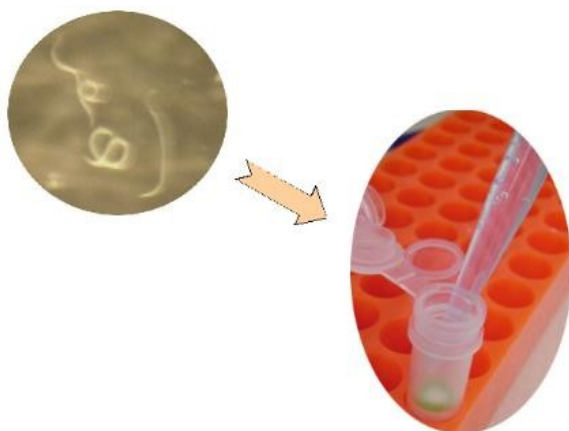


Imagem: Ana Lídia V. Bonato



Extração de DNA genômico de nematóides entomopatogênicos na Embrapa Trigo

Ana Lídia Variani Bonato¹, Amanda Nery da Silva², Leonel Thomas Bosa², Marcio Voss¹

Introdução

Devido à expansão do sistema de plantio direto, o número de pragas de solo tem aumentado significativamente, preocupando os agricultores. Um dos métodos de controle é o químico. Entretanto, o uso dos pesticidas trazem diversas consequências ao ambiente e à saúde humana, não sendo ainda satisfatório no controle de pragas de solo. Outras alternativas são o controle genético e o controle biológico.

Diversas pesquisas têm sido feitas para o controle biológico de insetos, usando fungos, bactérias e nematóides entomopatogênicos. Os nematóides são organismos microscópicos, medindo cerca de 1 mm, de corpo cilíndrico, basicamente aquáticos, embora possam ser encontrados em quase todos os tipos de habitats

[<http://docentes.esalq.usp.br/lccbferr/nematodaparte1.pdf>]. Os nematóides entomopatogênicos são assim chamados porque provocam a morte dos insetos através da introdução de uma bactéria que provoca septicemia, de forma rápida. Eles têm quatro fases larvais e uma adulta. A única forma de vida livre desses nematóides é a juvenil infectiva, que corresponde a terceira fase larval. Nessa forma, eles se movimentam no solo em busca do inseto alvo, tornando-os assim mais eficientes do que os fungos e bactérias do solo no controle de insetos.

Os nematóides mais usados para o controle biológico de insetos são os das famílias *Steinernematidae* e *Heterorhabditidae* (NARDO et. al., 2001).

Com a limitada caracterização morfológica na identificação de grupos de nematóides, têm-se utilizado ferramentas alternativas, como as que utilizam métodos moleculares (STOCK & HUNT, 2005). As técnicas mais comumente usadas são RAPD, RFLP e sequenciamento de DNA para o estudo da variabilidade genética e acesso da relação filogenética entre as espécies (LIU & BERRY, 1996).

O passo inicial para essas determinações é a obtenção do DNA das espécies de nematóides entomopatogênicos. No Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo, utilizou-se o protocolo para a extração de DNA, através do kit adquirido comercialmente "NucleoSpin® Tissue" (Macherey-Nagel). Entretanto, como este kit não é específico para nematóides, não foi possível extrair DNA em quantidade suficiente para as análises moleculares posteriores. Desta forma, foi necessário realizar diversos ajustes na metodologia para obter DNA na forma satisfatória.

O objetivo deste trabalho foi descrever os ajustes metodológicos de extração de DNA genômico de nematóides entomopatogênicos, realizados no laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo, a partir do protocolo proveniente do Kit NucleoSpin®

¹Pesquisador Embrapa Trigo. Rodovia BR 285, Km 294, Cx.P. 451, 99001-970 Passo Fundo, RS. Email para contato: analidia@cnpt.embrapa.br.

²Estudante de Biomedicina- ULBRA-Carazinho-RS.

