

Metodologia de Coleta de Amostras, Extração de DNA e Obtenção de Marcadores Moleculares para Estudos de *Mahanarva spectabilis*



Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 161

Metodologia de Coleta de Amostras, Extração de DNA e Obtenção de Marcadores Moleculares para Estudos de *Mahanarva spectabilis*

Silvana Vieira de Paula-Moraes

Fábio Gelape Faleiro

Graciele Bellon

Keize Pereira Junqueira

Gervásio Silva Carvalho

Alexander Machado Auad

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73310-970 Planaltina, DF

Fone: (61) 3388-9898

Fax: (61) 3388-9879

<http://www.cpac.embrapa.br>

sac@cpac.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *José de Ribamar N. dos Anjos*

Secretária-Executiva: *Maria Edilva Nogueira*

Supervisão editorial: *Maria Helena Gonçalves Teixeira*

Revisão de texto: *Maria Helena Gonçalves Teixeira*

Normalização bibliográfica: *Shirley da Luz Soares*

Capa: *Wellington Cavalcanti*

Editoração eletrônica: *Wellington Cavalcanti*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza*

Jaime Arbués Carneiro

Impresso no Serviço Gráfico da Embrapa Cerrados

1ª edição

1ª impressão (2006): tiragem 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação na publicação.

Embrapa Cerrados.

P324m *Paula-Moraes, Silvana Vieira de.*

Metodologia de coleta de amostras, extração de DNA e obtenção e marcadores moleculares para estudos de *Mahanarva spectabilis* / Silvana Vieira de Paula-Moraes, Fábio Gelape Faleiro, Graciele Bellon. – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2006.

19 p.— (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Cerrados, ISSN 1676-918X ; 161).

1. Marcador molecular. 2. Cigarrinha das pastagens. I. Faleiro, Fábio Gelape. II. Bellon, Graciele. III. Série.

572.8 - CDD 21

© Embrapa 2006

Sumário

Resumo	5
Abstract.....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	9
Coleta, identificação e armazenamento de espécimes	9
Extração e quantificação do DNA para ninfas e adultos de <i>Mahanarva</i>	10
Amplificação do DNA via RAPD	11
Análise dos dados	11
Resultados e Discussão.....	12
Validação de protocolo de armazenamento de amostras, extração de DNA e obtenção de marcadores moleculares para ninfas e adultos de <i>Mahanarva spectabilis</i>	12
Similaridade genética entre ninfas e adultos de <i>Mahanarva</i> coletados no mesmo local, como subsídio para amostragem populacional.....	13
Conclusões.....	16
Agradecimentos	17
Referências	17

Metodologia de Coleta de Amostras, Extração de DNA e Obtenção de Marcadores Moleculares para Estudos De *Mahanarva Spectabilis*

Silvana Vieira de Paula-Moraes¹; Fábio Gelape Faleiro²; Graciele Bellon³; Keize Pereira Junqueira⁴; Gervásio Silva Carvalho⁵; Alexander Machado Aua⁶

Resumo

Relatos recentes têm indicado a ocorrência do gênero *Mahanarva* e da espécie *Mahanarva spectabilis* em pastagens de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, na região de Cerrado e em áreas de transição, localizadas na Amazônia Legal. Estudos sobre o gênero *Mahanarva* em gramíneas forrageiras, no Brasil, carecem ainda de informações relacionadas ao impacto econômico, à identificação na categoria de espécie, a aspectos da sua bioecologia, à sua distribuição geográfica, bem como relacionadas a dados sobre a variabilidade genética inter e intra-específica. Considerando que, para esses estudos, é necessária a amostragem de ninfas e de adultos em determinada área, o que depende do conhecimento da identidade taxonômica, este trabalho teve o objetivo de validar o protocolo de armazenamento de amostras de cigarrinha-das-pastagens e da extração de DNA, além de analisar a similaridade genética entre ninfas e adultos de *Mahanarva spectabilis* coletados no mesmo local, como subsídio para inferências sobre a identidade taxonômica de ninfas. Os resultados desse trabalho oferecem as bases para futuros estudos da variabilidade genética, do mapeamento de ocorrência do gênero *Mahanarva* em gramíneas forrageiras, bem como para estudos populacionais e de ocorrência de danos causados por *M. spectabilis*.

