTAGIÁRIA

Identificação: Maria Fernanda Pokomaier Gonçalves
Nome do campus: Universidade do Sul de Santa Catarina - Unisul
Curso: Agronomia – Bacharel
Turno: Noturno
Semestre: 10º
Matrícula: 1071716750

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 ADVENTO DA BIOTECNOLOGIA

A primeira definição do termo biotecnologia foi publicada em 1919 pelo engenheiro agrícola Karl Ereky como sendo “todas as linhas de trabalho, cujos produtos eram produzidos a partir de matéria bruta com auxílio de organismos vivos” (VARGAS *et al*., 2018). De forma suscinta, altera-se os processos biológicos ocorridos em organismos com a finalidade de se obter novos produtos (FERRO *et al*., 2021). O advento da biotecnologia é embasado em princípios genéticos, bioquímicos, de biologia molecular e biologia celular. Além disso, o estabelecimento desta ciência contribuiu para o surgimento de técnicas atreladas à engenharia genética, aos marcadores moleculares e ao isolamento de genes (CALVO, 1998).

Na agricultura, a utilização das técnicas biotecnológicas é contemporânea; foi apenas em 1994 que a primeira planta geneticamente modificada foi lançada nos Estados Unidos da América: um tomate (Flavor-Savor®) que apresentava maior durabilidade nas prateleiras de comercialização, posteriormente pesquisas atreladas ao campo da biotecnologia obtiveram sucesso na obtenção de plantas resistentes a herbicidas, insetos e vírus, com características que postergam a maturação dos frutos e flores, cultivares que melhoram a qualidade do óleo ou resultam em novas cores às flores (NEPOMUCENO *et al*., 2007). Em 1996, iniciou-se estudos de biotecnologia com escopo nas culturas do milho, soja e algodão (CALVO, 1998).

Para Ferro *et al*. (2021), o marco divisório entre a biotecnologia clássica e a moderna ocorreu quando, em 1973, os geneticistas norte-americanos Herbert Boyer e Stanley Cohen transferiram um gene de um sapo para uma bactéria, possibilitando a alteração das características genéticas de um organismo vivo, sendo estes os princípios utilizados para a produção de espécies vegetais transgênicas. Segundo os mesmos autores, o processo de modificação genética de plantas é sustentado em seis etapas: I - identificação e isolamento do gene; II - transformação: inserção do gene no genoma da planta; III - seleção: processo de identificação das células que receberam os genes; IV - regeneração: obtenção da planta a partir da célula vegetal transformada; V - testes de biossegurança e VI - aprovação.

Segundo Nepomuceno *et al*. (2007), os principais benefícios adquiridos com o melhoramento genético de plantas, decorrido do aprimoramento de técnicas de biotecnologia, é a resistência a insetos e consequentemente a regressão na necessidade de utilização de inseticidas, bem como a obtenção de benefícios secundários, como: diminuição de uso de matéria-prima para produção de agrotóxicos, redução na quantidade de combustíveis utilizados para produzir,

distribuir e aplicar agroquímicos, bem como a atenuação no uso e descarte de embalagens de agrotóxicos. Em adição, a biotecnologia contribuiu para o desenvolvimento de processos e produtos tecnológicos que geram estratégias para conservação, caracterização e uso racional de recursos genéticos (BRAMMER *et al.*, 2021).

Neste contexto, para Carrer *et al*. (2010), o desenvolvimento de plantas tolerantes à seca a partir de técnicas biotecnológicas contribui para diminuir o consumo de água pela agricultura, haja vista a minimização da irrigação intensiva. Ainda, no aspecto de produção de alimentos, a biotecnologia ampara o aumento da produtividade através da aplicação do conhecimento das funções dos genes e do funcionamento molecular das células, possibilitando a transformação genética das espécies vegetais.

No campo das ciências agronômicas a biotecnologia é aplicada nas áreas de fruticultura zootecnia, fisiologia, fitotecnia e fitossanidade. Os principais resultados esperados estão relacionados com a resistência a pragas, a variabilidade genética, a expressão gênica e a transformação genética (SCHNEIDER, 2018).

Atualmente, as empresas de biotecnologia que desenvolvem pesquisas com escopo no agronegócio apresentam um amplo espectro de seguimentos trabalhados, tais como: culturas de significativo interesse econômico, plantas ornamentais, medicinais e florestais, bem como produtos agronômicos com a finalidade de bioinseticidas, biofertilizantes, inoculantes e micorrizas, além de estudos destinados ao melhoramento animal, com o objetivo de aumentar a produtividade e, principalmente, obter organismos com características superiores (BRAMMER *et al.*, 2021); trabalhos que resultaram na crescente utilização de biotecnologia agrícola e atualmente definem o Brasil como referência no cultivo de organismos beneficiados com a tecnologia: 26% da área global cultivada com culturas provindas da biotecnologia, essencialmente soja, algodão e milho, pertence ao país (FERRO *et al*., 2021).

Diante do contexto, entre as diversas áreas intrínsecas à biotecnologia, a biologia molecular é considerada a de maior relevância para os avanços biotecnológicos em decorrência das técnicas de investigações em escala molecular (CARRER *et al*., 2010).

4.2 PILARES DA BIOTECNOLOGIA: BIOLOGIA MOLECULAR

O campo da biologia molecular (BM) recebeu destaque a partir do fim da Segunda Guerra Mundial, ao término do século XX, quando as áreas do conhecimento embasadas na utilização intensiva de tecnologias receberam amparo pelos governos democráticos no ocidente. Até então, o termo havia sido utilizado oficialmente apenas em 1938 no Relatório Anual da

Fundação Rockefeller, redigido pelo diretor da divisão de “Ciências Naturais” da fundação Dr. Warren Weaver, para informar aos membros dirigentes da instituição sobre a potencialidade da BM como um novo campo científico (SILVA; COSTA, 2018).

O evento mais expressivo no campo da BM foi a idealização do modelo de “Dupla-Hélice” da estrutura do DNA descrito em 1953 pelo biólogo norte-americano James Watson e pelo físico inglês Francis Crick; o trabalho publicado na revista Nature resultou em inúmeras pesquisas com escopo em biologia molecular da célula (CARRER *et al*., 2010; SILVA; COSTA, 2018).

As descobertas resultaram no conhecimento da molécula de DNA que, de forma concisa, consiste em uma estrutura de duas fitas ligadas e pareadas entre si em forma de espiral. Anexas às fitas estão as substâncias que compõem o código genético, definidas como bases nitrogenadas (adenina, citosina, timina e guanina). O seguimento dessas bases é específico para cada gene, o que resulta na diferenciação genética dos organismos vivos (CALVO, 1998).

Até os anos de 1940, acreditava-se que as atividades que ocorriam no interior das células eram responsáveis por transmitir as informações genéticas entre as gerações, bem como estabelecer a habilidade de adaptação dos seres vivos ao meio ambiente. Após o surgimento da BM os conceitos sobre hereditariedade deduziram que o código genético era transmitido a nível da estrutura do DNA dos organismos, sendo assim, a célula deixou de ser considerada como uma unidade elementar da vida e passou a ser vista como um ecossistema (SILVA; COSTA, 2018). Visto isso, da biologia molecular descende três importantes ramos para o melhoramento genético de plantas, resultantes dos avanços da biotecnologia: a genômica, a transgenia e os marcadores moleculares. A transgenia é uma ferramenta relevante para o melhoramento genético tradicional, tendo em consideração que a transgenia ultrapassa as barreias de cruzamento entre diferentes espécies e acelera o processo de seleção de plantas. A genômica busca compreender a organização dos genes presentes no interior do genoma e o funcionamento da informação genética (CARRER *et al*., 2010). Já os marcadores moleculares são características de DNA herdados geneticamente que diferenciam dois ou mais indivíduos (SCHNEIDER *et al.*, 2018).

Um dos benefícios desta técnica é identificar, de forma ágil, diferenças na sequência de bases do DNA das plantas, diminuindo o período para obtenção de um organismo geneticamente modificado, tendo em vista que o melhorista seleciona apenas as variedades que apresentam o gene de interesse (CALVO, 1998).

4.3 FERRAMENTAS DA BIOLOGIA MOLECULAR: REAÇÃO DE PCR

Um grande marco para o campo da biologia molecular foi o registro da análise de PCR. Suscintamente, a técnica de PCR (polymerase chain reaction ou reações em cadeia de polimerase) consiste na ampliação e replicação do DNA, *in vitro*, catalisada pela ação de uma DNA polimerase. Desenvolvida originalmente por Randy Saiki, a técnica foi otimizada pelo bioquímico Kary Mullis em 1983, levando-o a receber o prêmio Nobel em Química em 1993 (REGITANO, 2001; CARRER *et al*., 2010; VIEIRA, 2022).

Precedente aos ajustes realizados por Kary Mullis para otimizar a técnica, a enzima utilizada na análise de PCR (fragmento Klenow da DNA polimerase I) era adicionada a cada ciclo de amplificação, haja vista que a enzima era inativada com a temperatura de desnaturação do DNA, demandando grande quantidade da mesma (REGITANO, 2001).

O cenário foi modificado quando Mullis introduziu o conceito de primer de PCR e utilizou uma DNA polimerase termoestável a temperatura de 95ºC. Esta, por sua vez, foi isolada da bactéria *Thermus aquaticus* por cientistas da Cetus Corporation em 1985. A bactéria de grande importância para revolução da PCR foi descoberta por Thomas Brock na década de 1960. O cientista, ao visitar o parque de Yellowstone, nos Estados Unidos da América, deu início às investigações acerca de organismos vivos que poderiam se desenvolver em ambientes com temperaturas extremas, obtendo êxito na descoberta de *T. aquaticus*: um procarionte que habitava fontes termais cuja temperatura atingia 75ºC (MARTINS, 2020; VIEIRA, 2022).

A análise de PCR requer a presença de desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) e de oligonucleotídeos sintéticos (“iniciadores” ou primers) para iniciar a síntese de uma fita de DNA complementar à fita molde a partir da extremidade 3’ de cada primer. Outra etapa fundamental para o sucesso da técnica de PCR são os ciclos térmicos que ocorrem no interior de um termociclador classificados como desnaturação, anelamento e extensão (REGITANO, 2001).

No ciclo de desnaturação a temperatura se eleva entre 92ºC e 95ºC, o DNA genômico permanece desnaturado por todos os ciclos subsequentes em razão da baixa concentração das fitas complementares, impedindo sua união, enquanto os primers apresentam concentrações altas facilitando o anelamento. Já no ciclo de anelamento a temperatura reduz até o ponto ideal para formação de novas pontes de hidrogênio entre cada par de primer e a fita molde, comumente em torno de 55ºC e 62ºC. Tal temperatura depende do tamanho e da sequência do oligonucleotídeos a ser utilizado (OLIVEIRA *et al.*, 2007; SILVA *et al*., 2016).

Na última etapa, denominada de extensão, a temperatura aumenta para aproximadamente 72ºC para que a enzima DNA polimerase una-se ao primer e, com auxílio do magnésio, a nova fita de DNA seja sintetizada. A síntese, por sua vez, ocorre por meio da ação dos nucleotídeos (dNTPs) que são complementares à fita molde (OLIVEIRA *et al*., 2007). Ao término de vários ciclos, obtém-se o acúmulo exponencial ($N = N_0 \times 2^n$) de cópias da região demarcada pelos primers (VIEIRA, 2022).

Outro aspecto fundamental para obter êxito em PCR é o desenvolvimento de primers adequados para cada região que se pretende amplificar. Esse procedimento exige conhecimento prévio da sequência de nucleotídeos do segmento de DNA a ser amplificado, ou ao menos das extremidades do gene. Alguns programas e métodos automatizados para sequenciar genomas de diversas espécies são desenvolvidos para auxiliar o delineamento de primers. De forma geral, cada primer contém de 20 a 30 nucleotídeos (REGITANO, 2001).

A técnica de reações em cadeia de polimerase (PCR) é flexível, permitindo modificações nos procedimentos de realização das análises. Nestas condições algumas alterações foram realizadas resultando em variantes da PCR convencional, como, por exemplo, a PCR multiplex e PCR em tempo real (HAAS; TORRES, 2016).

Neste cenário, na PCR multiplex mais de um segmento genômico é amplificado numa única reação, sendo necessário a utilização de dois, ou mais, pares de primers. Esta variação da PCR convencional simplifica algumas investigações como, por exemplo, os testes de paternidade onde vários marcadores genômicos devem ser analisados (VIEIRA, 2022). Já a PCR em tempo real (qPCR) torna possível o monitoramento, em tempo real, do processo de amplificação do DNA, além de permitir a quantificação dos ácidos nucleicos por intermédio da emissão e captação de fluorescência que ocorre durante todo processo. Para isso, faz-se necessário a utilização de um termociclador com sistema ótico para a excitação da fluorescência e captação da emissão, além de um computador com um software para armazenar os dados e realizar a análise da reação (SILVA *et al.*, 2016; HAAS; TORRES, 2016).

Além de ambas as técnicas derivadas da PCR convencional, apresentadas anteriormente, a RT-PCR (Reverse Transcriptase Chain Reaction), a Nested PCR e PCR Competitiva são produtos das modificações nas metodologias de PCR.

A RT-PCR é composta por duas etapas. A primeira, denominada de transcrição reversa, consiste na conversão de um RNA em cDNA (DNA complementar), já que para esta reação não se utiliza o DNA extraído diretamente da amostra, mas sim a transformação de uma molécula de RNA em DNA. A segunda etapa é definida como amplificação. A primeira fase da reação consiste na síntese de uma fita de DNA, na qual se utiliza uma fita de RNA numa reação

catalisada por transcriptase reversa e primers inespecíficos e individuais compostos por timinas consecutivas (entre seis e 35) que se anelam a regiões com várias adeninas. Posteriormente a esta etapa, tem-se o cDNA para ser utilizado na PCR. A Nested PCR também é caracterizada em duas etapas: na primeira o segmento genômico é amplificado de forma abrangente, sem especificidade, enquanto na segunda o produto obtido da extensiva amplificação é amplificado novamente, entretanto objetivando a sequência-alvo. Ambas as etapas podem ser realizadas concomitantemente ou separadamente. Por fim, a PCR Competitiva compara dois trechos de DNA: um extraído do DNA molde e outro de um DNA controle (com tamanho, sequência e concentração definida). Neste tipo de PCR se obtém a amplificação de duas regiões de DNA: a de interesse e a controle. A partir desta técnica é possível inferir à amplificação do DNA-alvo tendo em vista a amplificação do DNA controle (VIEIRA, 2022).

