

# CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE *Tibraca limbativentris*, STAL, 1860 (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)

Fátima T. Rampelotti<sup>(1)</sup>, Fernando A. Tcacenco<sup>(2)</sup>, Anderson Ferreira<sup>(2)</sup>, Honório F. Prando<sup>(2)</sup>, Anderson D. Grützmacher<sup>(1)</sup>, José F. da S. Martins<sup>(3)</sup>. <sup>1</sup>DFs/FAEM/UFPel, e-mail: [frampelotti@terra.com.br](mailto:frampelotti@terra.com.br), Pelotas, RS; <sup>2</sup>Epagri, Itajaí, SC; <sup>3</sup>Embrapa/CNPAP, Goiânia, GO.

Protocolos para extração de DNA têm sido descritos para vários organismos, os quais requerem adequações visando a obtenção de DNA em quantidade e qualidade suficiente para posteriores análises com marcadores moleculares. A extração de DNA do percevejo-pequeno-da-soja, *Euschistus heros*, (Hem.: Pentatomidae) é citada por Sosa-Gomez et al. (2004), que a partir de um protocolo descrito para obtenção de DNA de tecidos vegetais, realizaram extrações de DNA com cabeças desse inseto, visando a utilização para a técnica *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Além do trabalho acima citado, outros são relatados para diferentes ordens e famílias de insetos. São exemplos os trabalhos realizados por Grützmacher (2003) e Carvalho & Vieira (2001) que utilizaram diferentes protocolos para adequar condições de extração para obtenção de DNA de formigas dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta*, respectivamente. Diante da inexistência, na literatura consultada, da descrição de protocolos para extração de DNA do percevejo-do-colmo-do-arroz, *Tibraca limbativentris*, objetivou-se avaliar protocolos, visando à sua adequação para a extração de DNA desse inseto, importante praga da cultura do arroz.

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Epagri de Itajaí/SC. Cada amostra constou de um inseto inteiro ou uma cabeça de adulto de *T. limbativentris*, sendo que para cada protocolo foram utilizadas três amostras e um controle (sem inseto). Os insetos haviam sido mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  antes da extração, e o DNA obtido em todos os procedimentos foi diluído em 50  $\mu\text{L}$  do tampão TE pH 8,0 e mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Foram testados os seguintes protocolos:

**Protocolo 1** – modificado a partir de Olerup & Zetterquist (1994): insetos inteiros foram macerados em N líquido, com posterior adição de 500  $\mu\text{L}$  de tampão de extração (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA pH 8,0; 0,5% SDS). Em seguida as amostras foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 2 horas. Posteriormente, centrifugou-se as mesmas por 6 min a 11000 rpm (equivalentes a 15560 g no rotor F 40-6-38, centrífuga Eppendorf 5804R). Ao sobrenadante adicionou-se 260  $\mu\text{L}$  de TE e 240  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M, centrifugando por 15 min a 11000 rpm. Após isso, dois volumes de isopropanol absoluto gelado foram adicionados ao sobrenadante e posteriormente centrifugados nas condições anteriores. O *pellet* foi lavado com 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado.

**Protocolo 2** – modificado a partir de Saghai-Marooof et al. (1984): insetos inteiros foram macerados em N líquido, com posterior adição de 500  $\mu\text{L}$  de uma solução de CTAB 2% e incubação por 30 min a  $60^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, acrescentou-se 1 volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e agitaram-se as amostras por inversão durante 15 min. Após isso, elas foram centrifugadas por 7 min a 11000 rpm e o sobrenadante transferido para novos tubos contendo 0,8 volumes de isopropanol absoluto gelado. Posteriormente, centrifugou-se por 7 min a 11000 rpm e desprezou-se o sobrenadante. O *pellet* foi lavado duas vezes: a) adição de 500  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio 0,2 M em etanol 76% (20 min), centrifugação por 2 min a 11000 rpm e descarte do sobrenadante; b) adição de 500  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio 0,01 M em etanol 76% (20 min), centrifugação por 2 min a 11000 rpm e secagem à temperatura ambiente.

**Protocolo 3** – modificado a partir de Sambrook & Fritsch (1989): insetos inteiros foram macerados em N líquido, com posterior adição de 700  $\mu\text{L}$  da solução de extração (125 mM EDTA; 500 mM Tris-HCl pH 8,0; 2,3% SDS) e incubação por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, adicionou-se 1 volume de fenol, agitou-se por inversão (15 min) e centrifugou-se a 11000 rpm por 7 min. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e acrescido do mesmo volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (24:24:1). As amostras foram homogeneizadas por 15 min e centrifugadas por 7 min a 11000 rpm. Posteriormente repetiu-se os passos a partir do fenol: clorofórmio: álcool isoamílico. Ao *pellet* adicionou-se 0,1 volume de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e 2 volumes de isopropanol absoluto gelado, incubando as amostras durante a noite a  $-20^{\circ}\text{C}$ . No dia seguinte centrifugou-se por 7 min a 11000 rpm e o sobrenadante foi descartado; ao *pellet* foram

adicionados 500 µL de isopropanol absoluto com posterior centrifugação por 7 min a 11000 rpm. O *pellet* foi secado à temperatura ambiente.