Termos para indexação: marcadores RAPD, amostragem populacional, *Mahanarva spectabilis*, cigarrinha-das-pastagens.

¹ Eng. Agrôn., M.Sc., Embrapa Cerrados, silvana@cpac.embrapa.br

² Eng. Agrôn., Dr., Embrapa Cerrados, ffaleiro@cpac.embrapa.br

³ Graduação em Agronomia, bolsista do CNPq na Embrapa Cerrados.

⁴ Doutoranda em Fitopatologia, bolsista da Universidade de Brasília na Embrapa Cerrados.

⁵ Professor titular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681 – Partenon – 90619900 – Porto Alegre, RS, Caixa Postal 149.

⁶ Eng. Agrôn., Dr., Embrapa Gado de Leite. Rua Eugênio do Nascimento, 610 - Dom Bosco – 36038-330 – Juiz de Fora, MG.

Methodology of Collection of Samples, Extraction of DNA and Obtaining of Molecular Markers for Studies of *Mahanarva Spectabilis*

Abstract

Recent studies have indicated the occurrence of the spittlebug Mahanarva in pastures of Brachiaria brizantha cv. Marandu, in Cerrados and areas of transiition, located in the Amazônia Legal and was identified the Mahanarva spectabilis species. Studies on the Mahanarva pastures of Brachiaria in Brazil, still lack of more information related to the economic impact, to the identification in level of species, aspects of its bioecology, its geographic distribution, as well as information on the genetic inter and intra-specific variability. Considering that for these studies, the sampling of nymphs becomes necessary and adults in determined area, for which the knowledge of the taxonomy identification it is a necessity, this work had the objective first to validate protocol of DNA extration of M. spectabilis in amount and adequate quality to the attainment of markers, stored in different conditions. Also it had the objective to analyze the genetic similarity between nymphs and collected M. spectabilis adults of in the same local, as information for inferences on the taxonomy identification of the nymphs and on methodology of sampling of this pest. The DNA genomic of M. spectabilis adults and nymphs of just-collected and stored in alcohol 100 % was extracted using the related protocol. The results of this work offer the bases for future studies of the genetic variability, of the mapping of occurrence of the Mahanarva in grassy pastures, population studies and occurrence of actual damages for M. spectabilis.

Index terms: markers RAPD, population sampling, Mahanarva spectabilis.

Introdução

Diversos fatores favoreceram o desenvolvimento do setor de carnes no Brasil e, conseqüentemente, ocasionaram a sua modernização. O desenvolvimento de novas tecnologias por centros de pesquisas, o processo de profissionalização do mercado (desde os fornecedores de insumos até o varejo) e a segmentação da produção (alianças comerciais) e do consumo foram importantes para a cadeia produtiva da bovinocultura de corte brasileira, qualificando-a para os mercados nacional e internacional. A partir do ano 2000, o cenário mundial foi muito favorável às exportações brasileiras em decorrência de alguns acontecimentos, como: o aumento das áreas livres de febre aftosa no Brasil e a implantação de sistemas de controle de carne produzida no País, visando atender às exigências dos mercados externos; as sucessivas crises de abastecimento mundial provocadas pelo aparecimento da encefalopatia espongiforme bovina (EEB) nos rebanhos europeus, que favoreceu a exportação da carne bovina brasileira, por ser quase que exclusivamente originada de animais criados sob sistema de pastejo (POLANQUINI et al., 2006).

Esse segmento da economia brasileira tem como base para alimentação do rebanho pastagens de gramíneas do gênero *Brachiaria*, que se destaca como o gênero de capim mais plantado no Brasil (80 % das áreas com pastagens cultivadas). A característica que justifica sua ampla utilização é a elevada capacidade de adaptação às diferentes condições de solo e de clima, o que lhe assegura produções satisfatórias, mesmo em solos com baixa e média fertilidade (SOARES FILHO, 1996), como são os de Cerrado.