Partindo do contexto discorrido, a PCR revolucionou a área de biologia molecular visto que sua aplicação em diversas áreas, como medicina forense, genética, testes de paternidade, maternidade ou irmandade, sequenciamento do genoma humano, microbiano, de plantas e animais auxilia na análise de diversidade genética de populações e, consequentemente, otimiza pesquisas relacionadas às áreas supracitadas (OLIVEIRA *et al.*, 2007; HAAS; TORRES, 2016; SANTOS; WIETHOLTER, 2021). Não menos importante, nos recentes dois últimos anos (2020 - 2022) a população internacional acompanhou a difusão da técnica de PCR em virtude da pandemia de COVID-19. A RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase por Transcriptase Reversa em Tempo Real), variação da PCR convencional, é considerada a técnica padrão na identificação do SARS-Cov-2, causador do COVID-19, em razão da alta sensibilidade e eficácia na análise de distintos tipos de amostras (TRINDADE; FORTES, 2021).

4.4 QUALIDADE TECNOLÓGICA DO TRIGO

O trigo (*Triticum aestivum*) é considerado um dos cereais mais importantes para a população humana, tendo em consideração que aproximadamente 43 nações e 35% da população mundial consomem rotineiramente produtos alimentícios derivados do setor tritícola. Os principais países exportadores de trigo são Argentina, Austrália, Canadá, União Europeia, Cazaquistão, Federação Russa, Ucrânia e Estados Unidos (SPOLADORE, 2019).

A produção de trigo nacional brasileira é destinada majoritariamente ao mercado interno, essencialmente à panificação, entretanto, a oferta de trigo no Brasil não atende a demanda requerida pelo mercado consumidor; em 2020, por exemplo, aproximadamente 51,0% (6.466Mt) do total de trigo consumido no Brasil (12.700Mt) foi proveniente de exportações.

Desta produção, 46,9% do trigo produzido teve como destino a produção de farinha para panificação, seguido para o uso doméstico (18,7%), para produção de massas (17,9%) e biscoitos (11,9%) e para outras finalidades (4,5%) (GNOCATO *et al.*, 2022).

Assim como os demais cereais para fins alimentícios e industriais, o trigo é classificado conforme normas estabelecidas por órgãos ou departamentos de regulamentação. No Brasil, a Instrução Normativa n° 38 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) categoriza o trigo em tipos (1, 2, 3 e fora de tipo) e classes/categoria (melhorador, pão, doméstico, básico e outros usos). Após a industrialização do trigo, a farinha também é classificada de acordo com sua qualidade, conforme as condições impostas pela IN nº 8/2005 do MAPA, sendo qualificada, principalmente, de acordo com sua força: capacidade, em valores quantitativos, que a farinha tem ao ser submetida à mistura com água e ação mecânica, bem como a habilidade de absorção de água pelas proteínas gliadinas e gluteninas (alto e baixo peso molecular), formadoras do glúten (MITTELMANN *et al.*, 2000; BROCA, 2021).

O glúten é o principal parâmetro para determinar a viscoelasticidade da massa da farinha de trigo, fundamental para determinar a destinação à indústria. Caracterizado como uma substância de cor creme, o glúten consiste em uma rede elástica e contínua com habilidade de reter o gás carbônico liberado por leveduras durante o processo de fermentação da massa, permitindo a expansão da mesma (GNOCATO *et al.*, 2022). As proteínas de reserva citadas, gluteninas e gliadinas, são expressas apenas nos grãos de trigo (VANCINI *et al.*, 2019), enquanto as gluteninas são responsáveis pela característica de elasticidade, força e tempo de desenvolvimento, as gliadinas determinam a viscosidade e extensibilidade à massa formada (GAMBIM *et al.*, 2008; GNOCATO *et al.*, 2022).

A qualidade da farinha de trigo é influenciada por fatores exógenos (clima, solo, práticas culturais, entre outras) e genéticos. Nesse sentido, é possível avaliar a aptidão de linhagens de trigo a partir de testes bioquímicos, como a eletroforese de gliadinas e gluteninas a partir de testes de PCR, visando a identificação e seleção de genótipos aptos aos distintos usos industriais do trigo (GUARIENTI, 1996). Nesse contexto, a qualidade de panificação de linhagens de trigo vem sendo associada a diferentes genes, dos quais se cita os que determinam a composição proteica de gluteninas de alta massa molecular (HMW-GS) codificadas por genes Glu-1 situados em três locos no braço longo dos cromossomos 1A, 1B e 1D (VANCINI *et al.*, 2019). Já os genes que caracterizam as gluteninas de baixa massa molecular (BPM-GS) estão localizados no loco Glu-3 no braço curto dos cromossomos 1A, 1B e 1D. As gliadinas são divididas em quatro grupos (alfa, beta, gama e ômega) os dois primeiros são codificados pelo loco Gli-2,

localizado no cromossomo 6, enquanto o grupo gama e ômega são encontrados no cromossomo 1 e codificados pelo loco Gli-1 (BRAMMER, 2000).

Dessa forma, a obtenção de cultivares que apresentam gluteninas, essencialmente HMW, em seu genoma e características agronômicas desejadas, visando principalmente a otimização da produtividade, são as principais prioridades de um programa de melhoramento genético para diminuir a dependência de trigo produzidos em países vizinhos (GHAZY *et al.*, 2012; GNOCATO *et al.*, 2022).

5 METODOLOGIA

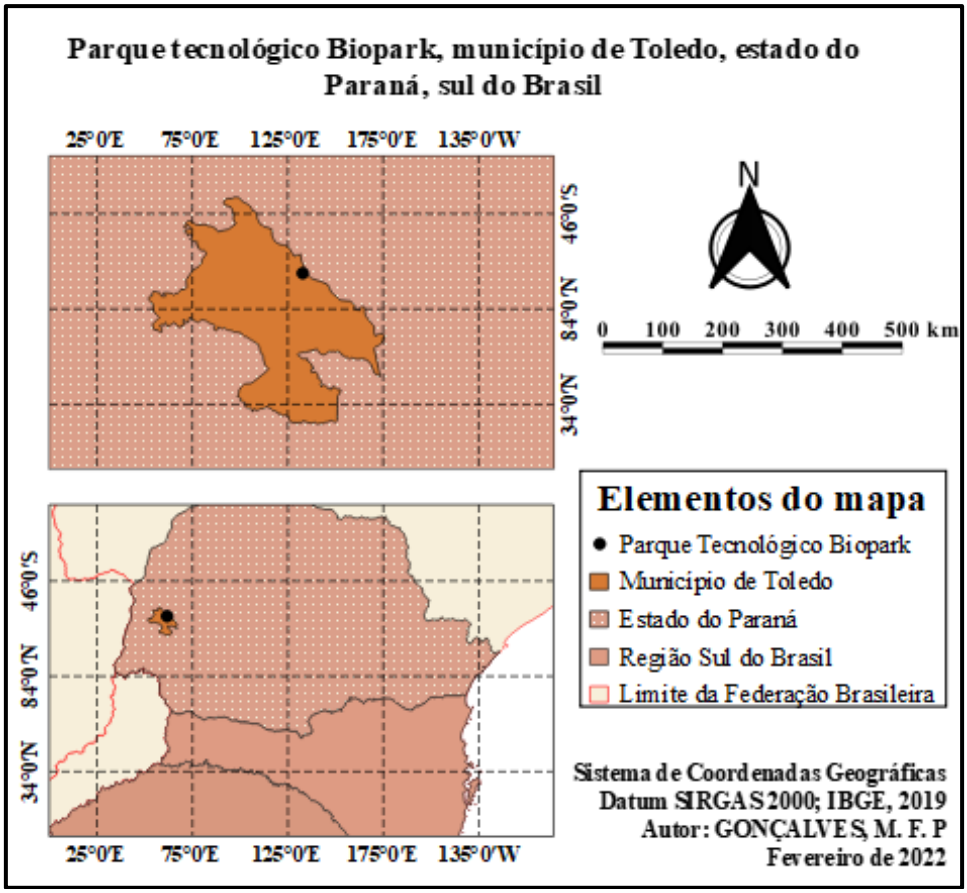
O estágio técnico profissional em Agronomia foi desenvolvido no laboratório privado LagBio. A empresa está localizada no município de Toledo, ao oeste do estado do Paraná (Figura 1) e possui escopo em biologia molecular para realização de análises genômicas e biotecnológicas.

O desenvolvimento do estágio foi categorizado em etapas que consistiram em: execução de atividades práticas, revisão teórica sobre a temática abordada no estágio, redação, conclusão e apresentação oral do relatório de estágio (Tabela 1). As atividades práticas foram concentradas em um período de sete semanas e distribuídas em oito horas diárias e 40 horas semanais durante os meses de janeiro e fevereiro - haja vista a necessidade de deslocamento até o município de Toledo/PR sem haver interferência nas aulas teóricas ministradas na universidade, de acordo com o calendário acadêmico - perfazendo a carga horária de 300 horas estabelecida pela grade curricular do curso de Bacharel em Agronomia para disciplina de Estágio Técnico Profissional em Agronomia.

O estágio foi supervisionado pela bióloga Dr.ª Glacy Jaqueline da Silva - sócia do LagBio; a orientação acadêmica ficou sob responsabilidade da professora da Universidade do Sul de Santa Catarina - Unisul, Ms. Maricelma Simiano Jung.

A discente acompanhou as atividades rotineiras desenvolvidas no laboratório dando ênfase a análises genômicas, essencialmente do tipo PCR. Para tanto, a equipe técnica, constituída por Engenheiras Agrônomas e Biólogas com atuação profissional docente e científica, realizou treinamento em manuseio de instrumentos e equipamentos laboratoriais, bem como capacitou a estagiária para exercer as análises supracitadas, salientando-se a indispensabilidade de equipamentos de proteção individual essenciais para execução de todo e qualquer tipo de atividade nas dependências do laboratório: jaleco, roupas compridas, sapatos fechados e luvas.

Figura 1 - Mapa de localização do Parque Tecnológico Biopark situado no município de Toledo, região oeste do estado do Paraná, sul do Brasil.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 1 -Planejamento cronológico de atividades desenvolvidas no período de realização do Estágio Técnico Profissional em Agronomia em um laboratório privado de análises genômicas e biotecnológicas no município de Toledo, estado do Paraná.

Estágio Técnico Profissional em Agronomia						
Categorias	Período: semestre 1/2022					
	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai.	Jun.
Realização de matrícula e regularização de documentação	X	X				
Desenvolvimento de atividades práticas	X	X				
Revisão teórica sobre a temática do estágio	X	X	X	X	X	
Redação de relatório de estágio	X	X	X	X	X	
Conclusão de relatório de estágio						X
Apresentação oral à banca						X

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

6 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

As atividades desenvolvidas durante o período de realização do Estágio Técnico Profissional em Agronomia foram distribuídas em dois ambientes: nas dependência do Laboratório LagBio e em ambiente externo ao mesmo. As ações executadas em laboratório tiveram como escopo análises de biologia molecular, dando ênfase à análise de PCR. Em ambiente extrínseco a atuação da acadêmica ocorreu através de visitas aos clientes e/ou parceiros, em áreas experimentais conduzidas pelo LagBio e eventos no qual a empresa esteve presente. Ressalta-se a presença da supervisora de estágio, Doutora Glacy Jaqueline da Silva, em todas as atividades desempenhadas, bem como a orientação cedida pelas demais sócias do laboratório, Doutora Cássia Renata Pinheiro e Doutora Lucimar Pereira Bonett, durante a condução de análises laboratoriais.

6.1 ATIVIDADES INTERNAS

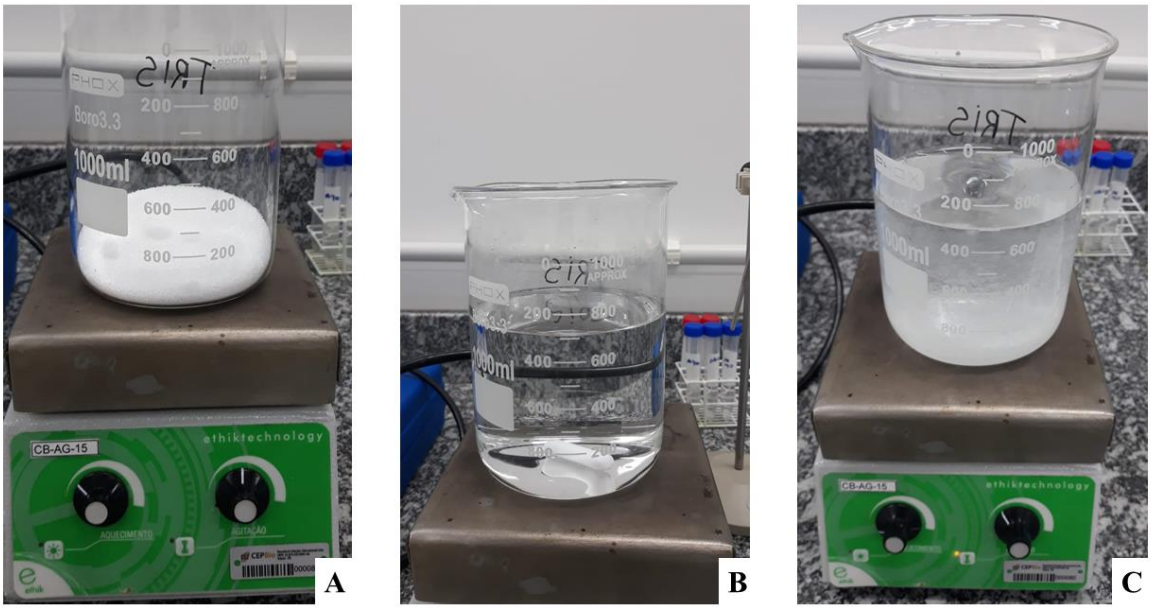
As atividades internas ocorreram com escopo na demanda de serviços prestados aos clientes, bem como nas linhas de pesquisas desenvolvidas em trabalhos acadêmicos de mestrado por alunos vinculados ao laboratório. A acadêmica desenvolveu atividades embasadas em análises de PCR acerca de genes específicos que determinam a qualidade de panificação da cultura do trigo (*Triticum* spp.), análises de PCR objetivando a análise de biodiversidade de bactérias diazotróficas extraídas de nódulos de acácia-negra, determinação de aminoácido prolina de plantas de soja, além de atividades complementares fundamentais para obtenção de êxito nas atividades supracitadas, como: preparo de soluções e de gel de agarose e extração de DNA molde.

