

TESTES DE EXTRAÇÃO DE DNA DE *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda* USANDO O PROTOCOLO MINIPREP (MODIFICADO DE RAEDER; BRODA, 1985)

Francielle Fiorentin, Alice Jacobus de Moraes, Viviane M. Celant, Valdemir Aleixo, Lucimar Pereira Bonett (Orientador/UNIPAR).
e-mail: franciellebio@yahoo.com.br.

Universidade Estadual do Oeste do Paraná/Centro de Ciências Agrárias –
Marechal Candido Rondon - PR.

Palavras-chave: MINIPREP, *Anticarsia gemmatalis*, *Spodoptera frugiperda*, extração de DNA.

Resumo:

A lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*) e a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) são pragas que atacam a cultura da soja e do milho causando grandes perdas. Para reduzir as perdas das colheitas são aplicados regularmente agrotóxicos que pela aplicação por intermédio de vaporização, acabam atacando os demais elementos da biosfera, incluindo em alguns casos, o homem. O processo de extração de DNA é o começo do estudo molecular dos genes, onde a partir do isolamento (extração) de DNA, é possível fazer o sequenciamento de nucleotídeos que compõem esse DNA e identificar genes. O trabalho foi realizado no laboratório de biotecnologia da Universidade Paranaense – UNIPAR, campus Toledo Paraná, onde o objetivo foi testar o protocolo MINIPREP (modificado de Raeder; Broda, 1985) na extração de DNA de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*. Foram realizadas duas coletas, uma de *Anticarsia gemmatalis* e a outra de *Spodoptera frugiperda*, que foram utilizadas nos experimentos, com modificações no protocolo para a extração de DNA de lagartas. Realizou-se três experimentos com alterações no protocolo, sendo obtido os seguintes resultados: Experimento 01, apresentando potencial do protocolo na extração de DNA de *Spodoptera frugiperda*, mas apresentou contaminações depois da extração e purificação do DNA. Experimento 02, o protocolo apresentou potencial para ser utilizado na extração de DNA de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*, mas ainda apresentou contaminações depois da extração. Experimento 03 foram analisadas diferentes proporções de *Anticarsia gemmatalis* para a extração de DNA, onde as amostras compostas por indivíduos inteiros apresentam uma melhor resolução das bandas analisando o gel de eletroforese, mas ainda apresenta contaminações que devem ser eliminadas através de modificações, como a concentração dos reagentes, o tempo de incubação, repetição de etapas durante o processo de extração e a corrida eletroforética, para a pesquisa dar continuidade, onde outros experimentos podem ser feitos.

Introdução

A soja (*Glycine max*) é originária da China, onde é conhecida desde aproximadamente 2000 a.C. Sua chegada ao continente Americano ocorreu no final do século XVIII e o primeiro registro no Brasil data de 1882, no estado da Bahia. Entretanto a notável expansão do cultivo de soja no Brasil ocorreu somente a partir de 1970, passando então a figurar entre os principais produtos rentáveis ao país (FERRAZ, 2001).

Durante todo o seu ciclo, a cultura da soja está sujeita ao ataque de pragas, insetos, principalmente, em seu estágio larval que podem atacar as plântulas e posteriormente a planta durante o período que abrange a fase vegetativa até a floração (TURNIPSEED; KOGAN, 1987), destacando-se a lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*) (SAVOLDI, 2000).

De acordo com Almeida (2003), uma outra cultura que tem grande destaque no Brasil é a do milho (*Zea mays*), onde o país é um dos maiores produtores mundiais do grão, mas as lavouras podem ser atacadas por lagartas do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), ocasionando perdas aos agricultores.

Para reduzir as perdas nos plantios são regularmente aplicados inseticidas. A maioria dos inseticidas convencionais trata-se de uma substância química que mata uma ampla variedade de insetos, não apenas aqueles que se alimentam das lavouras. Devido a sua alta toxicidade, vários desses inseticidas também possuem efeitos colaterais muito perigosos para outros elementos que constituem a biosfera, incluindo em alguns casos, o homem. Tais problemas são intensificados pela necessidade de aplicação de inseticidas convencionais nas superfícies das plantas, por intermédio da aplicação por vaporização, o que significa que os vapores subseqüentes dos produtos químicos não podem ser controlados (BROWN, 2003).