Entretanto, a implantação de extensas áreas de pastagens, principalmente das espécies *Brachiaria decumbens* e *B. humidicola*, favoreceram a ocorrência de surtos populacionais de cigarrinha-das-pastagens (COSENZA, 1989), o que torna essa praga a de maior importância no cultivo de *Brachiaria* e também a principal de gramíneas forrageiras na América Tropical (VALÉRIO et al., 1997). Segundo Peck (2002), os gêneros da família Cercopidae (Hemiptera) que atacam gramíneas nas zonas Neotropicais são: *Aeneolamia* Fennah; *Deois* Fennah; *Isozulia* Fennah; *Prosapia* Fennah; *Sphenorhina* Amyot & Serville; *Tunaima* Fennah e *Zulia* Fennah. Gallo et al. (2002) citam as espécies *Deois flavopicta* (Stal.), *D. shach* (Stal.) e *Zulia entreriana* (Fabr.) como as cigarrinhas-das-pastagens de maior importância econômica no Brasil. Carvalho (1995), avaliando a morfologia de espécimes do subgênero *Notozulia*, constatou

razões suficientes para elevar este subgênero para o nível de gênero, baseado, principalmente, no aspecto do perfil de posclípeo e nas diferenças no padrão da genitália do macho, sendo atualmente proposta a designação de *Notozulia entreriana*.

A distribuição geográfica dessas espécies é influenciada pelas condições ecológicas de cada região de cultivo de pastagens, sendo que nas áreas de Cerrado a espécie *D. flavopicta* é considerada a mais importante (COSENZA; NAVES, 1980). Relatos recentes indicam a ocorrência do gênero *Mahanarva* em pastagens de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu (cultivar resistente às cigarrinhas do gênero *Deois* e *Notozulia*), na região de Cerrado e em áreas de transição, localizadas na Amazônia Legal (VALENTIM; ANDRADE, 2004). A partir de levantamento realizado por Paula-Moraes et al. (2006) foi identificada a espécie *Mahanarva spectabilis* (Distant), com ocorrência impactante em pastagens de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no Estado de Tocantins e em cultivo de *Cynodon* no Distrito Federal.

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase) permite a ampliação exponencial de um fragmento específico de DNA a partir de pequena quantidade de moléculas. A amplificação ao acaso do DNA, denominada RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), permite a ampliação de fragmentos de DNA delimitados por *primers* decâmeros e apresenta como vantagens não ser necessário ter informação prévia sobre seqüências de DNA alvo, grande disponibilidade de *primers*, rapidez e custo mais baixo que outras técnicas de obtenção de marcadores moleculares. A utilização da técnica de RAPD permite que informações sejam geradas em espécies de insetos que ainda não foram sujeitas às análises genéticas detalhadas. As informações geradas podem contribuir para estudos que vão da caracterização taxonômica e dinâmica populacional até como ferramenta para monitoramento e detecção de resistência de insetos aos inseticidas (CERUTI; LÁZZARI, 2003).

Estudos sobre o gênero *Mahanarva* em gramíneas forrageiras no Brasil carecem de informações relacionadas ao impacto econômico, à identificação em âmbito de espécie, a aspectos da sua bioecologia, à sua distribuição geográfica, bem como relacionadas a dados sobre a variabilidade genética inter e

intra-específica. Entretanto, para esses estudos é necessária a amostragem de ninfas e de adultos em determinada área, o que depende do conhecimento da identidade taxonômica. Assim, este trabalho teve como objetivos: a) validar protocolo de armazenamento de amostras de cigarrinha-das-pastagens e de extração de DNA de *Mahanarva spectabilis* em quantidade e qualidade adequadas à obtenção de marcadores; b) analisar a similaridade genética entre ninfas e adultos de *Mahanarva spectabilis* coletados no mesmo local, como subsídio para inferências sobre a identidade taxonômica de ninfas.

