

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS DO GÊNERO *Heterorhabditis*

Silva, A. N. da¹; Bosa, L. T.¹²; Bonato, A. L. V.^{3*}; Voss, M.³

Devido à expansão do sistema de plantio direto, o número de pragas de solo tem aumentado significativamente. Um dos métodos de controle utilizado é o químico. A identificação de nematóides patogênicos (Neps) pode representar o desenvolvimento de métodos alternativos de controle de pragas. Estes nematóides são capazes de se deslocar em busca do inseto hospedeiro, e vivem em relação de mútuo benefício com bactérias entomopatogênicas, responsáveis pela rápida morte do inseto alvo. Com a limitada caracterização morfológica na identificação de grupos de nematóides, utilizou-se ferramentas alternativas, como os métodos moleculares. Para esse estudo necessita-se do DNA das espécies. No Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo, utilizou-se o protocolo para a extração de DNA, através do kit comercial “NucleoSpin® Tissue” (Macherey-Nagel). Entretanto, este kit não é específico para nematóides, não foi possível extrair DNA em quantidade suficiente para as análises moleculares. Desta forma, foi necessário realizar diversos ajustes na metodologia para obter DNA na forma satisfatória. Com o objetivo de otimizar a metodologia de extração de DNA genômico para nematóides entomopatogênicos, foram realizados ajustes a partir do protocolo proveniente do Kit comercial. A fim de se obter a quantidade adequada de DNA genômico para estudos moleculares 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” que não era descrito no protocolo. Para lisar as células de maneira mais eficiente, o material ficou em banho-maria a 56 °C “overnight” ou por aproximadamente 16 horas, enquanto que no protocolo original recomenda-se apenas 3 horas. O tratamento com RNase na concentração final de 200µg por 5 minutos é suficiente para degradar o RNA, ao invés de 400µg durante o mesmo período, como descrito no protocolo original. Após à extração de DNA, as amostras foram quantificadas em gel de agarose 0,8 %, e comparadas com padrões de concentrações moleculares conhecidas. Os ajustes de protocolos realizados deverão solucionar problemas intrínsecos das espécies estudadas e a continuidade das atividades moleculares, intrínsecos da espécie analisada proporcionando eficiência na utilização das técnicas moleculares que serão aplicadas.

¹ Acadêmico de Biomedicina, Universidade Luterana do Brasil.

² Acadêmico de Biomedicina, Universidade Luterana do Brasil. Bolsista PIBIC/CNPq.

³ Pesquisador da Embrapa Trigo, *Orientador.