Siqueira (2002) relata que, o ideal seria um inseticida eficaz, seguro para o meio ambiente e para o homem, e pesquisas através da manipulação genética podem trazer estes benefícios.

De acordo com Brown (2003), durante a década de 70, a pesquisa genética foi acelerada por uma revolução na biologia experimental. Uma nova metodologia começou a ser desenvolvida, viabilizando o planejamento e a realização, se não com facilidade, pelo menos com sucesso, de experimentos com grande importância. O processo de extração de DNA está entre estes experimentos, pois o DNA é a principal chave de todo o enigma da vida. A aparência de cada espécie biológica, suas funções primárias, a expectativa de vida dos indivíduos que compõem a espécie ou mesmo a sua sobrevivência no planeta estão definidos no DNA contido em suas células. Por essa razão, o DNA tem sido referido como molécula da vida (Farah, 1997).

Assim, este trabalho teve como objetivo testar o protocolo MINIPREP (Modificado de Raeder; Broda, 1985), para a extração de DNA de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*.

Materiais e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Biotecnologia da Universidade Paranaense – UNIPAR, campus de Toledo, no período de julho a agosto de 2005. Na condução do experimento utilizou-se o protocolo MINIPREP (Modificado de Raeder; Broda, 1985), com alterações.

Para a realização do experimento foram coletadas dois tipos de lagartas, *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*, que atacam as culturas da soja (*Glycine Max*) e de milho (*Zea mays*) respectivamente. A coleta das lagartas da soja foi realizada na localidade de Linha Santa Fé, no Município de Palotina, no Oeste do Estado do Paraná, onde fica situado o Campo de Experimentação da Cooperativa Agroindustrial (C.Vale), no período de janeiro de 2005. As lagartas do cartucho foram coletadas na localidade do Distrito de Novo Sobradinho, no Município de Toledo, no Oeste do Estado do Paraná, onde fica situado o Campo de Pesquisa da Empresa Pioneer, no período de julho de 2005. Após a coleta as lagartas foram congeladas em ultra-freezer a uma temperatura de -80 °C até o momento da realização do experimento.

Foram realizados três experimentos, sendo então designados como experimento 01, 02 e 03 respectivamente. No experimento 01 foram utilizadas cinco amostras de *S. frugiperda*, contendo em cada amostra um indivíduo inteiro. Neste experimento, as lagartas foram utilizadas para fazer os testes preliminares com o protocolo MINIPREP (modificado de Raeder; Broda, 1985) antes da realização dos demais experimentos.

No experimento 02 utilizou-se duas amostras de *S. frugiperda* e duas amostras de *A. gemmatalis*, sendo que cada amostra foi composta por indivíduos inteiros. No experimento 03 foram utilizadas seis amostras de *A. gemmatalis*, na seguinte proporção: duas amostras com indivíduos inteiros; duas amostras com metade (1/2) de cada indivíduo; duas com um quarto (1/4) de cada indivíduo. Estas quantidades tiveram como objetivo testar a extração em diferentes proporções para o material selecionado, seguido de modificação no protocolo, para hidrólise de proteínas, empregando-se a proteinase K.

Para extração do DNA, as amostras foram descongeladas e maceradas manualmente com nitrogênio líquido até virar pó, sendo o material macerado colocado em microtubos (1,5 mL) congelados. Foi adicionado 400µL de tampão de extração [900µL SDS 10%, 300µL EDTA 0,5 M (pH 8,0), 150µL Tris-HCl 1M (pH 8,0), 3µL β Mercaptoetanol 10%, 1620µL de água ultra pura para completar o volume], nos microtubos. Posteriormente foi feita incubação do material a 65 °C por 60 minutos em banho - maria, onde os tubos foram agitados suavemente a cada 10 minutos durante a incubação. Os tubos foram retirados do banho – maria e deixados esfriar em temperatura ambiente, seguidos de uma centrifugação a 14000 rpm e 15 °C por 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, adicionando 500µL de clorofórmio-alcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados por suaves inversões por 10 minutos e centrifugados com a mesma velocidade e mesma temperatura, e a fase aquosa de cada

tubo foi transferida para novos tubos, adicionando novamente clorofórmio-alcool isoamílico (24:1). Na seqüência, agitou-se os tubos e submeteu-se a nova centrifugação mantendo-se a velocidade e temperatura da centrifuga. Repetiu-se a operação de transferir os sobrenadantes para novos tubos e adicionar clorofórmio-alcool isoamílico (24:1), agitando os tubos e centrifugando por mais 10 minutos, onde a fase aquosa foi transferida para novos tubos e adicionou-se 1/3 de acetado de sódio (NaOAc 3M pH 5,2), e 2/3 do volume de isopropanol gelado, invertendo os tubos manualmente algumas vezes, onde amostras foram deixadas no freezer há uma temperatura de -20 °C por 3 horas.