Material e Métodos

Coleta, identificação e armazenamento de espécimes

Para os estudos de obtenção de DNA genômico de *Mahanarva spectabilis*, foi utilizado protocolo proposto por Faleiro et al. (2003). Amostras de DNA genômico foram extraídas a partir de ninfas e de adultos de cigarrinha-das-pastagens armazenados em álcool 100 %, recém-coletados no campo e imediatamente levados para laboratório. Também foram extraídas amostras de DNA da espécie *Deois flavopicta* de cigarrinha recém-coletada e de amostra armazenada em álcool 70 %, por cerca de 20 anos no Laboratório de Entomologia da Embrapa Cerrados. Os tratamentos foram os seguintes: (1) ninfa de *M. spectabilis* armazenada em álcool 100 % imediatamente após coleta; (2) ninfa de *Deois flavopicta* armazenada em álcool 70 % por 20 anos (3) adulto de *M. spectabilis* armazenado em álcool 100 % imediatamente após coleta; (4) adulto de *M. spectabilis* recém-coletado (fresco); (5) adulto de *D. flavopicta* recém-coletado (fresco).

Para os estudos de similaridade genética entre adultos e ninfas de *M. spectabilis* em um mesmo local, foram selecionados 18 espécimes coletados em nove locais nos estados de Minas Gerais (4), Goiás (2), Distrito Federal (2) e Tocantins (10), sendo que foram selecionadas amostras de uma ninfa e de um adulto por local (Tabela 1). A coleta foi realizada em pastagens de gramíneas forrageiras, com identificação da planta hospedeira e georeferenciamento do ponto de coleta. Os espécimes foram imediatamente conservados em álcool 100 %. No laboratório foi realizada a triagem dos adultos. A identificação da espécie como *M. spectabilis* foi confirmada por taxonomista do grupo, a partir do estudo da genitália masculina de amostras de insetos adultos.

Tabela 1. Espécimes de *Mahanarva spectabilis* analisados no presente trabalho, com os respectivos estádios de desenvolvimento.

Nº	Espécime	Estádio	Nº	Espécime	Estádio
1	P50-MG 1	ninfa	10	P17-T0 2	adulto
2	P50-MG 2	adulto	11	P22-T0 1	ninfa
3	P65-MG 1	ninfa	12	P22-T0 2	adulto
4	P65- MG2	adulto	13	P31-T0 1	ninfa
5	P70-G0 1	ninfa	14	P31-T0 2	adulto
6	P70-G0 2	adulto	15	P36-T0 1	ninfa
7	P01-DF 1	ninfa	16	P36-T0 2	adulto
8	P01-DF 2	adulto	17	P41-T0 1	ninfa
9	P17-T0 1	ninfa	18	P41-T0 2	adulto

Extração e quantificação do DNA para ninfas e adultos de *Mahanarva*

O DNA genômico foi extraído em cada amostra por meio do protocolo proposto por Faleiro et al. (2003). As amostras de ninfas e de adultos foram maceradas individualmente em cadinho de porcelana em contato com nitrogênio líquido. Parte do macerado foi transferido para um tubo plástico de 2,0 mL, ocupando um quinto do seu volume. Em seguida, foram adicionados 800 μ L de tampão de lise constituído por Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) 20 mM, CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) 2,8 %, NaCl 1,3 M, Polivinilpirrolidona 1 % e 2-mercaptoetanol 0,2 %. O macerado foi misturado ao tampão de lise, e os tubos foram mantidos em banho-maria (70 °C) por 1 hora, sendo agitados a cada 10 minutos. Feita a incubação, fez-se a desproteínização, adicionando-se 700 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). Em seguida, as amostras foram agitadas, por meio de suaves inversões por 10 minutos e centrifugadas a rotação 18845 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos de 2 mL, aos quais foram adicionados 55 μ L de CTAB 7 %, e o processo de desproteínização foi repetido.

Para a precipitação do DNA, adicionou-se, ao sobrenadante final, isopropanol gelado na quantidade de 700 μL . Os tubos foram mantidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas e, a seguir, centrifugados como anteriormente descrito. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70 % (v/v) e secado à temperatura ambiente.

A quantificação do DNA foi feita com base na absorbância a 260 nm e a análise de pureza, com base na relação de absorbância a 260 e 280 nm.