**Protocolo 4** – modificado a partir de Doyle & Doyle (1990): insetos inteiros foram macerados em 500 µL do tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M de NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8,0) e incubados a 60°C por 30 min. Em seguida, foi adicionado 1 volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e homogeneizado em vórtex. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 10 min a 11000 rpm e o sobrenadante transferido para novo tubo com 2 volumes de isopropanol absoluto gelado. Após centrifugação de 10 min a 11000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado por 20 min com 500 µL de uma solução (0,2 M acetato de amônio em etanol 76%). Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 min a 11000 rpm e o *pellet* foi secado a temperatura ambiente.

**Protocolo 5** – modificado a partir de Belshaw & Quicke (1997): insetos inteiros foram macerados em 700 µL de NaCl 5 M. Em seguida adicionou-se 1 µL de proteinase K (20 mg mL<sup>-1</sup>) e incubou-se as amostras por 18 horas a 37°C. Posteriormente, essas foram centrifugadas por 7 min a 11000 rpm e o *pellet* foi lavado com 500 µL de acetato de sódio 0,2 M em etanol 76%. Em seguida, centrifugou-se por 10 min a 11000 rpm e secou-se o *pellet* à temperatura ambiente. Realizou-se esse protocolo, com e sem maceração em N líquido antes do primeiro passo do protocolo descrito acima.

**Protocolo 6** – CTAB com modificações: insetos inteiros foram macerados em N líquido, com posterior adição de 750 µL de um tampão (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl; pH 8,0) e incubação por 30 min a 65°C. Em seguida, adicionou-se 1 volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), agitou-se por inversão durante 15 min e centrifugou-se por 7 min a 11000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novo tubo com 800 µL de isopropanol absoluto gelado e incubado a -20°C por 30 min. Posteriormente, centrifugou-se por 7 min a 11000 rpm e desprezou-se o sobrenadante. O *pellet* foi lavado duas vezes: a) adição de 500 µL de acetato de sódio 0,2 M em etanol 76% (20 min), centrifugação por 2 min a 11000 rpm e descarte do sobrenadante; b) adição de 500 µL de acetato de amônio 0,01 M em etanol 76% (20 min), centrifugação por 2 min a 11000 rpm e secagem à temperatura ambiente.

**Protocolo 7** - desenvolvido a partir dos resultados anteriores especificamente para *T. limbativentris*: cabeças, sem as antenas e as peças bucais, foram maceradas em 500 µL de uma solução (5 M NaCl; 250 mM EDTA); em seguida adicionou-se 1 µL de proteinase K (20 mg mL<sup>-1</sup>) e incubou-se por 18 horas a 37°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 7 min a 11000 rpm e o *pellet* foi lavado com 400 µL de acetato de sódio 0,2 M em etanol 76%. Após isso, centrifugou-se por 10 min a 11000 rpm e secou-se o *pellet* na temperatura ambiente, sendo o mesmo diluído em tampão TE pH 8,0.

A presença de DNA nas amostras submetidas a extração foi observada através de corridas eletroforéticas em gel de agarose 0,8%, corado em solução de brometo de etídeo e fotodocumentado.

Para o protocolo 6, observou-se DNA de boa qualidade para apenas uma das amostras, indicando baixa reprodutibilidade do método para *T. limbativentris*; já para os protocolos 1, 2 e 3 não foi observado DNA de alto peso molecular em nenhuma das amostras analisadas. Os protocolos 1, 2 e 3 foram testados para extração de DNA de *Acromyrmex* por Grützmacher (2003). De acordo com o autor, os melhores resultados para extração de DNA de formigas desse gênero, foram obtidos com o protocolo 1, por apresentar baixo custo; no entanto, com os demais protocolos também foi possível obter DNA para as reações de PCR. A baixa eficiência dos protocolos 1, 2 e 3 para amostras de *T. limbativentris* pode ter sido determinada pelas variações nos componentes presentes nesses protocolos, para obtenção de DNA.