6.1.1 Preparo de soluções para extração de DNA

Foi realizado o preparo de reagentes necessários para extração de DNA genômico (Apêndice A), etapa precedente à análise de PCR, pela estagiária. Para tanto, a acadêmica consultou o protocolo de procedimento para extração de DNA de sementes pelo método SDS adaptado a partir da versão cedida pela empresa Coodetec, polo Cascavel – Paraná. Sucintamente, as tarefas desta fase foram pesagem e dissolução dos solutos, ajuste de pH e armazenamento das soluções. Para pesagem utilizou-se vidraria tipo becker graduado (Phox®) e balança de precisão contendo duas casas decimais (Ohaus ®). A dissolução prosseguiu com a utilização

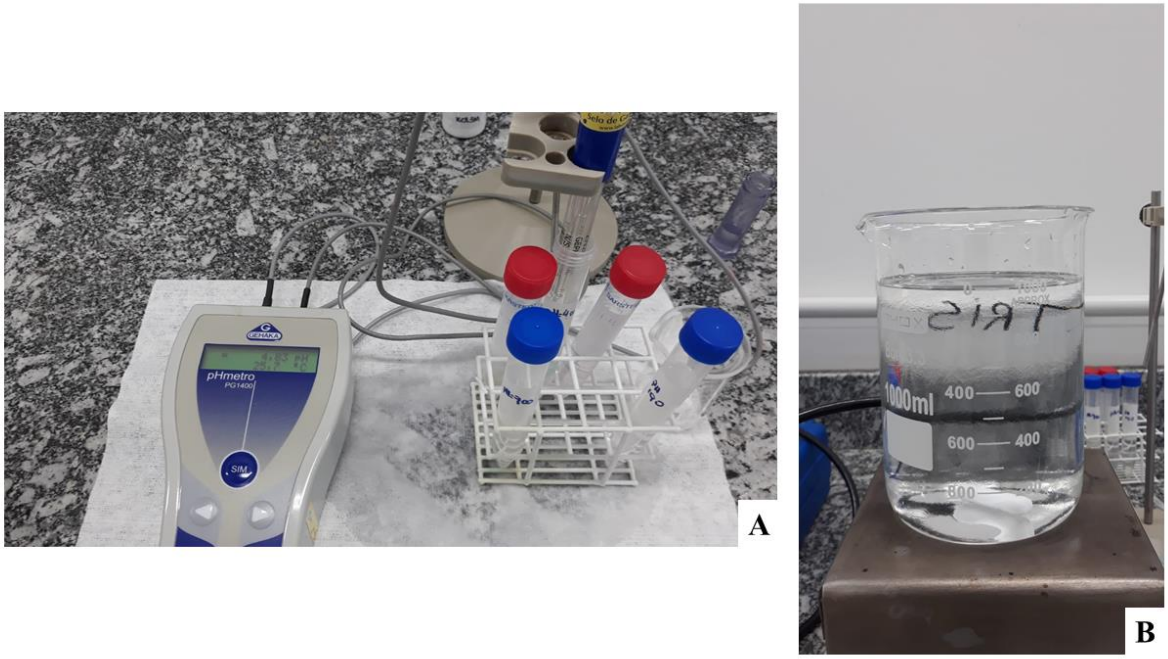
de um agitador magnético (Ethik Technology®) (Figura 2) concomitantemente ao ajuste de pH que foi aferido por um pHmetro (Gehaka®) e ajustado com ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH) (Figura 3). A finalização do preparo de soluções consistiu na armazenagem dos produtos obtidos em vidrarias com capacidade volumétrica de acordo com a especificidade de cada solução.

Figura 2 - Preparo de soluções estoques para extração de DNA da cultura do trigo: A – Soluto Tris em becker graduado (Phox®) com capacidade para 1000ml sobre um agitador magnético (Ethik Technology®); B - Adição de 70% do volume (700ml) de solvente (água destilada) requerido; C – Solução em agitação para homogeneização da solução.



Fonte: A autora, 2022.

Figura 3 - Preparo das soluções estoques para extração de DNA da cultura do trigo: A – Calibração do pHmetro (Gehaka®); B - Averiguação do potencial hidrogeniônico das soluções estoques; C – Complementação do volume de solvente para 1000ml após verificação de pH da solução.



Fonte: A autora, 2022.

6.1.2 Extração de DNA de trigo (*Triticum* sp.)

Precedente às análises de PCR que foram enfatizadas acerca da cultura do trigo (*Triticum* sp.), realizou-se a extração de moléculas de DNA indispensáveis para obtenção de DNA molde. Este processo é essencial para análises que utilizam técnicas moleculares e o sucesso dos resultados é dependente da pureza, quantidade e qualidade das amostras obtidas, tais variáveis são consequências de fatores que interferem no processo, entre ele: estádio vegetativo do material biológico, adequação do protocolo de extração para espécie e manuseio adequado de utensílios para evitar a contaminação das amostras (DIAS *et al*., 2018).

A etapa de extração de DNA engloba dois procedimentos principais: a lise das células e a purificação do DNA. Após a destruição das células, o ácido desoxirribonucleico deve ser isolado dos demais componentes celulares e das proteínas, precipitado e suspenso em água ultrapura ou solução tampão (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

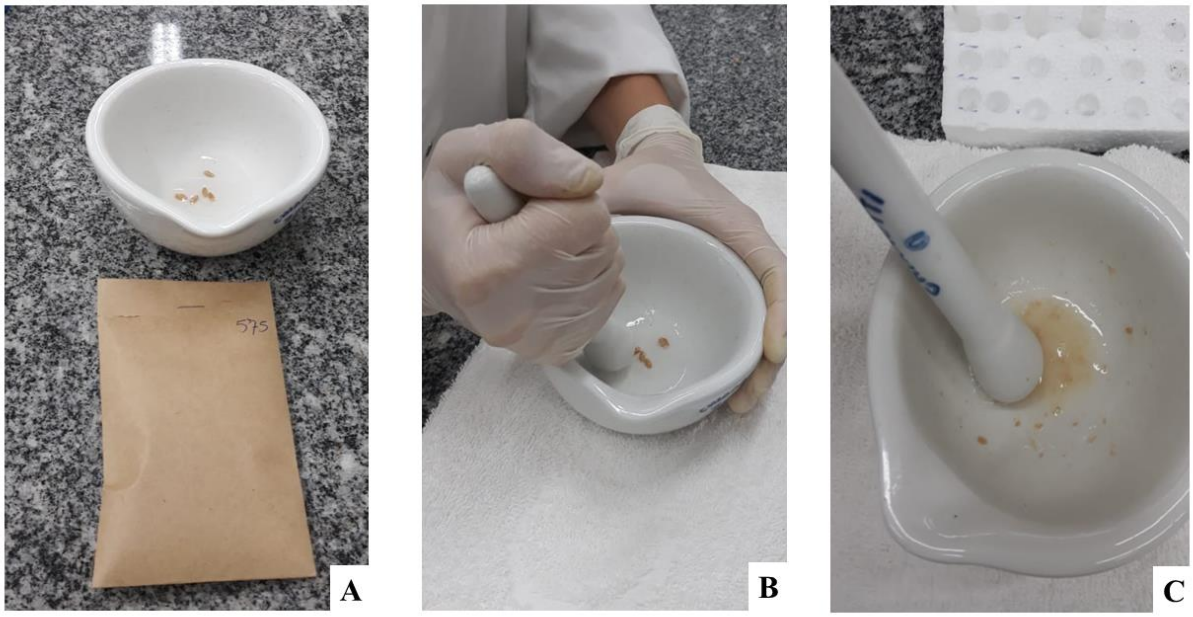
Segundo Campo *et al*. (2018), para se obter análises genéticas de populações de plantas por meio de fragmentos de DNA com qualidade, as moléculas de DNA devem ser íntegras, com ausência de impurezas e passíveis à amplificação através de análise de PCR. Em adição, recomenda-se evitar o co-isolamento de substâncias químicas que alteram a qualidade e a pureza do DNA, tais como: polissacarídeos, proteínas, substâncias fenólicas e compostos secundários.

Nas atividades desenvolvidas durante o estágio, utilizou-se protocolo para extração de DNA de sementes pelo método SDS. Segundo Dias *et al*. (2018), SDS é um detergente iônico

que colabora para precipitação concomitante de proteínas e polissacarídeos, bem como para o rompimento das membranas celulares e inativação de enzimas.

Prosseguindo com o protocolo, selecionou-se aproximadamente 10 sementes da cultura de interesse para posteriormente introduzi-las em um cadinho. Após esta etapa, adicionou-se 2ml de solução tampão e macerou-se as sementes até atingirem propriedade glutinosa (Figura 4).

Figura 4 - Maceração de sementes de trigo para extração de DNA: A – Seleção de sementes de trigo e adição de solução tampão; B – Processo de maceração de sementes de trigo em um cadinho; C – Produto da maceração de sementes de trigo.

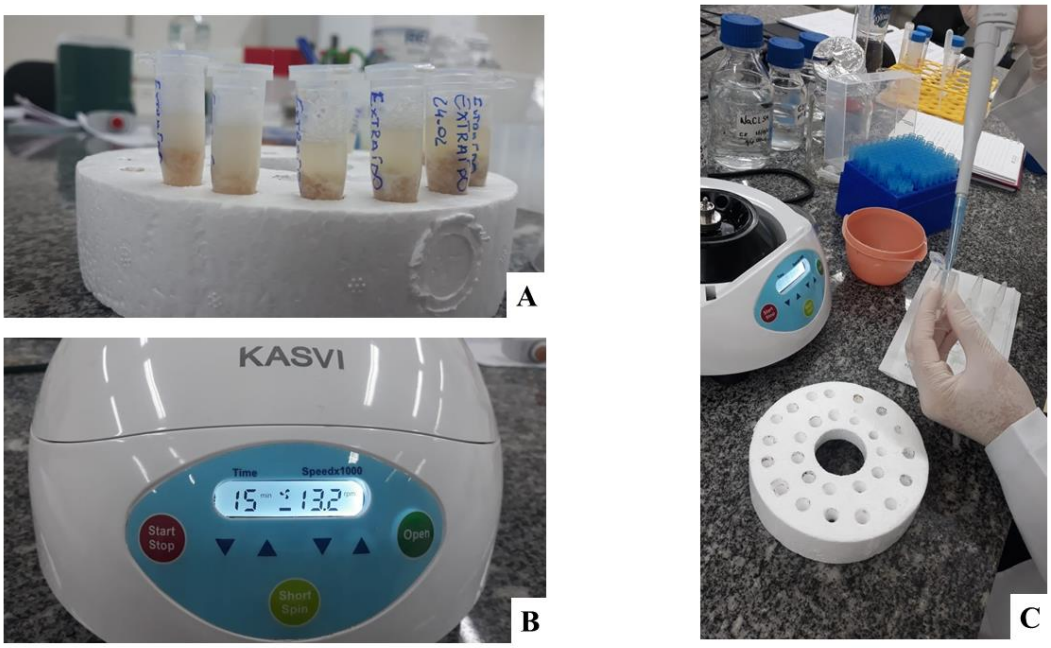


Fonte: A autora, 2022.

As amostras foram inseridas em microtubos com capacidade volumétrica de 2ml. Posteriormente os microtubos foram transferidos para uma centrífuga para realizar a etapa de agitação a uma velocidade de 13.200 rpm (rotação por minuto) durante 15 minutos. Finalizado o período de agitação, o produto subnadante foi transportado para um novo microtubo (Figura 5) e incubado em uma estufa na qual permaneceu durante 30 minutos a uma temperatura de 38ºC.

Figura 5 - Maceração de sementes de trigo para extração de DNA: A – Sementes maceradas depositadas em microtubos com capacidade volumétrica de 2ml; B – Centrífuga em

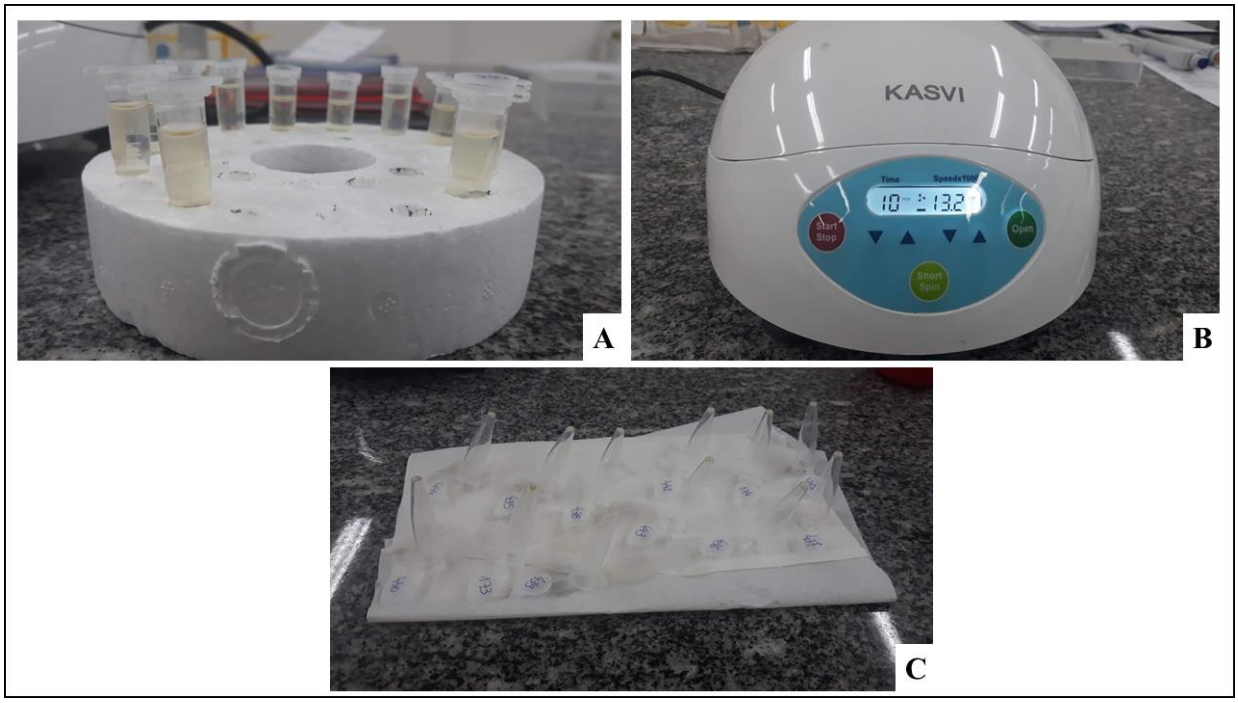
funcionamento (13.200 rpm durante 15 minutos) de acordo com protocolo de extração de DNA de sementes de trigo; C – Transferência do material sobrenadante para novos microtubos.



Fonte: A autora, 2022.

Transcorrido o intervalo de aquecimento, adicionou-se 0,5ml de isopropanol gelado e aguardou-se 2 minutos para realizar a homogeneização por aproximadamente 1 minuto. Novamente os microtubos foram transferidos para centrífuga onde permaneceram durante 10 minutos com rotação de 13.200 rpm. Na fase subsequente as amostras foram retiradas da centrífuga e o material subnadante foi removido dos microtubos resultando na permanência do material genético aderido à extremidade inferior do tubo (Figura 6). Por fim, adicionou-se 0,2ml de solução TE e se armazenou as amostra de DNA em um congelador com temperatura aproximada a -7ºC para serem utilizadas em análises de PCR.

Figura 6 - Etapas conclusivas da extração de DNA do trigo: A – Microtubos (2ml) dispostos em bancada após a adição de isopropanol gelado; B – Centrífuga em atividade de acordo com protocolo para extração de DNA de trigo (13.200 rpm durante 10 minutos); C – Inversão dos microtubos em papel absorvente para secagem do subnadante.