Amplificação do DNA via RAPD

Foram testados *primers* decâmeros para analisar a amplificação do DNA via PCR. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13 μL , contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl_2 3 mM, 100 mM de cada um dos desoxiribonucleotídeos (dTAP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 μM de cada *primer* testado (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima *Taq* polimerase e, aproximadamente, 15 ng de DNA. As amplificações foram efetuadas em termociclador programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte seqüência: 15 segundos a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 segundos a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 90 segundos a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a amplificação, as amostras foram separadas eletroforéticamente por 4 horas a 90 volts em gel de agarose (1,2 %), corado com brometo de etídio, submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM EDTA 1 mM). Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Análise dos dados

Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as similaridades e dissimilaridades genéticas entre ninfas e adultos de *Mahanarva spectabilis*, com base no coeficiente de similaridade de Nei e Li e seu complemento, utilizando-se o Programa Genes (CRUZ, 1997). A matriz de dissimilaridade genética foi utilizada para realizar a análise de agrupamento, com base na dispersão gráfica bidimensional, utilizando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS e do Programa Statistica (STATISTICA FOR WINDOWS, 1999).

Resultados e Discussão

Validação de protocolo de armazenamento de amostras, extração de DNA e obtenção de marcadores moleculares para ninfas e adultos de *Mahanarva spectabilis*

O DNA genômico das amostras de cigarrinha-das-pastagens foi obtido em quantidade e qualidade para todos os tratamentos, exceto para ninfas de *D. flavopicta* armazenadas em álcool 70 % por 20 anos (Tabela 2). No caso dessas, a extração foi a de menor quantidade (6,0 ug) e qualidade (relação A_{260}/A_{280} igual a 1,333) de DNA. Para os demais tratamentos, a quantidade do DNA extraído variou de 42,7 a 144,7 ug; e a relação A_{260}/A_{280} de 1,839 a 2,037, conforme na Tabela 2, evidenciando a quantidade, a pureza e a qualidade das amostras extraídas. Os testes dos *primers* decâmeros evidenciaram a qualidade das amplificações via PCR e as diferenças genéticas entre espécimes de cigarrinhas do gênero *Mahanarva* e *D. flavopicta* (Figura 1).

Os resultados de extração de DNA de ninfas e de adultos das duas espécies de cigarrinha-das-pastagens demonstraram a eficiência do protocolo proposto por Faleiro et al. (2003), bem como a conservação dos insetos em álcool 100 %, quando do momento da coleta no campo, visando à posterior extração de DNA genômico, tanto para a espécie *D. flavopicta* como para *M. spectabilis*.

Tabela 2. Absorbância a 260 e 280 nm, quantificação e análise de pureza de amostras de DNA genômico de ninfas e de adultos de *Mahanarva* e *Deois*.

N°	Espécime	A260	A280	A260/280	Quantidade DNA (ug)	
1	Ninfa <i>Mahanarva</i> (álcool 100%)	0,093	0,047	1,979	465	69,7
2	Ninfa <i>Deois</i> (álcool 70%)	0,008	0,006	1,333	40	6,0
3	Adulto <i>Mahanarva</i> (álcool 100%)	0,057	0,031	1,839	285	42,7
4	Adulto <i>Mahanarva</i> (fresco)	0,165	0,081	2,037	825	123,7
5	Adulto <i>Deois</i> (fresco)	0,193	0,098	1,969	965	144,7

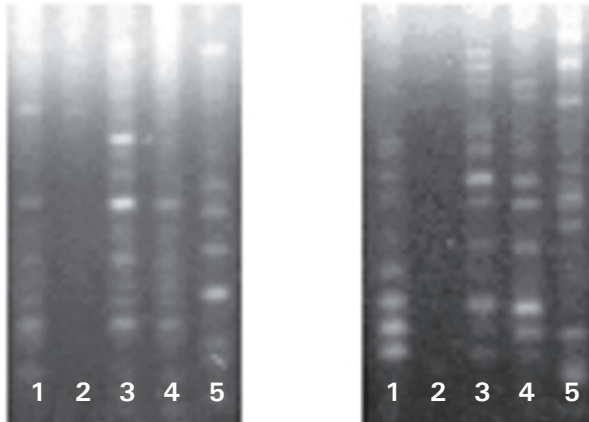


Figura 1. Produtos de amplificação de DNA genômico de cinco espécimes de cigarrinha-das-pastagens, utilizando-se os *primers* decâmeros OPD-07 (A) e OPD -16 (B). Os números correspondem aos espécimes descritos na Tabela 2.