Os melhores resultados foram obtidos com os protocolos 4 e 5, no entanto observou-se grande quantidade de DNA degradado, o que pode comprometer os trabalhos futuros de marcadores moleculares. Carvalho & Vieira (2001) testaram o protocolo 4 para extração de DNA de *Atta* não obtendo resultados positivos. Ao realizar o protocolo 5 com uma prévia maceração em N líquido das amostras, os resultados não foram tão bons quanto aqueles observados para o protocolo na íntegra (sem N líquido). Cabe ressaltar que a extração de DNA de insetos é dificultada pela presença de um exoesqueleto quitinoso, o qual dificulta a maceração e conseqüentemente, o rompimento das células, no entanto a utilização de N líquido, componente

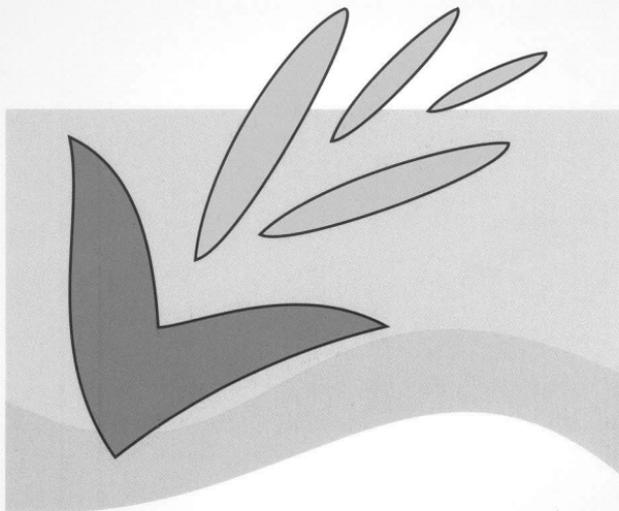
que facilita o rompimento mecânico das células, não foi eficiente, sendo desnecessário nesse protocolo.

O protocolo 7 mostrou-se o mais eficiente para extração de DNA de *T. limbativentris*, visto que o DNA obtido nas amostras submetidas a esse protocolo foi de boa qualidade e quantidade, além da ausência de moléculas degradadas, características importantes para a realização de técnicas moleculares como AFLP. A adição de EDTA e o uso de cabeça sem as antenas e as peças bucais como amostra foram as principais alterações nesse protocolo. O EDTA age como quelante de cátions divalentes, como  $Mg^{+}$  e  $Ca^{+}$ , essenciais para o funcionamento de DNAses e outras enzimas, impedindo assim a degradação das moléculas de DNA. A não utilização do inseto inteiro visou à redução da quantidade de impurezas presentes no processo de extração, como o exoesqueleto, trato digestivo e as antenas.

Os protocolos 4 e 5 com as modificações sugeridas e o protocolo 7 descrito nesse trabalho permitem obter DNA em quantidade suficiente para futuras aplicações. No entanto, a possível presença de material genético de machos, resultado da fertilização, bem como a presença de DNA degradado e impurezas, poderiam influenciar em futuros resultados quando da aplicação de técnicas baseadas em marcadores moleculares de DNA; comprometendo os resultados obtidos a partir de extrações usando insetos inteiros como amostras e favorecendo, portanto, a aplicação do protocolo 7 para extração DNA do percevejo *T. limbativentris*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELSHAW, R.; QUICKE, D.L.J. A molecular phylogeny of the Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.7, n.3, p.281-293. 1997.
- CARVALHO, A.O.R. de; VIEIRA, L.G.E. Determinação de condições ótimas para análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, v.30, n.4, p.593-600. 2001.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15. 1990.
- GRÜTZMACHER, D.D. Aspectos morfológicos, moleculares e edafoclimáticos relacionados às formigas cortadeiras no Rio Grande do Sul. 2003. 161f. Tese (Doutorado em Fitossanidade – Entomologia) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, Pelotas.
- OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific primer (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens**, v.39, p. 225-235. 1994.
- SAGHAI-MAROOF, M.A., et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.81, p.8014-8018, 1984.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. **Molecular cloning: A laboratory Manual**. 2. ed., New York: Cold Spring Laboratory, p.9.16-9.23, 1989.
- SOSA-GOMEZ, D.R., et al. Genetic differentiation among brazilian populations of *Euschistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae) based on RAPD analysis. **Neotropical Entomology**, v.33, n.2, p.179-187, 2004.



# **IV Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado XXVI Reunião da Cultura do Arroz Irrigado**

**“NOVOS CAMINHOS PARA A PRODUÇÃO  
DE ARROZ IRRIGADO NO BRASIL”**

**9 a 12 de agosto de 2005**

**Park Hotel Morotin  
Santa Maria-RS**

# **Anais**

**Volume II**