Fonte: A autora, 2022.

6.1.3 Preparo de gel de agarose

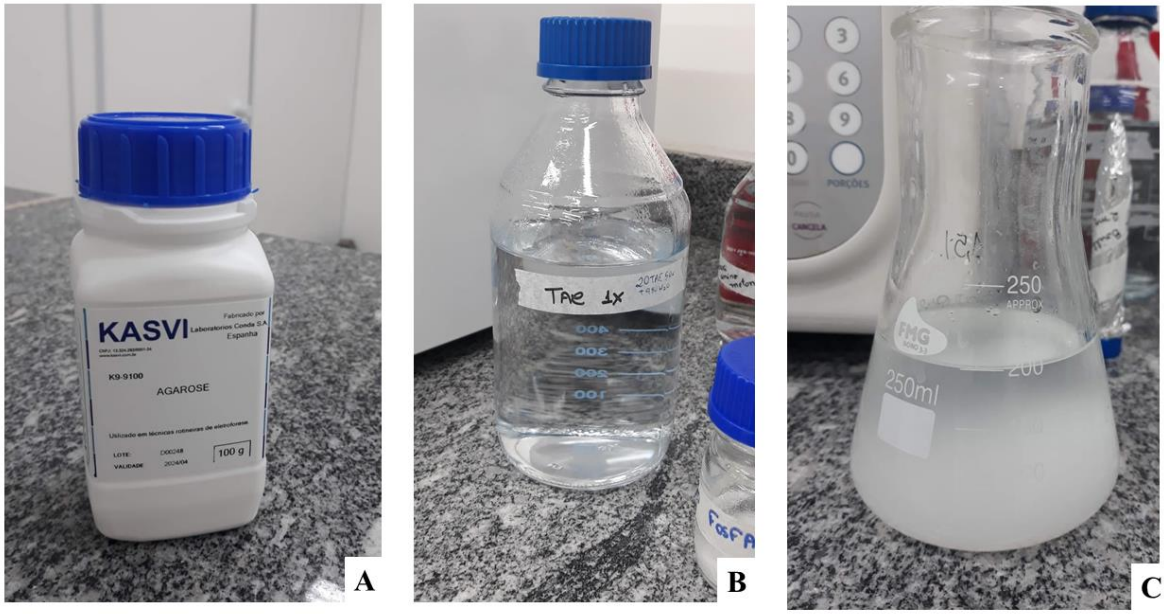
Segundo Reiniger *et al*. (2004), o gel de agarose utilizado em eletroforese tem finalidade de segregar moléculas de ácido nucleico. De acordo com os autores, a agarose é caracterizada por um polímero extraído de algas marinhas.

O gel de agarose utilizado na etapa de eletroforese, que será descrita adiante, foi preparado a uma concentração de 1,5%. Para tanto, pesou-se 3g de agarose (Kasvi®) em uma balança analítica e se transferiu o reagente para um frasco de Erlenmeyer no qual se adicionou 200ml de solução TAE diluído 50 vezes em água destilada (20ml de TAE 50x para 980ml de água destilada) (Figura 7). Após a adição do soluto (agarose) no solvente (tampão), o frasco foi levado ao micro-ondas no qual permaneceu por aproximadamente 2 minutos interruptos. Posteriormente, quando o soluto estava totalmente dissolvido no solvente, adicionou-se 50µl de brometo de etídio (EtBr) com o objetivo de revelar os ácidos nucleicos presentes no gel de agarose por meio da fluorescência analisada sob luz ultravioleta, caracterizando o brometo de etídio como corante no processo eletroforese (REINIGER *et al*., 2004). Segundo Vieira (2022), o brometo de etídio se insere nas fendas da cadeia de DNA apresentando fluorescência quando submetido à luz UV. De acordo com o mesmo autor, uma alternativa para atribuir a coloração do EtBr ao gel de agarose consiste em transferir o bloco de gel, após solidificado, a uma solução de brometo de etídio deixando-o em repouso por alguns minutos. Para esta etapa, a utilização

de luvas tornou-se indispensável visto que o brometo de etídio apresenta toxicidade elevada devido ao seu potencial mutagênico (OLIVEIRA *et al*., 2007).

Após dissolução dos componentes do gel de agarose, a solução foi acondicionada em uma bandeja para gel na qual se organizou os pentes em seus respectivos locais. Por fim, aguardou-se a solidificação do gel para utilizá-lo na etapa de eletroforese.

Figura 7 - Preparação de gel de agarose: A – Reagente Agarose (Kasvi®); B – Solução tampão TAE diluído 50 vezes; C – Solução para formulação de gel de agarose: 3g de Agarose com adição de 200ml de solução tampão em um frasco de Erlenmeyer.



Fonte: A autora, 2022.

6.1.4 Análise de PCR: preparo de reações e interpretação de resultados

A análise de PCR foi a principal atividade desenvolvida pela acadêmica durante o período de vivência do estágio, além de ser o fator motivador para realização das demais ações praticadas e citadas anteriormente (e.g. extração de DNA, preparo de reagentes, preparo de gel de agarose).

Neste contexto, as análises solicitadas por clientes do laboratório, que apresentaram alta demanda durante o período de estágio (aproximadamente 1.500 amostras), tiveram como objetivo a identificação de linhagens da cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.) que possuíam os genes que conferem qualidade à panificação para as plantas. Ademais, a acadêmica auxiliou na execução de análises de PCR com a finalidade de investigar o perfil molecular de bactérias

diazotróficas presentes em nódulos da espécie *Acacia mearnsii* De Wild., popularmente conhecida como acácia-negra, de um projeto de pesquisa concedido por um programa de mestrado da Universidade Paranaense (UNIPAR) - haja vista o vínculo de docência mantido entre a Universidade e a supervisora de estágio Dr.ª Glacy J. da Silva que possibilita o intercâmbio de discentes para utilização da estrutura do laboratório na realização de pesquisas acadêmicas.

Diante do exposto, a formulação das reações de PCR exigiu os seguintes componentes: Taq polimerase, primers (F' e R'), dNTP's, $MgCl_2$, tampão e amostras para extração de DNA, conforme os protocolos de PCR desenvolvidos e adaptados a partir de 1983 quando Kary Mullis postulou o conceito de PCR (CARRER *et al.*, 2010). Os primers têm a função de identificar o local do material a ser amplificado para posteriormente os dNTP's agirem na síntese de novas cópias do material proveniente das amostras. A Taq polimerase participa da formação das novas cadeias de DNA, enquanto o $MgCl_2$ e o tampão auxiliam na atividade da polimerase (SILVA *et al.*, 2016). As concentrações de Mg^{2+}, dNTP e DNA molde podem influenciar no desempenho das análises uma vez que o excesso de Mg^{2+} resulta em acúmulo de produtos de amplificação inespecíficos e sua falta na redução da qualidade da PCR. A concentração de magnésio é dependente da concentração de dNTP, haja vista que essa se liga ao Mg^{2+} tornando-o indisponível ao meio. A concentração de DNA molde é variável conforme o tamanho do genoma e a finalidade das análises (REGITANO, 2001).

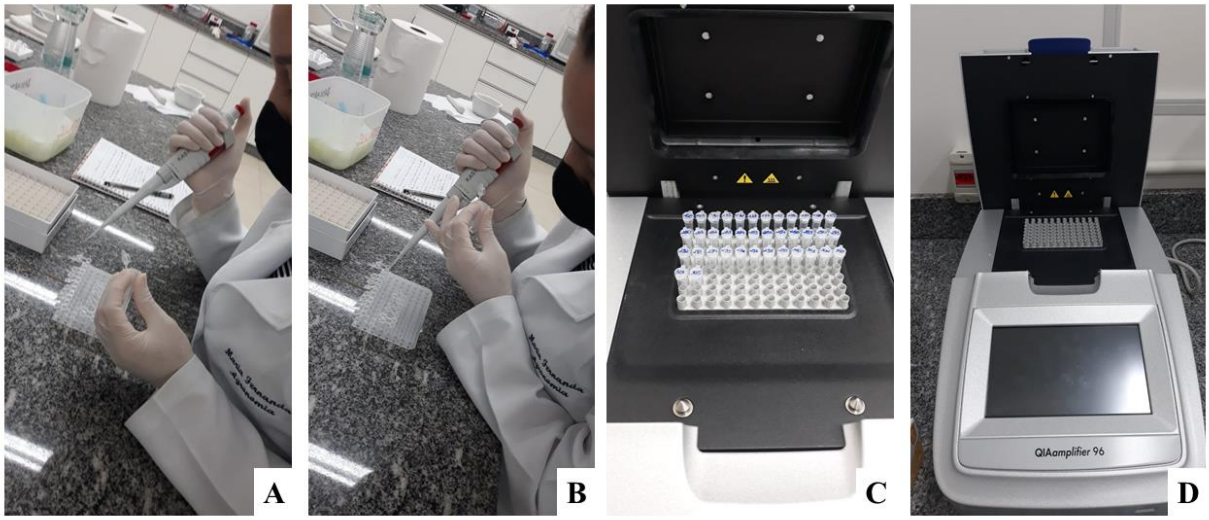
Nessa conjuntura, a quantidade de cada componente da reação foi norteada por protocolos ajustados a partir do embasamento em trabalhos publicados na literatura e/ou conforme as recomendações dos fabricantes dos componentes; a identificação das amostras foi realizada de forma numérica e progressiva. Especificamente para reação de PCR em amostras contendo DNA de trigo, utilizou-se os seguintes volumes: 2µl de Master Mix® (substituindo a utilização de Taq polimerase, magnésio, dNTP e tampão), 1µl de primer F', 1µl de primer R', 0,5µl de BSA, 0,9µL de DMSO, 2µl de DNA e 3,6 µl de água ultrapura (nesta ocasião, água para injeção) – quantidade necessária para preparar a reação de PCR para uma amostra. O volume final de cada reação foi de 10 µl. Os primers utilizados na reação foram By8 e α-secalin, ambos para identificar a presença de genes que conferem qualidade de panificação às linhagens de trigo (Apêndice B). O primer By8 com sequência F: TTAGCGCTAAGTGCCGTCT e R: TTGTCCTATTTGCTGCCCTT usualmente é utilizado para rastrear alelos HMW-GS (gluteninas de alto peso molecular) e amplifica um fragmento de 527 pb (GHAZY *et al.*, 2012), enquanto o primer secalin, utilizado para detectar alelos de gliadinas, apresenta sequência de bases (F: ACCTTCCTCATCTTTGTCCT e R: CCGATGCCTATACCACTACT) que amplifica um fragemtno de 1076 pb (DIAS, 2010). Ressalta-se que para algumas reações foram utilizados, para

experimentação, os componentes Taq polimerase, magnésio, dNTP e tampão para substituir o Master Mix®.

De modo conjunto, foram inseridos 2µl de DNA extraído de sementes de linhagens de trigo, conforme descrito anteriormente, em microtubos de centrifugação do tipo Eppendorf com capacidade para 0,5ml. Posteriormente, distribuiu-se os componentes da reação, que foram misturados em etapa anterior, nos microtubos contendo o DNA das respectivas linhagens, conforme a quantidade estabelecida em protocolo. Finalizado o procedimento de preparo das reações, os microtubos foram incubados no termociclador (Figura 8) com a finalidade de ativar a reação de PCR a partir do processo de desnaturação das moléculas de DNA, seguido do anelamento dos primers e alongamento/extensão das novas cadeias de DNA. Na etapa de desnaturação a temperatura do termociclador varia entre 91ºC e 95ºC para que as pontes de hidrogênio sejam rompidas permitindo a abertura da dupla fita. Na fase de anelamento a temperatura regride para entre 55ºC e 62ºC (conforme a composição do primer) para que os primers se anexem à região específica. Por fim, na etapa de extensão a temperatura é novamente elevada para ativar a ação da Taq polimerase (SILVA *et al*., 2016).

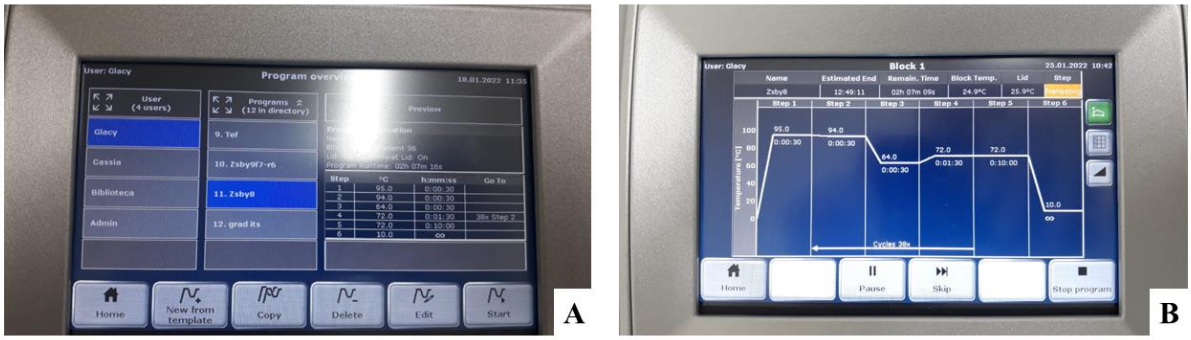
Os ciclos de funcionamento do equipamento seguiram as recomendações estabelecidas para os primers utilizados em cada reação (Figura 9), comumente ocorrem em torno de 30 a 40 vezes (SILVA *et al*., 2016). Ressalta-se que, de acordo com o objetivo da análise, os primers utilizados no preparo de reação eram dissemelhantes.

Figura 8 - Preparo de reações de PCR: A e B – Pipetagem dos componentes da reação de PCR em microtubos contendo 0,2µl de DNA de trigo; C – Microtubos dispostos no interior do termociclador; D – Vista panorâmica do termociclador.



Fonte: A autora, 2022.

Figura 9 - Ciclos do termociclador conforme finalidade das análises de PCR: A Programação para identificação de linhagens qualificadas à panificação; B – Ciclos para identificação de linhagens qualificadas à panificação em funcionamento.