Os tubos com as amostras foram retirados do freezer e centrifugados por 10 minutos com a velocidade de 14000 rpm a 4 °C, onde se formou um precipitado branco (pellet) no fundo do tubo. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado duas vezes com etanol 70% e uma vez com etanol 95%, deixando secar em temperatura ambiente durante 15 minutos.

O DNA foi ressuscitado em 200µL de TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) pH 8,0 e tratado com RNase para concentração final de 40µL de RNase.mL⁻¹, sendo incubado 37 °C por 20 minutos.

Foi adicionado nos tubos 1/3 de acetado de sódio (NaOAc 3M pH 5,2), e 2/3 do volume de isopropanol gelado para precipitar o DNA, invertendo os tubos manualmente, onde foram recolocados no freezer, onde assim houve completa precipitação.

Após a retirada das amostras do freezer, foi feita uma nova centrifugação com a velocidade de 14000 rpm a uma temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi removido e descartado, ficando o precipitado, sendo este lavado duas vezes com etanol 70% e uma vez com etanol 95%, deixando secar em temperatura ambiente por 15 minutos, com aplicação 300µL de TE no precipitado.

Para eliminação das proteínas, após a primeira lavagem das amostras com etanol, adicionou-se 5µL de proteinase K (20g. ml⁻¹) e 10µL de 1mM CaCl₂, nas amostras, que foram incubadas em banho - maria a 37 °C durante 30 minutos.

Após a incubação foi adicionado 500µL de isopropanol gelado, deixando precipitar por 02 minutos. Centrifugou-se em por 10 minutos os tubos a uma velocidade de 13.200 rpm a 15 °C, onde o sobrenadante foi retirado e o precipitado deixado secar em temperatura ambiente durante 15 minutos.

A quantificação do DNA foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, e no experimento 02 as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro. A formula utilizada para determinar a concentração de DNA nas amostras foi a seguinte: DNA (µg.µL⁻¹) = A260 x f x 50 / 1000 (A260 = leitura no espectofotômetro em 260 nm de DNA, f = fator de diluição das amostras (500/50µL), neste caso: f = 10, 50 = volume das amostras).

Resultados e Discussão

Mesquita et al. (2001) relata em seu trabalho de pesquisa a existência de vários protocolos que utilizam técnicas e estratégias diferentes para a obtenção de DNA. A obtenção do DNA genômico é um passo importante para a realização de outros experimentos com o DNA obtido.

Com a finalidade de experimentação do protocolo MINIPREP (Modificado de Raeder; Broda, 1985) na extração de DNA de lagartas, observou-se a presença de bandas nas amostras 03 e 04 (conforme Figura 01), sugerindo-se que o protocolo pode ser utilizado na extração de DNA de lagartas, mas deve ser feito modificações. Observa-se também, a presença de DNA nos poços do gel de eletroforese, onde Ferreira; Grattapaglia (1998) afirmam que isto pode ser devido ao DNA contaminado (polissacarídeos).

A quantidade, pureza e integridade do ácido nucléico extraído dependem de muitos fatores e tem grande influência no resultado (WALKER; RAPLEY, 1999). Assim, as modificações devem ser feitas no sentido de eliminar contaminações, pois se gel apresentou possíveis contaminações nas bandas e presença de RNA (Figura 01).

Segundo Ferreira; Grattapaglia (1996), o processo de extração e purificação inclui fases críticas como: a qualidade do tecido empregado, a proporção entre tampão e tecido empregado, a temperatura no banho-maria deve estar em média a uma temperatura de 60 °C, a agitação dos tubos na fase de extração, na fase de adição do isopropanol, para a separação das fases, as concentrações e o tempo de centrifugação devem estar adequados e na precipitação do DNA, este pode apresentar contaminação com outros produtos.