Tissue, recomendado para a extração de DNA de tecido humano ou animal e cultura de células.

Metodologia

Protocolo 5.1 (Kit NucleoSpin® Tissue), com modificações:

1. Adicionar aproximadamente 30mg de nematóides em um microtubo de 1,5ml;
2. Macerar a amostra com um micropistilo na ausência de tampão e à temperatura ambiente;
3. Adicionar 180µl de Tampão T1 e 25µl de Proteinase K (PK);
4. Macerar a amostra novamente com o micropistilo;
5. Homogeneizar a amostra em vórtex;
6. Incubar a 56 °C “overnight” ou aproximadamente 16 horas;
7. Adicionar 20µl de RNase (10mg/ml) incubando por 5 minutos a 37 °C, para a remoção do RNA;
8. Homogeneizar a amostra em vórtex;
9. Adicionar 200µl de tampão B3;
10. Homogeneizar a amostra no vórtex vigorosamente;
11. Incubar a 70 °C por 10 minutos e colocar no vórtex brevemente;
12. Caso haja partículas visíveis, centrifugar por 5 minutos a 11.000rpm e transferir o sobrenadante para novos tubos;
13. Adicionar 210µl de etanol absoluto e homogeneizar no vórtex vigorosamente;
14. Transferir para a coluna e centrifugar a 11.000rpm por 1 minuto;
15. Descartar o material recuperado no tubo coletor;
16. Colocar a coluna de volta ao tubo coletor e adicionar 500µl de tampão BW;

17. Centrifugar a 11.000rpm por 1 minuto;
18. Descartar o material que passou pela coluna;
19. Recolocar a coluna no tubo coletor e adicionar 600µl de tampão B5;
20. Centrifugar a 11.000rpm por 1 minuto;
21. Descartar o material depositado no tubo coletor;
22. Colocar a coluna de volta ao tubo coletor;
23. Centrifugar por 1 minuto a 11.000rpm para retirar o excesso de etanol da membrana de sílica (Fig. 1);



a



b

Fig. 1. a) Tubo coletor e coluna com membrana de sílica; b) Microcentrifuga com amostras.

24. Colocar a coluna em um microtubo de 1,5ml e adicionar 100µl de tampão de eluição (BE) aquecido a 70 °C;
25. Incubar por 1 minuto em temperatura ambiente;

26. Centrifugar a 11.000rpm por 1 minuto;

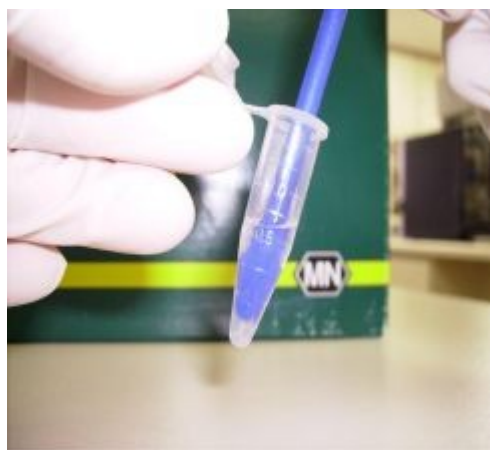
27. Armazenar a amostra eluída a -20°C .

Considerações gerais

Com a finalidade de obter a quantidade adequada de DNA genômico a ser utilizado em estudos moleculares foram realizadas modificações no protocolo original do Kit. Foram utilizadas 30mg da amostra de nematóides entomopatogênicos, no estágio juvenil infectivo, enquanto que no protocolo 5.1 é recomendado usar, aproximadamente, 25mg por amostra. As amostras foram maceradas com micropistilos antes e depois do tampão T1 para romper as membranas dos nematóides (Fig. 2).



a



b

Fig. 2. a) Adição do tampão T1 às amostras; b) Maceração das amostras com micropistilos.