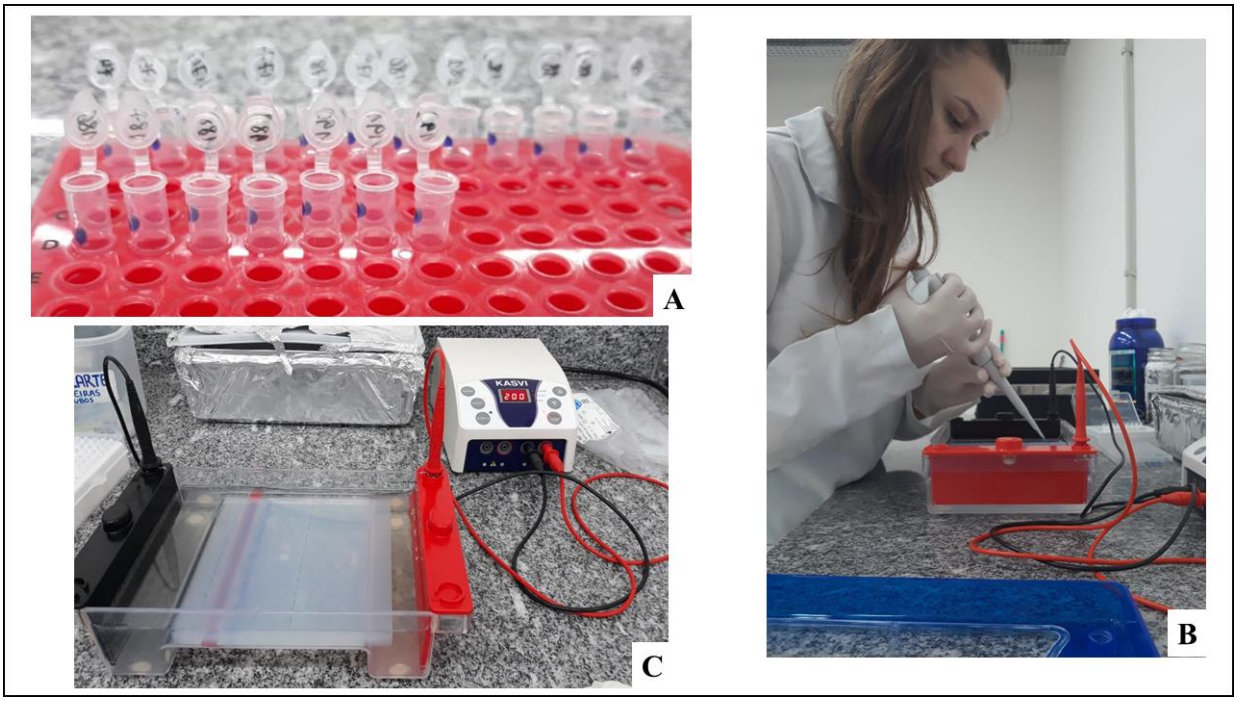
Fonte: A autora, 2022.

Decorrido os ciclos no termociclador, os microtubos foram alocados na bancada de trabalho para adição de azul de bromofenol, cuja funcionalidade está atrelada à coloração das amostras. Finalizada a preparação das reações, prosseguiu-se com a etapa de eletroforese.

A eletroforese é um método utilizado para separar, identificar e purificar fragmentos de DNA e de proteínas. O processo consiste na separação de moléculas ionizadas (aminoácidos, peptídeos, proteínas, nucleotídeos, ácido carboxílicos) conforme suas cargas elétricas e peso molecular. O fluxo de migração das moléculas ocorre de acordo com a carga do meio: moléculas com carga negativa se deslocam para o polo positivo (ânodo), enquanto moléculas com carga positiva migram para o polo negativo (cátodo). Neste sentido, os ácidos nucleicos se deslocam em direção ao polo positivo, haja vista a carga negativa atribuída aos mesmos. Em relação ao sistema tampão, pode ser classificado em contínuo – a mesma composição e concentração é utilizada no gel e na cuba eletrolítica – ou descontínuo – diferentes composições ou concentrações são utilizadas no gel e na cuba. As principais soluções tampões utilizadas na separação de moléculas de DNA são TAE (tampão tris – acetato – EDTA) e TBE (tampão tris – borato – EDTA), entre ambos o tampão TAE é o mais utilizado. O processo de eletroforese pode ser conduzido em diferentes meios de suporte: papel-filtro, sílica-gel, membranas de acetato de celulose, gel de agarose, amido ou poliacrilamida (OLIVEIRA *et al*., 2007).

Partindo desta contextualização, para preparação do procedimento de eletroforese, fez-se necessário a utilização do gel de agarose preparado e reservado para tal ocasião. O gel foi imerso em uma solução tampão de corrida (TAE 1X) dentro de uma cuba eletrolítica, por conseguinte as amostras e o marcador de peso molecular de 1Kb foram inseridos em seus respectivos poços delineados pelos pentes durante o processo de solidificação do gel. As fonte de eletroforese foram conectadas à cuba para transferência de corrente elétrica a fim de propulsionar a corrida uniforme das amostras (Figura 10).

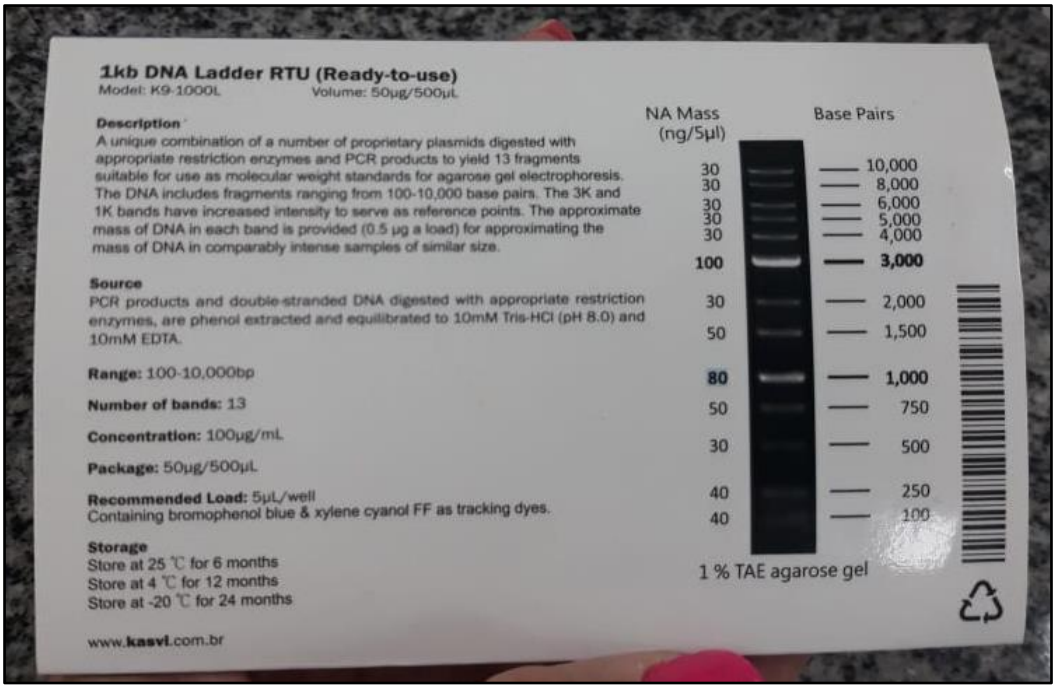
Figura 10 - Etapas sucessoras aos ciclos do termociclador: A – adição de corante (azul de bromofenol); B – Transferência das amostras para os poços do gel de agarose; C – Eletroforese em funcionamento: fontes elétricas conectadas a cuba para transferência de corrente elétrica (200v).



Fonte: A autora, 2022.

Após o período de uma hora, em uma voltagem de 200v, o gel de agarose foi deslocado para o transiluminador (fonte de luz UV), para visualizar e interpretar o resultado da corrida de eletroforese, etapa realizada com cautela devido à possibilidade de a luz ultravioleta causar queimaduras ópticas, evidenciando a importância da utilização de óculos de proteção ou evitar a exposição direta à luz (OLIVEIRA *et al*., 2007). A interpretação dos resultados foi realizada a partir da comparação do padrão de bandas estabelecido pelo fabricante do marcador de peso molecular (Figura 11).

Figura 11 - Instruções para utilização do marcador de peso molecular 1Kb: padrão para interpretação e comparação do tamanho de banda (à direita).

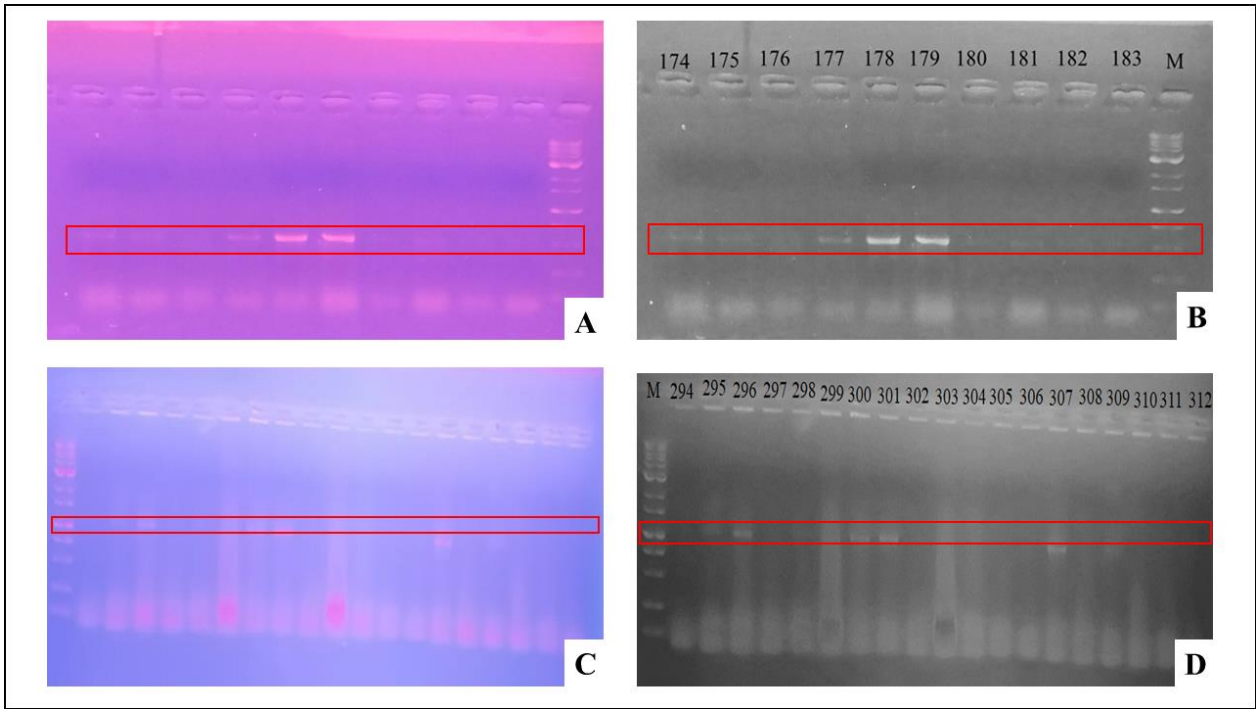


Fonte: A autora, 2022.

Por fim, para registrar os resultados, capturou-se fotografias do gel no interior do transiluminador e, posteriormente, analisou-se as amostras que apresentaram os genes alvos (qualidade de panificação) e se formulou uma base de dados para os resultados obtidos.

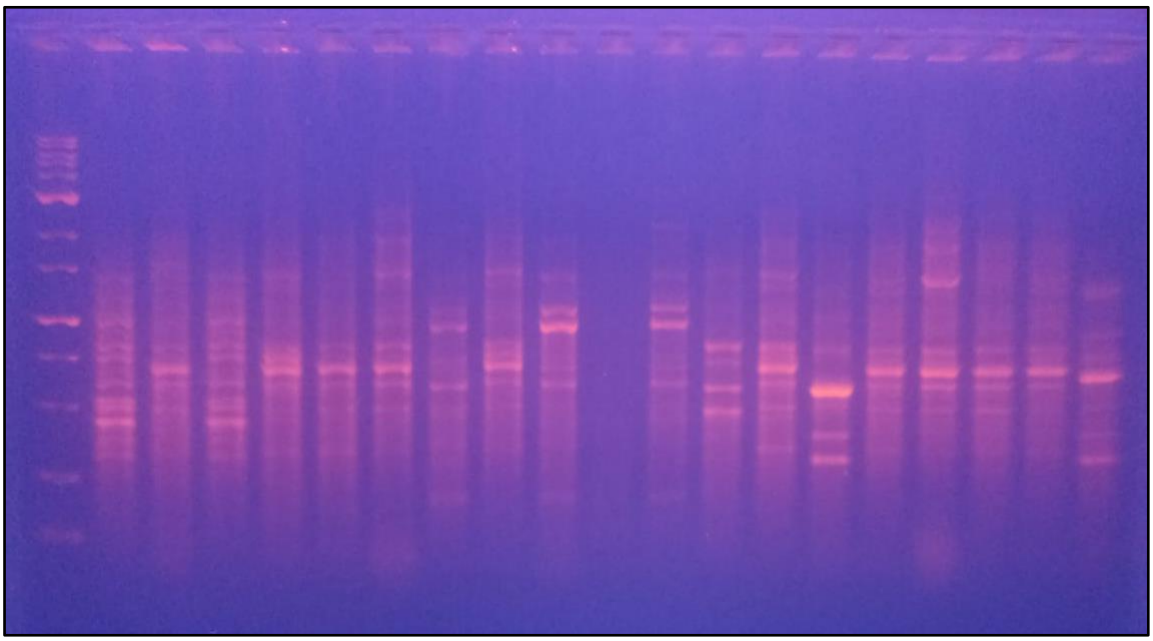
As reações de PCR com objetivo de avaliar a diversidade de bactérias diazotróficas presentes em nódulos de acácia-negra foram semelhantes às análises descritas anteriormente, alterou-se apenas a composição da reação, não se fez uso de Master Mix® em nenhuma das reações. Além disso, utilizou-se o primer GTG5 (5´-GTGGTGGTGGTGGTG-3´). Os demais componentes e etapas da reação foram mantidos (Apêndice C).

Figura 12 - Leitura e interpretação das análises de PCR: A e B – Linhagens de trigo com presença e ausência de gene responsável pela qualidade de panificação: reações preparadas com primer By8 (imagem B editada); C e D – Linhagens de trigo com presença e ausência de gene responsável pela qualidade de panificação: reações preparadas com primer α-Secalin (imagem D editada).



Fonte: A autora, 2022.

Figura 13 - Leitura das análises de PCR em bactérias diazotróficas coletadas em nódulos de acácia-negra.



Fonte: A autora, 2022.