Oliveira et al. (2002), testando diferentes métodos de preservação do DNA de espécimes da cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (Delong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), após períodos sucessivos de armazenamento, observaram que a conservação em álcool etílico absoluto permitiu a obtenção de quantidade satisfatória de DNA após 120 dias da coleta dos insetos. Já espécimes de *D. maidis* armazenados ao ar mostraram-se impróprios para estudos com RAPD após 10 dias de armazenamento.

O protocolo de extração de DNA proposto por Faleiro et al. (2003) tem sido utilizado para extração de DNA a partir de tecido foliar, sendo validado para mais de 46 espécies de plantas estudadas na Embrapa Cerrados (BELLON et al., 2005).

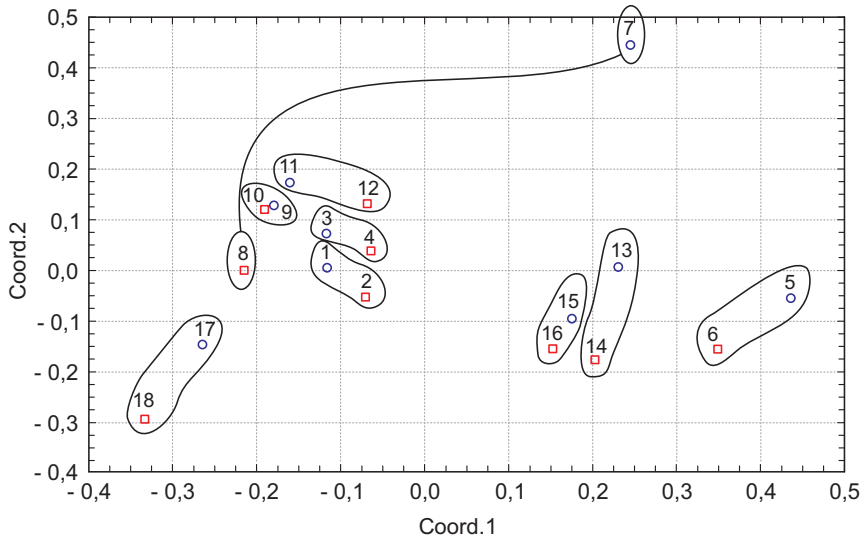
Similaridade genética entre ninfas e adultos de Mahanarva coletados no mesmo local, como subsídio para amostragem populacional

Foram obtidos 85 marcadores, dos quais apenas 3,53 % foram monomórficos. Ninfas e adultos de um mesmo local evidenciaram elevadas similaridades genéticas, embora tenham ocorrido algumas exceções. A existência de

variabilidade genética no mesmo local de coleta explica, em parte, essas exceções, como nos casos dos espécimes 7-8, 13-14 e 15-16 (Tabela 3). Entretanto, foi verificada uma baixa similaridade genética (0,444) entre a ninfa e o adulto de um mesmo ponto, no Distrito Federal. Essa ninfa (coletada no 2º ínstar) apresentou as menores similaridades genéticas em relação aos demais espécimes, o que leva à hipótese que ela seja de outra espécie. O gráfico de dispersão (Figura 2) ilustra as similaridades genéticas entre ninfas e adultos do mesmo local e a exceção da ninfa (7) e do adulto (8) coletados no Distrito Federal.

Tabela 3. Similaridade genética média entre 18 espécimes de *Mahanarva spectabilis* e os demais espécimes e entre ninfa e adulto coletados no mesmo local.

Nº	Espécime	Similaridade média em relação aos demais espécimes	Similaridade ninfa-adulto
1	P50-MG 1	0,636	
2	P50-MG 2	0,658	0,912
3	P65-MG 1	0,651	
4	P65-MG 2	0,671	0,886
5	P70-GO 1	0,433	
6	P70-GO 2	0,425	0,789
7	P01-DF 1	0,389	
8	P01-DF 2	0,622	0,444
9	P17-TO 1	0,632	
10	P17-TO 2	0,636	0,9
11	P22-TO 1	0,612	
12	P22-TO 2	0,649	0,918
13	P31-TO 1	0,55	
14	P31-TO 2	0,586	0,735
15	P36-TO 1	0,517	
16	P36-TO 2	0,581	0,68
17	P36-TO 1	0,581	
18	P36-TO 2	0,441	0,875



1 – ninfa; 2 – adulto

Figura 2. Dispersão gráfica de 18 espécimes de *Mahanarva spectabilis*, com base nas distâncias genéticas calculadas utilizando 85 marcadores RAPD. Os números correspondem aos espécimes listados na Tabela 1. Os espécimes [ninfa (○) e adulto (◻)] do mesmo círculo foram coletados no mesmo local.