Para lisar as células de maneira mais eficiente, o material permaneceu em banho-maria a 56°C “overnight” ou por aproximadamente 16 horas, enquanto que no protocolo original recomenda-se apenas 3 horas. Foi observado que o tratamento com RNase na concentração final de $200\mu\text{g}$ por 5 minutos é suficiente para degradar o RNA, ao invés de $400\mu\text{g}$ durante o mesmo período, como descrito no protocolo original.

Posterior à extração de DNA dos nematóides, as amostras foram quantificadas em gel de agarose 0,8%, por eletroforese e comparadas com padrões de massa molecular de 25ng, 50ng e 100ng para verificar a quantidade e a qualidade do DNA (Fig. 3), obtendo-se um rendimento de DNA entre 10 e $20\text{ng}/\mu\text{l}$, enquanto que com o protocolo original o rendimento máximo foi de $5\text{ng}/\mu\text{l}$.

Os ajustes realizados no protocolo aumentaram o rendimento de DNA obtido, tornando-se mais adequado para amostras de nematóides entomopatogênicos e permitirão maior eficiência da utilização das técnicas moleculares que serão aplicadas posteriormente para identificação genética.

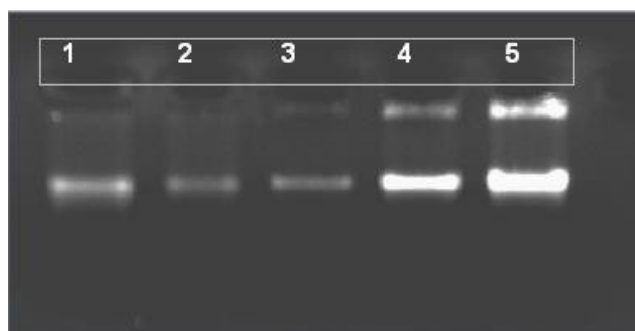


Fig. 3. Quantificação de DNA genômico, extraído por protocolo ajustado, em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. Amostras 1 e 2 com DNA de nematóides; amostras 3, 4 e 5 com DNA padrão nas massas de 25, 50 e 100ng, respectivamente.

Referências bibliográficas

LIU, J.; BERRY, R. E. Phylogenetic analysis of the genus *Steinernema* by morphological characters and randomly amplified polymorphic DNA fragments.

Fundamental and Applied Nematology, v. 19, p. 463-469, 1996.

NARDO, E. A. B. de; AGUILLERA, M. M.; GREWAL, P. S. Pragas de solo com potencial de serem controlados com nematóides entomopatogênicos (Nematoda: Steinernematidae e Heterorhabditidae). In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA SOBRE PRAGAS DE SOLO, 7., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 273- 278.

STOCK, S. P.; HUNT, D. J. Morphology and Systematics of Nematodes Used in Biocontrol. In: PARWINDER, S. G.; EHLERS, R.; SHAPIRO-IRAN, D. I. (Ed.). **Nematodes as biocontrol agents**. [Wallingford]: CABI Publishing, p. 3-43, 2005.

Comunicado Técnico Online, 257

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Embrapa Trigo
Caixa Postal, 451, CEP 99001-970
Passo Fundo, RS
Fone: (54) 3316 5800
Fax: (54) 3316 5802
E-mail: sac@cnpt.embrapa.br

Comitê de Publicações

Comitê de Publicações

Presidente: **Leandro Vargas**

Anderson Santi, Antônio Faganello, Casiane Salete Tibola, Leila Maria Costamilan, Lisandra Lunardi, Maria Regina Cunha Martins, Sandra Maria Mansur Scagliusi, Sandro Bonow

Expediente

Referências bibliográficas: Maria Regina Martins
Editoração eletrônica: Márcia Barrocas Moreira Pimentel

BONATO, A. L. V.; SILVA, A. N. da; BOSA, L. T.; VOSS, M. **Extração de DNA genômico de nematóides entomopatogênicos na Embrapa Trigo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009. 7 p. html. (Embrapa Trigo. Comunicado Técnico online, 257). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co257.htm>.