6.1.5 Quantificação de DNA de trigo

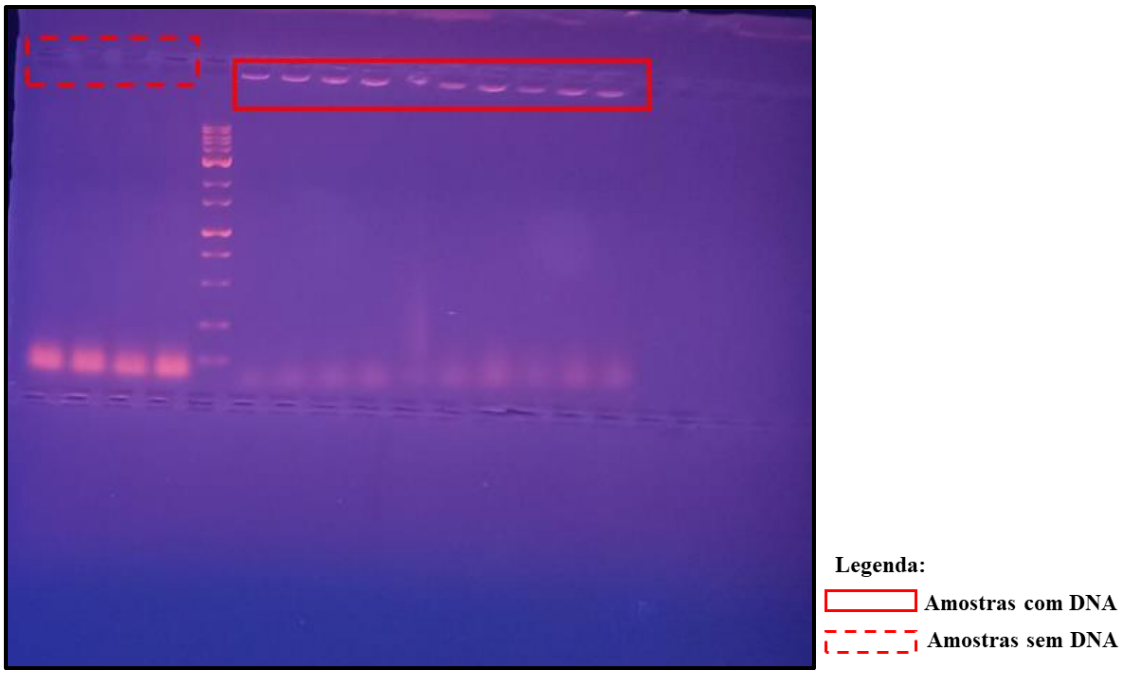
Segundo Oliveira *et al.* (2007), a qualidade do DNA pode ser quantificada e analisada por meio de gel de agarose com concentrações entre 0,8 a 1%. As amostras de DNA devem ser

dispostas nos poços do gel juntamente com amostras cuja concentração de DNA é conhecida. Posteriormente à eletroforese, o gel é corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta. Os resultados são analisados por meio de comparação das amostras utilizadas como padrões.

Para quantificação de DNA, inseriu-se no gel de agarose de 0,8% (1,6g de agarose para 200ml de solução tampão TAE), imerso em solução tampão dentro da cuba eletrolítica, as amostras de DNA das linhagens avaliadas e o corante de azul de bromofenol, além do marcador de peso molecular de 1Kb – separadamente. Ativou-se a corrente elétrica durante trinta minutos e, quando concluída a etapa de eletroforese, o resultado obtido foi interpretado no transiluminador (Figura 13). A necessidade da quantificação de DNA ocorreu devido ao elevado número de amostras com resultados negativos para o gene que confere qualidade a panificação, visto isso o procedimento se tornou indispensável para confirmar a presença ou ausência de DNA nas amostras.

Após a confirmação da presença de molécula de DNA, as amostras prosseguiam para as reações de PCR. Aquelas que apresentaram DNA ausente, foram identificadas para que novas extrações fossem realizadas.

Figura 14 - Resultado da quantificação de DNA extraído de sementes de trigo: à direita – amostras com presença de DNA, à esquerda – amostras com ausência de DNA.



Fonte: A autora, 2022.

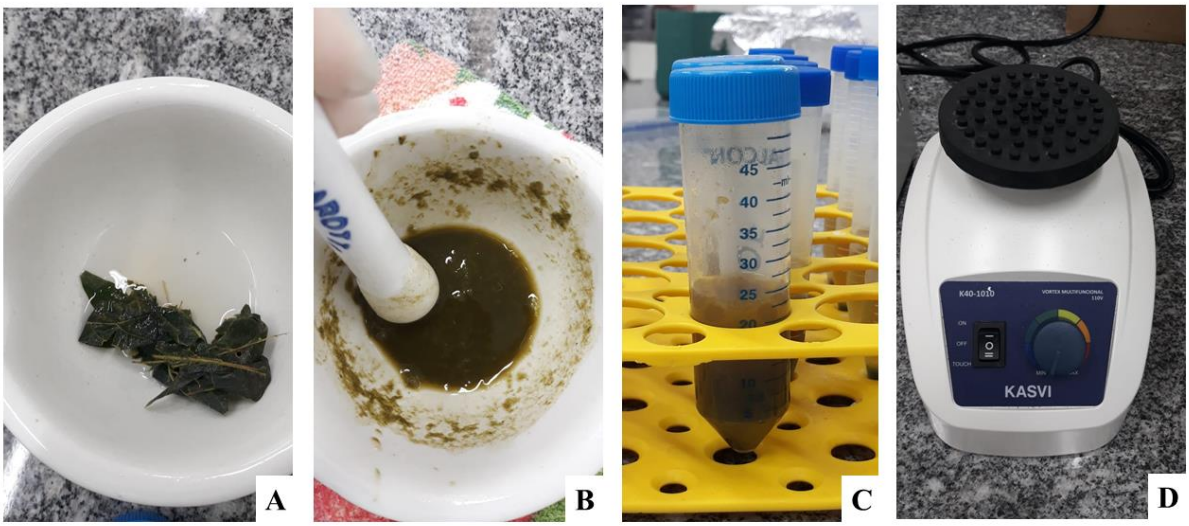
6.1.6 Determinação de aminoácido prolina

Além de análises de PCR, a acadêmica realizou a determinação de aminoácido prolina para cultura da soja (*Glycine max* L.) seguindo protocolo descrito por Bates *et al*. (1973).

A prolina é um aminoácido utilizado como parâmetro para identificar vegetais tolerantes à seca. A concentração de prolina nas folhas favorece a atividade fotossintética em períodos de escassez hídrica, tal mecanismo de adaptação é regulador da atividade osmótica haja vista que a região hidrofóbica do aminoácido se liga à região hidrofóbica das proteínas presentes nos vegetais, aumentando sua solubilidade e evitando a desnaturação das mesmas (ARAÚJO *et al*. 2018; SANTOS; CARVALHO, 2021).

A primeira etapa do procedimento consistiu em obtenção do extrato enzimático bruto de dez amostras de folhas de soja. Para isso, foi necessário pesar 1g de material vegetativo da espécie e depositá-lo em um cadinho. Depois da transferência do material, adicionou-se 5ml de ácido sulfosalicílico 3% para realizar a maceração do tecido vegetal. Após a finalização da maceração, completou-se o volume de ácido sulfosalicílico 3% para 25ml. O produto foi transferido para um tubo de Falcon e homogeneizado em agitador vórtex por aproximadamente cinco segundos (Figura 14).

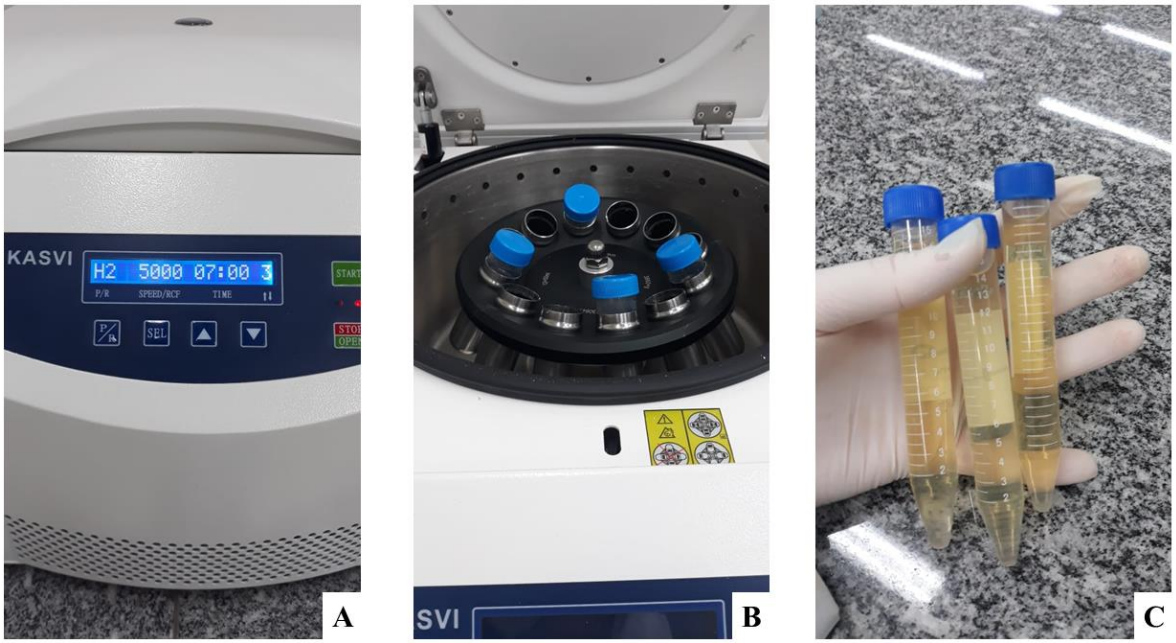
Figura 15 - Extração de prolina: A – Material vegetal (folha) de soja e ácido sulfosalicílico 3%; B – Material vegetal macerado; C – Produto da maceração de folhas de soja com adição de ácido sulfosalicílico (volume completado para 25ml); D - Vórtex utilizado para homogeneização das amostras.



Fonte: A autora, 2022.

Finalizada a homogeneização, os tubos ficaram em repouso sobre a bancada durante 15 minutos e, subsequente, permaneceram durante sete minutos em uma centrífuga com agitação de 5.000 rpm. Após a agitação, os tubos foram transportados novamente para bancada onde se transferiu 10ml do material sobrenadante para novos tubos de Falcon para armazená-los em congelador até a realização do etapa seguinte (Figura 15).

Figura 16 - Agitação do material extraído: A – Centrífuga programada para rotacionar 5.000 rpm durante sete minutos; B – Tubos alocados no interior da centrífuga; C – Sobrenadante, resultante da extração de prolina, transferido para novos tubos de Falcon.



Fonte: A autora, 2022.

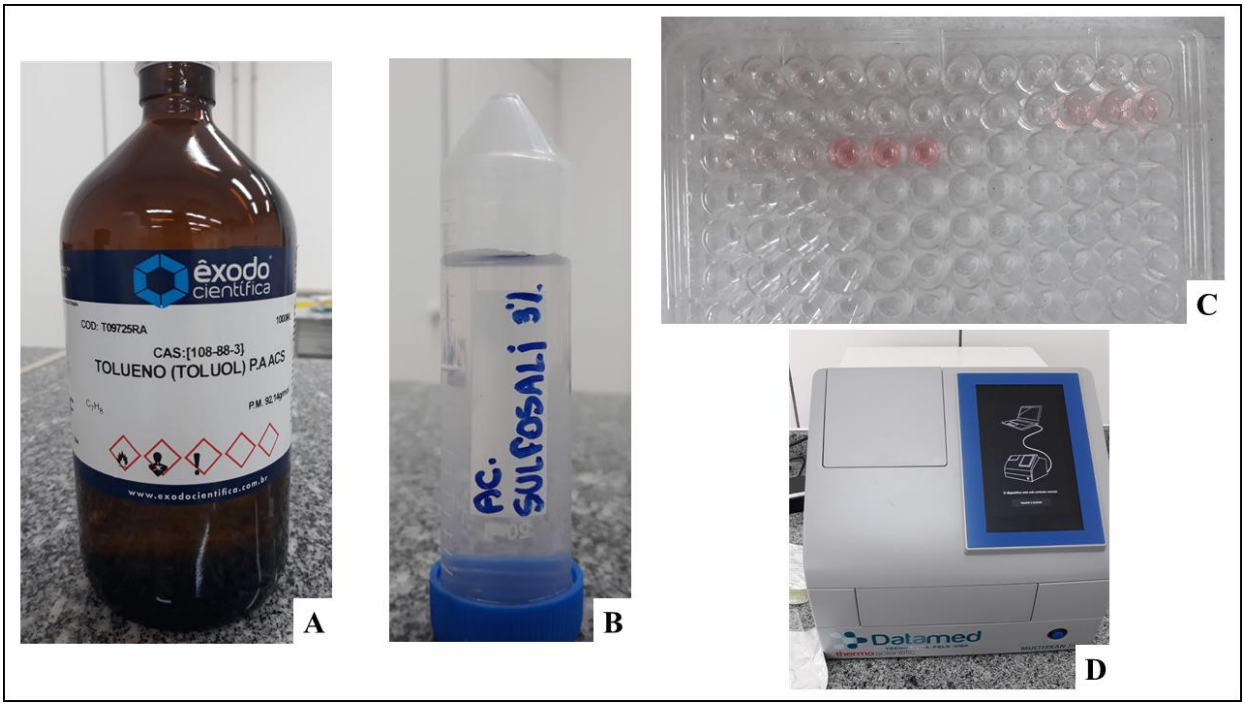
Prosseguindo com a preparação da atividade de determinação de prolina, a estagiária resgatou 2ml do sobrenadante extraído de folhas de plantas de soja e adicionou 2ml de ninhidrina ácida, bem como 2 ml de ácido acético glacial. As amostras – num total de 10 – foram mantidas em banho-maria fervente (aproximadamente 100ºC) durante uma hora (Figura 16), logo após foram resfriadas em banho de gelo por um período de 10 minutos.

Figura 17 - Reagente utilizados na determinação de prolina: A – Ninhidrina ácida; B – Ácido acético glacial. Aquecimento das amostras em banho-maria: C – Amostras submersas em água fervente; D – Equipamento para banho-maria a aproximadamente 100ºC.

Fonte: A autora, 2022.

Quando integralmente frias, adicionou-se 4ml de tolueno nos tubos que continham as amostras. Os mesmos foram transportados até o agitador vórtex no qual os componentes foram uniformizados por aproximadamente cinco segundos. Para o controle (branco), utilizou-se 2ml de ácido sulfosalicílico 3%, 2ml de ninhidrina ácida e 2ml de ácido acético. Por fim, as amostras foram submetidas a uma leitora de Elisa em um espectro de absorbância de 520nm (Figura 17).

Figura 18 - Conclusão da determinação de prolina: A -Tolueno e B – Ácido sulfosalicílico 3% adicionados nas amostras; C – Amostras arranjadas em placas para realizar a leitura; D – Equipamento Elisa para leitura das amostras.



Fonte: A autora, 2022.

6.2 ATIVIDADES EXTERNAS

6.2.1 Presença em apresentação de tese de doutorado

A acadêmica teve oportunidade de acompanhar uma defesa de tese de doutorado, haja vista que a supervisora de estágio, Doutora Glacy J. da Silva, detém vínculo com o meio acadêmico e participou como membro da banca avaliadora. Na ocasião, a estudante visitou a Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, situada no município de Marechal Cândido Rondon, Paraná, e assistiu à apresentação do trabalho acadêmico cujo escopo estava centralizado na utilização de bioestimulantes em oliveiras.