Conforme Molinari; Crochemore (2001), determinadas extrações podem fornecer DNAs parcialmente degradados ou contaminados, além da presença de RNA que pode ser observado no gel de eletroforese, que por meio de modificações é possível serem eliminadas, podendo fornecer um DNA de boa qualidade. Pode-se observar no gel de eletroforese a presença de RNA ribossômico (rRNA) e RNA mensageiro (mRNA), onde de acordo com Ferreira; Grattapaglia (1998), através da visualização no gel de eletroforese é possível se observar a presença de RNA, onde o superior é rRNA e a parte abaixo é mRNA.

No experimento 02 (Figura 02) foi observada a presença de bandas no gel de eletroforese nas amostras 02 e 04, sendo uma lagarta do milho (*Spodoptera frugiperda*) e uma lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*), respectivamente. Diante disso é possível dizer que o protocolo tem potencial para ser utilizado na extração de DNA de *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis*, porém apresenta contaminações, devido ao arraste presente nas bandas.

Ao comparar um indivíduo com outro, através da leitura em espectrofotômetro (Tabela 01), observou-se que a amostra 04 possui uma maior concentração de DNA ($\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$), em seguida as amostras 02, 01 e 03 com menores concentrações em ordem decrescente. Em relação à

contaminação com proteínas observou que a qualidade das amostras ficou comprometida.

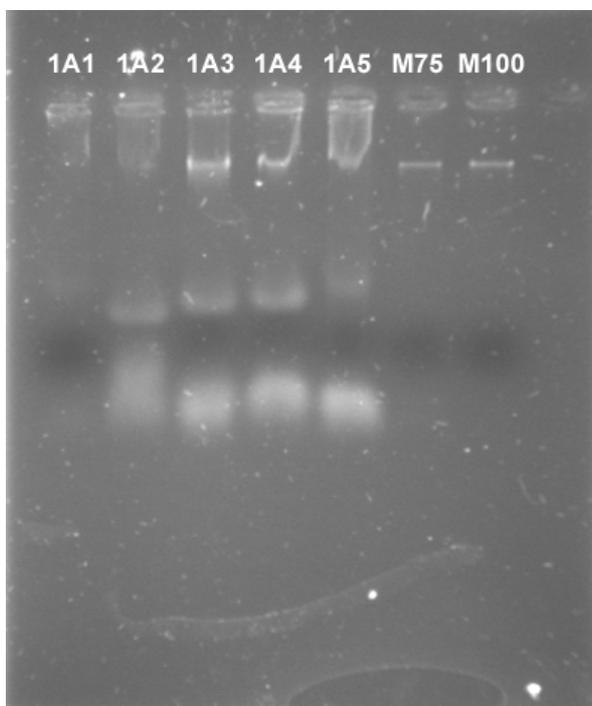


FIGURA 01 - Quantificação em gel de agarose 0,8% contendo as 05 amostras de *Spodoptera frugiperda* do experimento 01. As últimas 02 bandas os marcadores com DNA padrão

De acordo com Viera, (2005), quando as amostras forem lidas em espectrofotômetro, quanto mais concentradas estiverem às amostras, maiores serão os valores de absorvância, uma vez que maior quantidade de luz ultravioleta será absorvida pela amostra. Para a indicação da qualidade das amostras, deve-se observar os seguintes valores: entre 1,2 e 2,0 indicam uma boa qualidade do DNA. Valores abaixo de 1,2 indicam contaminação com proteínas.

Tabela 01 - Concentrações de DNA e contaminação com proteínas nas amostras do experimento 02

Amostras	A 260	A 280	R= 260/280	DNA ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)
01	0,046	0,263	0,175	0,023
02	0,141	0,361	0,390	0,070
03	0,018	0,220	0,081	0,009
04	0,456	0,623	0,731	0,228