Conforme discutido por Sujii et al. (2000), o levantamento populacional de cigarrinha-das-pastagens deve considerar a população de ninfas, de forma a garantir a confiabilidade na correlação entre impacto de ocorrência da praga na pastagem e a identificação da praga em âmbito de espécie. Entretanto, a realização de coletas, de forma que ninfas coletadas no campo sejam transferidas para o laboratório, para obtenção de adultos, a fim de posterior estudo da genitália dos insetos machos e da identificação de espécie, mesmo permitindo afirmar a espécie impactante no local, pode ser inviabilizada pela demanda logística desse processo.

A utilização dos marcadores moleculares é baseada no fato de que as diferenças genéticas no DNA podem significar diferenças fenotípicas e, ainda, que os marcadores podem permitir a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, com a identificação direta do genótipo

sem influência do ambiente e a possibilidade de detecção de tais polimorfismos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; FALEIRO, 2007) em qualquer fase do desenvolvimento do inseto. Os resultados apresentados anteriormente indicam que a utilização dos marcadores moleculares é uma ferramenta importante, já que permite que espécies de insetos particularmente difíceis de ser identificadas através das técnicas taxonômicas tradicionais possam ter suas identidades esclarecidas mediante o emprego do seqüenciamento ou do polimorfismo do comprimento de seqüências. Pode-se citar como exemplo do emprego da técnica de marcadores moleculares os estudos da dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (BORBA et al., 2005), que apresentam dificuldades para identificação das espécies desse gênero de parasitóide, em função do diminuto tamanho e da similaridade morfológica.

Particularmente diante da necessidade do mapeamento da ocorrência *Mahanarva spectabilis* em pastagens de gramíneas forrageiras, com demanda adequada de metodologia de amostragem de áreas com ataque de cigarrinhas-pastagens, o emprego de marcadores moleculares permitirá utilizar tanto o adulto como a ninfa para representar o ponto de coleta, com indicação segura da identidade taxonômica, a partir da comparação dos marcadores monomórficos entre ninfas coletadas e insetos adultos identificados por taxonomista do grupo.

Conclusões

Foi verificada a eficiência do protocolo de extração de DNA de ninfas e de adultos das espécies *D. flavopicta* e *M. spectabilis*, bem como a conservação dos insetos em álcool 100 % visando à extração de DNA genômico.

Os resultados da similaridade genética de ninfas e adultos em um mesmo local indicam que pode-se utilizar tanto o adulto como a ninfa para representar o ponto de coleta; entretanto, no caso da utilização de ninfas, em que a identificação segura da espécie é comprometida, os marcadores moleculares tornam-se uma ferramenta importante para inferências sobre a identidade taxonômica das ninfas.

Os resultados desse trabalho oferecem as bases para futuros estudos da variabilidade genética, do mapeamento de ocorrência do gênero *Mahanarva* em gramíneas forrageiras, além de estudos populacionais e de ocorrência de danos causados por *Mahanarva spectabilis*. Para tanto, uma amostragem com maior número de pontos de coleta e maior representatividade de cada região torna-se necessária.

Agradecimentos

Aos pesquisadores da Embrapa Cerrados Lourival Vilela e Allan Kardec Braga Ramos; à Coordenação Geral de Proteção de Plantas/DSV/SDA do MAPA, nas pessoas de José Geraldo Baldini Ribeiro e Maria Júlia Signoreti Godoy; à Superintendência de Federal de Agricultura do Estado de Tocantins, na pessoa de Gilson Humberto Moromizato; aos técnicos da Agência de Defesa Agropecuária – ADAPEC/TO; a Epaminondas de Andrade – Fazenda Vale do Boi e a outros pecuaristas de T; à Superintendência de Federal de Agricultura do Estado de Minas Gerais, nas pessoas de Francisco de Pinho e Heli José Maia; e à Emater Distrito Federal, na pessoa de Hélcio Henrique dos Santos.