Figura 199 - Vista frontal da Universidade do Oeste do Paraná – Unioeste, localizada em Marechal Cândido Rondon, região oeste do Paraná.

Fonte: A autora, 2022.

6.2.2 Visitação de uma indústria de fertilizantes organominerais bioativos

Por intermédio do LagBio, oportunizou-se à acadêmica a visitação em uma indústria de fabricação de fertilizantes organominerais bioativos - BioResult. A sede da empresa é localizada no município de Toledo, na região oeste do estado do Paraná. Durante a visitação, a discente obteve acompanhamento da Engenheira Agrônoma e Diretora da empresa, Andreia Cristina Antonin, e da responsável técnica e Engenheira Agrônoma, Angelica Cristina Gois. A universitária se inteirou dos processo de fabricação e produção dos fertilizantes, dos parâmetros de qualidade analisados por laboratórios terceirizados, do controle de produção e avaliação de características físicas do produto acabado e dos procedimentos burocráticos e administrativos da empresa.

Segundo Rabelo (2015), fertilizantes organominerais são constituídos por compostos orgânicos, de origem animal e/ou vegetal, e minerais que sofrem processamento industrial. Entres os principais benefícios que os fertilizantes organominerais fornecem ao solo, destacam-se a ativação da biota do solo, o abastecimento de nutrientes às camadas edáficas, a retenção de umidade, bem como a otimização de outras características físicas do solo, tornando-se uma opção viável para substituição de fertilizantes formulados somente por elementos minerais (COSTA *et al*., 2018).

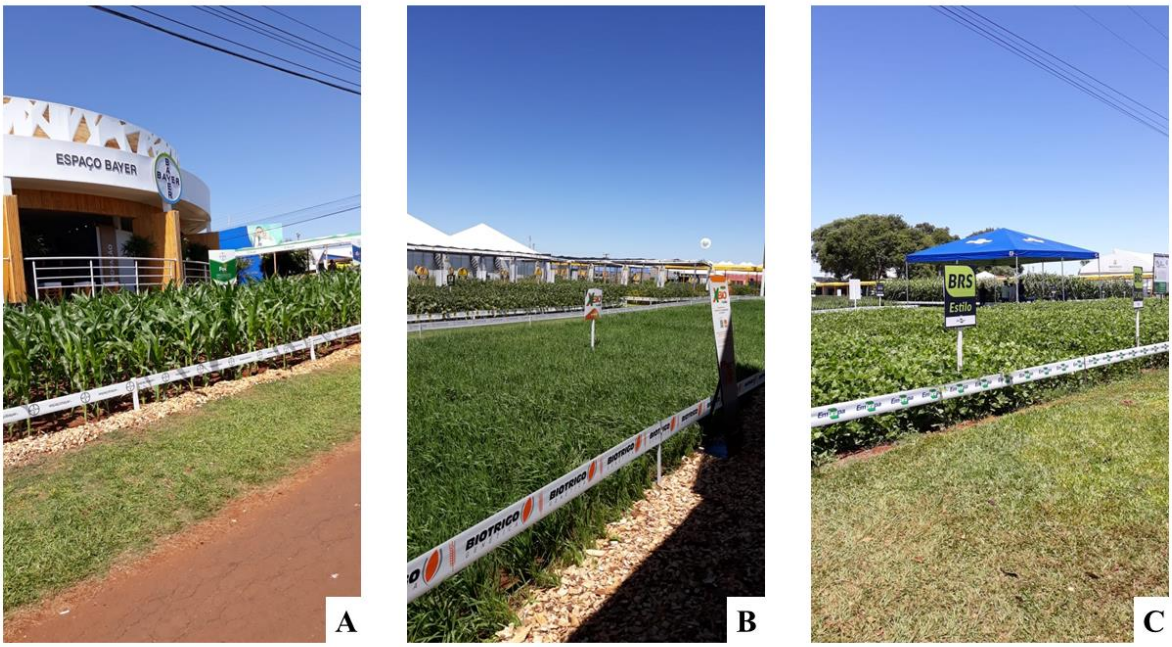
6.2.3 Participação do Show Rural COOPAVEL

Juntamente com a equipe da LagBio, a acadêmica acompanhou a 34ª edição do Show Rural Coopavel, feira de exposição na qual participam empresas e startups nacionais e internacionais com portifólio voltado ao agronegócio, que ocorreu entre os dias 07 e 11 de fevereiro de 2022 no município de Cascavel, Paraná (COOPAVEL, 2022). O evento contou com a participação de mais de 580 expositores e registrou um público superior a 285 mil pessoas que visitaram o evento nos cinco dias de exposição (CANAL RURAL, 2022).

Figura 20 - Show Rural Coopavel 2022: A e B – máquinas agrícolas em exposição; C – Vista panorâmica do evento; D – Slogan Show Rural Coopavel 2022.

Fonte: A autora, 2022.

Figura 21 - Estande dos expositores Show Rural Coopavel 2022: A – Empresa Bayer; B – Empresa Biotrigo; C – Embrapa.



Fonte: A autora, 2022.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final do estágio, foram realizadas pela acadêmica 417 análises de PCR para identificar linhagens de trigo qualificadas à panificação. Dessas, para 323 amostras se utilizou o primer By8, enquanto para 94 amostras o primer α-secalin.

Concerne às amostras nas quais se utilizou o primer By8, obteve-se 152 linhagens amplificadas, ou seja, apresentaram o gene que confere qualidade à panificação; e 171 linhagens não amplificadas - não apresentaram o gene alvo. Para todas as amostras amplificadas para o primer By8 (152) as reações foram preparadas com o componente Master Mix. Em contrapartida, das 171 amostras não amplificadas, 95 reações foram preparadas com Master Mix e 76 reações com Taq polimerase (Tabela 2). Ghazy *et al.* (2012) objetivaram identificar genótipos de trigo que possuem em seu genoma a presença da proteína HMW-GS em diferentes locos, entre eles o Glu-A1. Utilizando distintos primers e testando 29 genótipos de trigo, identificaram a presença do alelo By8 em sete genótipos (Lang, KSU 102, KSU 103, KSU 105, KSU 106, Debera e L11-21) utilizando o primer By8, o mesmo amplificou fragmento de 527 pb, assim como nas análises realizadas durante o estágio.

Tabela 2 – Resultados obtidos a partir de reações de PCR formuladas com primer By8.

Primer/Componente da reação de PCR	
By8/Master Mix	
Total de amostras com Master Mix:	247
Nº amostras amplificadas	Nº amostras não amplificadas
152	95
By8/Taq polimerase	
Total de amostras com Taq Polimerase:	76
Nº amostras amplificadas	Nº amostras não amplificadas
0	76
Nº amostras amplificadas para By8:	152
Nº amostras não amplificadas para By8:	171
Nº de amostras total para By8:	323

Fonte: A autora, 2022.

Já para as análises em que se utilizou o primer α-Secalin, obteve-se 75 amostras amplificadas, destas, 37 reações foram preparadas com Master Mix e 38 reações com Taq polimerase.

Em cenário oposto, 19 amostras não foram amplificadas, sendo que em todas se utilizou o componente Master Mix durante o preparo das reações (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados obtidos a partir de reações de PCR formuladas com primer α-Secalin.

Primer/Componente da reação de PCR	
α-Secalin/Master Mix	
Total de amostras com Master Mix:	56
Nº amostras amplificadas	Nº amostras não amplificadas
37	19
α-Secalin/Taq polimerase	
Total de amostras com Taq Polimerase:	38
Nº amostras amplificadas	Nº amostras não amplificadas
38	0
Nº amostras amplificadas para α-Secalin:	75
Nº amostras não amplificadas para α-Secalin:	19
Nº de amostras total para α-Secalin:	94

Fonte: A autora, 2022.

Quanto às análises de PCR cujo objetivo era definir a diversidade de bactérias diazotróficas em nódulos de acácia-negra, a estagiária realizou 96 análises. A identificação e interpretação dos resultados ficou sob responsabilidade do pós-graduando detentor do projeto de pesquisa, por este motivo a acadêmica não teve acesso aos resultados obtidos com as análises. Moura *et al.* (2017) avaliaram a diversidade de microrganismos coletados na zona radicular de solos que mantinham sobre a superfície três leguminosas arbóreas: acácia-negra, maricá e bracatinga em uma região degradada pela mineração de carvão. Os autores constataram a presença de bactérias do gênero *Rhizobium* associadas à acácia-negra.

Em relação à atividade de quantificação de DNA com a finalidade de detectar a presença ou ausência do material genético nas amostras extraídas de sementes de trigo, a estudante analisou 815 amostras, cada qual representava uma linhagem diferente. Em 344 amostras não se observou a presença de DNA, enquanto em 471 amostras o DNA das linhagens de trigo estava presente. Os dados obtidos otimizaram as atividades, uma vez que se extraiu novamente o DNA apenas das amostras que não apresentaram o ácido desoxirribonucleico (nº 344).

Referente às atividades desenvolvidas com escopo na determinação do teor do aminoácido prolina na cultura da soja, os resultados obtidos não puderam ser divulgados haja vista que

as análises foram realizadas acerca de experimentos inéditos, não sendo autorizada pelo cliente a publicação dos dados. No entanto, Araújo *et al*. (2018) avaliaram o teor de prolina em 12 cultivares de girassol cultivados em diferentes ambientes. Os autores obtiveram valores variando entre 1,68 µg/g a 24,03 µg/g, sendo que os maiores teores foram encontrados em plantas submetidas a condições de estresse hídrico. De forma semelhante, Santos & Carvalho (2021) constataram, por meio de experimentos, que o maior acúmulo de prolina em laranjeiras enxertadas no limoeiro “Cravo” foram verificados em período seco.

8 CONCLUSÃO

A realização do estágio proporcionou à acadêmica o enriquecimento de informações referentes aos campos de biologia molecular e biotecnologia, bem como a experimentação prática de análises laboratoriais não praticadas durante o período de graduação. Além disso, a vivência do Estágio Curricular Obrigatório proporcionou para a estudante a visitação em eventos relevantes do setor do Agronegócio, bem como o conhecimento do funcionamento de uma cadeia de produção de fertilizantes organominerais. Em adição, o convívio com os diversos profissionais durante o período de estágio proporcionou à estagiária a troca de informações e experiências fundamentais para formação profissional e pessoal.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a contextualização da quantificação de DNA de trigo, ressalta-se que, apesar das análises serem guiadas por protocolos validados por pesquisadores, empecilhos surgiram no decorrer das atividades, entre eles o expressivo número de amostras que não apresentaram o gene de trigo que confere qualidade a panificação. Várias hipóteses foram formuladas para identificar possíveis falhas nas reações de PCR, no entanto, devido à complexidade dos fatores que norteiam o campo da biologia molecular, fez-se necessário realizar novos testes para localizar os lapsos e corrigi-los para então prosseguir as atividades com êxito.

Neste cenário, a cautela durante as etapas de preparação das análises foi fundamental para que os resultados fossem entregues com precisão aos cliente. Para isso, a equipe do laboratório frisou a relevância de não contaminar amostras com materiais genéticos oriundos de linhagens diferentes, sugeriu a repetição de reações quando os resultados se apresentaram duvidosos, discorreu a importação de esterilizar os materiais reaproveitáveis e de realizar a identificação das amostras conforme suas respectivas linhagens. Em adição, os insumos utilizados nas análises, especialmente em metagenômica, apresentam um custo de comercialização elevado tornando as análises onerosas o que evidencia a importância de acurácia durante os processos, visando minimizar os riscos de se obter resultados indesejados e prejuízos financeiros.

Durante todo o período de estágio, a supervisora, assim como as demais sócias do laboratório, enfatizaram a obrigatoriedade da utilização de EPI's e o cumprimento de regras de segurança (jaleco com mangas compridas, sapatos fechados, luvas para o manuseio de substâncias químicas tóxicas, cabelos envoltos por toucas e/ou amarrados), essencialmente em procedimentos utilizando brometo de etídio.

Por fim, haja vista que a LagBio foi pioneira na realização de análises metagenômicas no Brasil, destaca-se a lacuna no nicho de laboratórios com escopo em análises moleculares e biotecnológicas. Como consequência, o desenvolvimento de tecnologias, essencialmente àquelas voltadas ao melhoramento genético de plantas cultivadas, bem como de novos serviços que envolvam técnicas de biologia molecular podem se estagnar em decorrência da dificuldade de alcançar os benefícios deste campo de pesquisa.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, Stela Braga *et al*. Teores de prolina em cultivares de girassol. *In*: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICO E PÓS-GRADUAÇÃO, 8., 2018, Aracaju. **Anais eletrônicos [...].** Aracaju: EMBRAPA, 2018. p. 48-51. Disponível em: https://www.embrapa.br/en/tabuleiros-costeiros/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1099362/teores-de-prolina-em-cultivares-de-girassol. Acesso em: 18 fev. 2022.

BRAMMER, Sandra Patussi *et al*. A interação da biotecnologia com os recursos genéticos vegetais. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, 2021. 34 p. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 196).

BROCA, Ângela. **Estudo da qualidade do trigo e da farinha de trigo destinada a panificação em um moinho no sul do Brasil**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, 2021.

CAMPOS, Luiz Felipe Lopes *et al*. Eficiência de métodos de extração de DNA de tecido foliar de espécies transgênicas de *Glycine max* e *Zea mays*. *In*: FEPEG, 12., 2018. Montes Claros. **Anais eletrônicos [...].** Montes Claros: Unimontes, 2018. Disponível em <http://www.fepeg2018.unimontes.br/anais/ver/3324f215-d852-4a8c-8992-b47182cce712>. Acesso em: 16 mai. 2022

CANAL RURAL. **Show Rural Coopavel encerra edição 2022 com faturamento recorde de R$ 3,2 bi**. [*S.l.*, 2022]. Disponível em: https://www.canalrural.com.br/noticias/agricultura/show-rural-coopavel-encerra-edicao-2022-com-faturamento-recorde-de-r-32-bi/. Acesso em: 9 mar. 2022.

CARRER, Helaine *et al*. Biotecnologia na agricultura. **Revista Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, 2010.

CALVO, Éberson Sanches. **Biotecnologia e o melhoramento genético de plantas**. Londrina: Embrapa-CNPSo, 1998. 20 p. (Embrapa CNPSo. Documentos, 114).

COOPAVEL. **Show Rural COOPAVEL**. [*S.l.*, 2022]. Disponível em: https://showrural.com.br/edicoes/2022/. Acesso em: 28 mar. 2022.

COSTA, Flávio de Kassius Domingos *et al*. Desempenho agronômico da soja convencional cultivada com fertilizantes organomineral e mineral. **Nucleus**, [*S.l.*], v. 15, n. 2, out. 2018. DOI: 10.3738/1982.2278.2902. Disponível em: http://www.nucleus.feituverava.com.br/index.php/nucleus/article/view/2902. Acesso em: 14 jan. 2022.

DIAS, Cibelle Santos *et al*. Comparação de protocolos para extração de DNA genômico de Calotropis procera Ait. R. Br. (Apocynaceae: Asclepiadoideae). **Multi-Science Journal**, [*S.l.*], v. 1, n. 13, 2018. Disponível em: https://www.ifgoiano.edu.br/periodicos/. Acesso em: 15 abr. 2022.

DIAS, Renata de Oliveira. **Perfil protéico e uso de marcadores moleculares relacionados à qualidade de panificação em trigo**. 2010. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

FERREIRA, Cibelle Christine Brito *et al*. Biotecnologia: aplicação da inovação tecnológica a favor do desenvolvimento por meio do uso de organismos geneticamente modificados. *In*: ENCONTRO INTERNACIONAL DE GESTÃO, DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO, 4., 2020. [*S.l.*]. **Anais eletrônicos [...]**. [*S.l.*]: UFMS, 2020. Disponível em: https://periodicos.ufms.br/index.php/EIGEDIN/article/view/11108. Acesso em: 20 fev. 2022.

FERRO, Andressa Correia *et al*. Agricultura transgênica como ferramenta para o desenvolvimento sustentável e econômico. **Diversitas Journal**, Santana do Ipanema, v. 6, n. 2, abr./jun. 2021. DOI: 10.17648/diversitas-journal-v6i2-1775. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/352141284_Agricultura_Transgenica_como_Ferramenta_para_o_Desenvolvimento_Sustentavel_e_Economico. Acesso em: 12 abr. 2021.

GAMBIM, E. *et al*. Identificação de gluteninas de alto peso molecular em linhagens de trigo. *In:* MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA TRIGO, 4., 2008, Passo Fundo. **Anais eletrônicos [...]**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do94_3.htm. Acesso em: 27 mai. 2022.

GHAZY, Abdel-Halim *et al*. Molecular screening of high molecular weight glutenin genes in spring bread wheat genotypes in Saudi Arabia. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Helsinki, v. 10, n. 1, 2012.

GNOCATO, Francisco *et al*. **Guia de qualidade da farinha**. [*S.l.*]: Biotrigo, 2022.

GUARIENTI, Eliana Maria. **Qualidade industrial do trigo**. 2. ed. Passo Fundo: Embrapa – CNPT, 1996.

GUIMARÃES, Claudia Teixeira. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. *In*: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 25., 2004, Cuiabá. **Anais eletrônicos [...].** Cuiabá: EMBRAPA, 2004. Disponível em: https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/488244/aplicacao-de-marcadores-moleculares-no-melhoramento-genetico. Acesso em: 26 mai. 2022.

HAAS, Dionei Joaquim; TORRES, Ana Caroline Doyle. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, [*S.l.*], ano 14, n. 26, jan. 2016.

HEPP, Diego; NONOHAY, Juliana Schmitt. A importância das técnicas e análises de DNA. **Revista de Educação, Ciência e Tecnologia do IFRS**, Porto Alegre, v. 3, n. 2, jun./dez. 2016.

MARTINS, Alejandra. **A descoberta nas fontes termais de Yellowstone, nos EUA, que se tornou chave para os testes da covid-19**. [*S.l.*, 2020]. Disponível em: https://www.bbc.com/portuguese/brasil-52539425. Acesso em: 20 mai. 2022.

MITTELMANN, Andréa *et al*. Herança de caracteres do trigo relacionados à qualidade de panificação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 5, maio 2000.

MOURA, Ginaini Grazielli Doin. **Caracterização de rizóbios isolados de solo degradado pela mineração de carvão sob leguminosas arbóreas**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

NAÇÕES UNIDAS BRASIL. **População mundial deve chegar a 9,7 bilhões de pessoas em 2050, diz relatório da ONU**. [Brasília, 2019]. Disponível em: https://brasil.un.org/pt-br/83427-populacao-mundial-deve-chegar-97-bilhoes-de-pessoas-em-2050-diz-relatorio-da-onu#:~:text=A%20popula%C3%A7%C3%A3o%20mundial%20deve%20crescer,segunda%2Dfeira%20(17). Acesso em: 12 mai. 2022.

NEPUCEMO, Alexandre Lima; DOSSA, Derli; FARIAS, José Renato Bouças. Biotecnologia na agricultura: qual caminho o Brasil deve seguir?. **Revista de Política Agrícola**, [*S.l.*], ano. 16, n. 4, out./nov./dez. 2007. Disponível: https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/124727/biotecnologia-na-agricultura-qual-caminho-o-brasil-deve-seguir. Acesso: 2 abr. 2022.

OLIVEIRA, Márcia Cristina de Sena *et al*. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. E-book. Disponível em: https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/48295/fundamentos-teoricos-praticos-e-protocolos-de-extracao-e-de-amplificacao-de-dna-por-meio-da-tecnica-de-reacao-em-cadeia-de-polimerase#:~:text=Publica%C3%A7%C3%B5es-,Fundamentos%20te%C3%B3ricos%2Dpr%C3%A1ticos%20e%20protocolos%20de%20extra%C3%A7%C3%A3o%20e%20de%20amplifica%C3%A7%C3%A3o,TIMOTEO%2C%20W.%20H.%20B.%3B%20BELICUAS%2C%20S.%20N.%20J. Acesso em: 25 fev. 2022.

OLIVEIRA, Alessandro Paiva de; FERREIRA, Bruno Santos. Biotecnologia aliada da agricultura e na produtividade da soja. **Revista Científica Eletrônica de Ciências Aplicadas da FAIT**, [*S.l.*], n. 2, nov. 2020.

RABELO, Kassia Cristina Caldas. **Fertilizantes organomineral e mineral**: aspectos fitotécnicos na cultura do tomate industrial. 2015. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

REGITANO, Luciana Correia de Almeida. Introdução à análise de marcadores moleculares. *In*: REGITANO, L.C. de A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.25-39.

REINIGER, Lia Rejane Silveira *et al*. Reciclagem de agarose em laboratórios de biologia molecular. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1603-1605, set./out. 2004.

ROMPKOVSKI, Cintia Stadtlober. **Emprego de inóculo líquido para elaboração de vinho em escala industrial**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

SANTOS, Renata M. E.; CARVALHO, Luciana M. Doses de adubação nitrogenada e teor de prolina em laranjeiras 'Pera'. *In*: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA TABULEIROS COSTEIRO, 10., 2021. Aracaju. **Anais eletrônicos [...]**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiro, 2021. Disponível em: https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1138524. Acesso em: 18 fev. 2022.

SANTOS, Vinicius Sartor; WIETHOLTER, Paula. Contribuições da engenharia genética no tratamento de doenças. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 3, mar. 2021.

SCHNEIDER, Theodoro *et al*. Biologia molecular aplicada à ciência das plantas daninhas. **Revista Brasileira de Herbicidas**, [*S.l.*], v. 17, n. 1, jan./mar. 2018.

SILVA, Andressa Fernanda *et al*. **Reação em Cadeia da Polimerase – PCR**. [*S.l*: 2016]. Disponível em: https://www.studocu.com/pt-br/document/universidade-de-itauna/biofisica-apl-medicina/31-artigo-sobre-reacao-em-cadeia-da-polimerase-pcr/13725941. Acesso em: 19 mai. 2022.

SILVA, Renan Gonçalves Leonel da; COSTA, Maria Conceição da. A emergência da biologia molecular no estado de São Paulo, 1952-1970. **Revista Tecnologia e Sociedade**, [*S.l.*], v. 14, n. 13, mai./ago. 2018.

SPODOLARE, Sabrina Fortini. **Classificação de genótipos de trigo usando espectroscopia de infravermelho próximo e quimiometria**. 2019. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2019.

TRINDADE, Natalí da Silva; FORTES, Iaci Gama. RT-PCR: importância e limitações no diagnóstico da covid-19. **Brazilian Journal of Development**¸ Curitiba, v.7, n.8, agosto 2021.

VANCINI, Camila *et al*. Impacto dos alelos de gluteninas de alto peso molecular sobre a qualidade tecnológica de trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 54, jan./dez. 2019.

VARGAS, Bruna Damaceno *et al*. Biotecnologia e alimentos geneticamente modificados: uma revisão. **Revista Contexto e Saúde**, [*S.l.*], v. 18, n. 35, jul./dez. 2018.

VIERIA, Daniel Perez. **Técnicas de PCR: aplicações e padronização de reações**. [São Paulo: 2022]. Disponível em: https://www5.usp.br/?s=T%C3%A9cnicas+de+PCR%3A+Aplica%C3%A7%C3%B5es+e+Padroniza%C3%A7%C3%A3o++de+Rea%C3%A7%C3%B5es. Acesso em: 19 mai. 2022.

WILSON, Edward O. **Cartas a um jovem cientista**. [*S.l.*]: Companhia das Letras, 2015. E-book. Disponível em: https://www.google.com.br/books/edition/Cartas_a_um_jovem_cientista/ux6_CwAAQBAJ?hl=pt-BR&gbpv=0. Acesso em: 15 fev. 2022.

YASSITEPE, Juliana Erika de Carvalho Teixeira *et al*. **Genômica aplicada às mudanças climáticas: biotecnologia para a agricultura digital**. Brasília: Embrapa, 2020. E-book. Disponível em: https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publica-cao/1126213/agricultura-digital-pesquisa-desenvolvimento-e-inovacao-nas-cadeias-produti-vas. Acesso em: 2 abr. 2022.

APÊNDICE A - Protocolo simplificado para preparo de soluções utilizadas no procedimento de extração de DNA genômico de trigo (*Triticum* spp.).

Soluções	Soluto	Quantidade (g)	Solvente	Quantidade (ml)	Metodologia aplicada
Tris HCl 1M pH8*	Tris	126,14	Água destilada	1000	Dissolveu-se Tris em 800ml de água destilada com auxílio de agitador magnético. pH ajustado para 8 com adição de HCl. Volume completado para 1000ml.
NaCl 5M**	NaCl	146,10	Água destilada	500	Adicionou-se vagarosamente NaCl em aproximadamente 400ml de água destilada. Após dissolvido, completou-se o volume para 500ml.
EDTA 0,5M*	EDTA	146,10	Água destilada	1000	Dissolveu-se EDTA em 800ml de água destilada com auxílio de agitador magnéti-co. pH ajustado para 8 com adição de NaOH. Volume completado para 1000ml.
SDS 10%**	SDS	50	Água destilada	500	Adicionou-se 400ml de água destilada em um becker mantendo-o sobre um agitador magnético. Acrescentou-se vagarosamente o SDS. Quando totalmente dissolvido, o volume foi completado para 500ml.
TE*	Tris EDTA	10*** 2***	Água destilada	500	Inseriu-se os volumes de Tris e EDTA em uma proveta, completou-se o volume para 1000 ml com água destilada.

*Solução armazenada em geladeira.

** Solução armazenada em temperatura ambiente.

***Quantidade em mililitros (ml).

Fonte: A autora, 2022.

APÊNDICE B – Caracterização das reações de PCR para identificação de linhagens de trigo qualificadas à panificação: reações preparadas com reagente Master Mix.

PCR para cultura do trigo - qualidade de panificação				
Componente	Quantidade (µl)			Ciclo: 30x
	Para 1 reação	Para 19 reações	Para 38 reações	
Master mix	2	42	80	1 - 95.0ºC por 3'00"
Primer F' (α-secalin)	1	21	40	2 - 94.0ºC por 45"
Primer R' (α-secalin)	1	21	40	3 - 65.0ºC por 30"
BSA	0,5	10,5	20	4 - 72.0ºC por 01'00"
DMSO	0,9	18,9	36	5 - 72.0ºC por 7'00"
Água	3,6	75,6	144	6 - 10.0ºC ∞
DNA	2	2	2	

PCR para cultura do trigo - qualidade de panificação				
Componente	Quantidade (µl)			Ciclo: 38x
	Para 1 reação	Para 19 reações	Para 38 reações	
Master mix	2	42	80	1 - 95.0ºC por 30"
Primer F' (By8)	1	21	40	2 - 94.0ºC por 30"
Primer R' (By8)	1	21	40	3 - 64.0ºC por 30"
BSA	0,5	10,5	20	4 - 72.0ºC por 01'30"
DMSO	0,9	18,9	36	5 - 72.0ºC por 10'00"
Água	3,6	75,6	144	6 - 10.0ºC ∞
DNA	2	2	2	

Fonte: A autora, 2022.

APÊNDICE C – Caracterização das reações de PCR para identificação de linhagens de trigo qualificadas à panificação: reações preparadas com Taq polimerase.

PCR para cultura do trigo - qualidade de panificação				
Componente	Quantidade (µl)			Ciclo: 30x
	Para 1 reação	Para 19 reações	Para 38 reações	
Água	4,7	98,7	188	1 - 95.0ºC por 3'00"
Solução tampão	1	21	40	2 - 94.0ºC por 45"
MgCl2	0,6	12,6	24	3 - 65.0ºC por 30"
DNTP	0,3	6,3	12	4 - 72.0ºC por 01'00"
Primer F' (α-secalin)	0,4	8,4	16	5 - 72.0ºC por 7'00"
Primer R' (α-secalin)	0,4	8,4	16	6 - 10.0ºC ∞
BSA	0,5	10,5	20	
DMSO	0,9	18,9	36	
Taq polimerase	0,2	4,2	8	

PCR para cultura do trigo - qualidade de panificação				
Componente	Quantidade (µl)			Ciclo: 38x
	Para 1 reação	Para 19 reações	Para 38 reações	
Água	4,7	98,7	188	1 - 95.0ºC por 30"
Solução tampão	1	21	40	2 - 94.0ºC por 30"
MgCl2	0,6	12,6	24	3 - 64.0ºC por 30"
DNTP	0,3	6,3	12	4 - 72.0ºC por 01'30"
Primer F' (By8)	0,4	8,4	16	5 - 72.0ºC por 10'00"
Primer R' (By8)	0,4	8,4	16	6 - 10.0ºC ∞
BSA	0,5	10,5	20	
DMSO	0,9	18,9	36	
Taq polimerase	0,2	4,2	8	

Fonte: A autora, 2022.

APÊNDICE D – Caracterização das reações de PCR para identificação de diversidade de bactérias diazotróficas presentes em nódulos de acácia-negra.

PCR para análise de diversidade de bactérias				
Componente	Quantidade (µl)			Ciclo: 30x
	Para 1 reação	Para 19 reações	Para 38 reações	
Água	4,4	92,4	176	1 - 94.0ºC por 5'00"
Tampão	1,1	23,1	44	2 - 94.0ºC por 20"
MgCl2	1	21	40	3 - 52.0ºC por 30"
DNTP	0,45	9,45	18	4 - 72.0ºC por 01'00"
BSA 10%	0,27	5,67	10,8	5 - 72.0ºC por 10'00"
DMSO	0,55	11,55	22	6 - 16.0ºC ∞
Primer GTG 5	2	42	80	
Taq polimerase	0,30	6,3	12	
DNA	2	2	2	

Fonte: A autora, 2022.