Referências

BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; BARROS, A. M.; KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P.; CORDEIRO, M. C. R.; PINTO, A. C. Q.; JUNQUEIRA, N. T. V.; PEREIRA, A. V.; PEREIRA, E. B. C.; FERNANDES, F. D.; FERREIRA, M. E. Extração de DNA e obtenção de marcadores moleculares para diferentes espécies de interesse para o Cerrado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 2005, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2005. 1 CD-ROM. (Resumo 7657).

BORBA, R. S.; GARCIA, M. S.; KOVALESK, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; CASTELO BRANCO, J. S.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 4, p. 565-569, 2005.

CARVALHO, G. S. Cercopídeos neotropicais: redescrição *Notozulia* Fennah,

stat. N. (Auchenorrhyncha: Cercopidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Piracicaba, v. 24, p. 385-388, 1995.

CERUTI, F. C.; LÁZZARI, S. M. N. Utilização de bioensaios e marcadores moleculares para detecção da resistência de coleópteros de produtos armazenados a inseticidas. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 447-453, 2003.

COSENZA, G. W. Resistência de gramíneas forrageiras à cigarrinha-das-pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 24, n. 8, p. 961-968, 1989.

COSENZA, G. W.; NAVES, M. Controle da cigarrinha-das-pastagens no Cerrado. **Dirigente Rural**, São Paulo, v. 19, n. 11, p. 47-48, 1980.

CRUZ, C. D. **Programa Genes**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Editora UFV, 1997. 442 p.

FALEIRO, F. G.; FALEIRO, A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R.; KARIA, C. T. **Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003. (Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, 92).

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

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, B.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, J. D.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN, Documentos, 20).

OLIVEIRA, C. M.; FUNGARO, M. F. P.; CAMARGO, L. E. A.; LOPES, J. R. S. 2002. Análise comparativa da estabilidade do DNA de *Dalbulus maidis* (DeLong

& Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) sob diferentes métodos de preservação para uso em RAPD-PCR. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, p. 225-231, 2002.

PAULA-MORAES, S. V.; CARVALHO, G. S.; RAMOS, A. K. B.; AUAD, A. M.; TAKADA, S.; BARCELLOS, A. O. Ocorrência da cigarrinha-das-pastagens *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) em gramíneas forrageiras e sua distribuição em áreas de Cerrado e na Amazônia Legal. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: SBZ, 2006. 1 CD-ROM.

PECK, D. Distribución y reconocimiento del salivazo de los pastos (Homoptera: Cercopidae) en la Costa Caribe de Colombia. **Pasturas Tropicales**, Cali, v. 24, n. 1, p. 4-15, 2002.

POLANQUINI, L. E. M; SOUZA, J. G; GEBARA, J. J. Transformações técnico-produtivas e comerciais na pecuária de corte brasileira a partir da década de 90. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, p. 321-327, 2006.

STATISTICA for Windows [**Computer program manual**]. Tulsa, OK: StatSoft, 1999.

SOARES FILHO, C. V. **Brachiaria**: espécies e variedades recomendadas para diferentes condições. Campinas: CATI, 1996. 26 p. (CATI. Boletim Técnico, 226).

SUJII, E. R.; GARCIA, M. A; FONTES, E. M. G. Movimentos de migração e dispersão de adultos da cigarrinha-das-pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, p. 471-480, 2000.

VALÉRIO, J. R.; JELLER, H.; PEIXER, J. Seleção de introduções do gênero *Brachiaria* resistentes à cigarrinha *Zulia entreriana* (Berg) (Homoptera: Cercopidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 383-387, 1997.

VALENTIM, J. F.; ANDRADE, C. M. S. Perspectives of grass-legume pastures for sustainable animal production in the tropics. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SBZ, 2004. 1 CD-ROM.

Embrapa

Cerrados

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