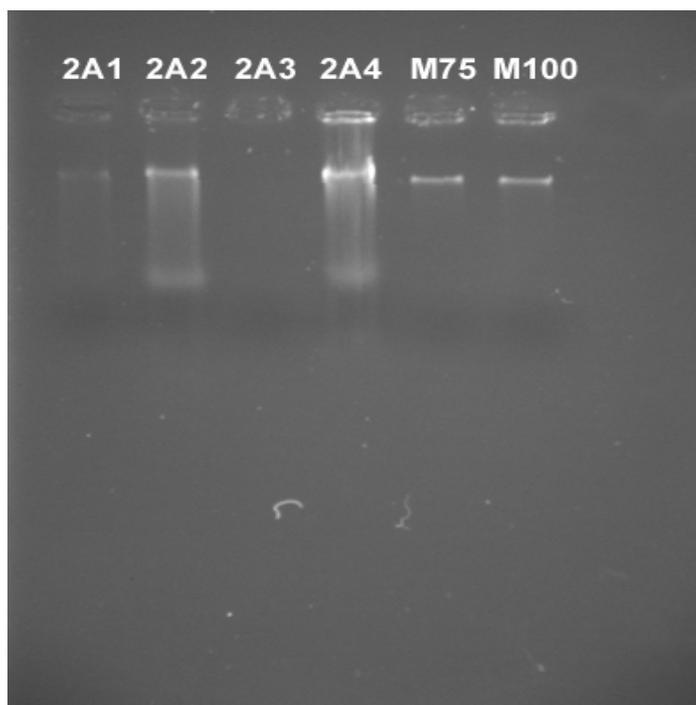


FIGURA 02 – Quantificação em gel de agarose 0,8% contendo 02 amostras de *Spodoptera frugiperda* e 02 amostras de *Anticarsia gemmatalis*. As duas últimas bandas os marcadores com DNA padrão.

Observando o gel de eletroforese no experimento 03, observou-se a presença de bandas com uma melhor resolução nas amostras 01 e 02, que foram obtidas com indivíduos inteiros, onde nas amostras 03, 04, 05 e 06, que foram obtidas com 1/2 lagartas e 1/4 de lagartas apresentam bandas fracas e com uma resolução inferior (Figura 03).

A presença de RNA ainda está presente depois da extração e purificação do DNA, onde pode ser visto a presença de rRNA e mRNA no gel.

A adição de Proteinase K proporcionou melhoras no gel, na resolução das bandas, onde possuíram menos arrastes, mas ainda há contaminação presente no gel de eletroforese.

Barea et al. (2004) relata que a Proteinase K tem a capacidade de hidrólise de proteínas quando submetido a altas temperaturas, e apresenta melhoras significativas na qualidade do DNA extraído. Trata-se de um método muito utilizado, o qual apresenta variáveis, principalmente quanto ao tempo de incubação e a sua concentração, onde deve ser adequado a cada tipo de protocolo utilizado.

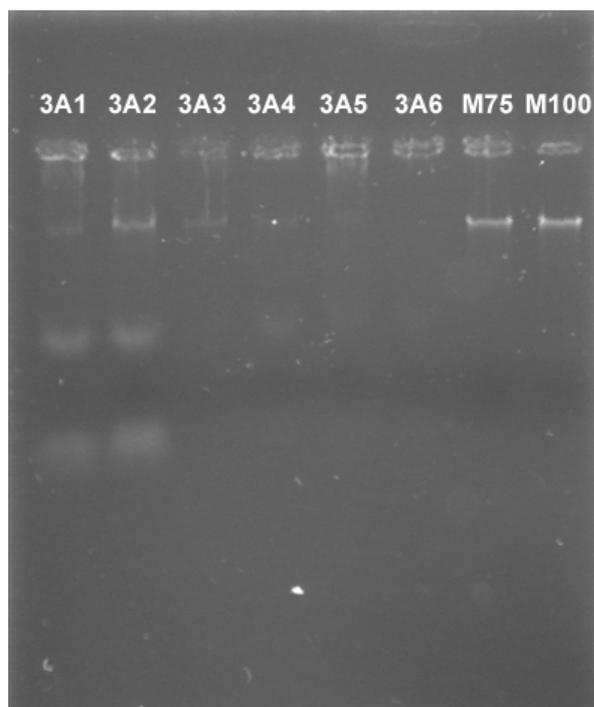


FIGURA 03 - Quantificação em gel de agarose 0,8% contendo 06 amostras de *Anticarsia gemmatalis*, onde as amostras 3A1 e 3A2 são indivíduos inteiros, as amostras 3A3 e 3A4 1/2 indivíduos e as amostras 3A5 e 3A6 1/4 de indivíduos. As duas últimas bandas os marcadores com DNA padrão.

Conclusões

Pela análise dos resultados, concluiu-se que:

O protocolo apresenta potencial para ser usado, porém é necessário modificações para eliminar a contaminação presente depois da extração e purificação de DNA de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*. Por meio de modificações no protocolo MINIPREP (modificado de Raeder; Broda, 1985), pode-se obter um protocolo específico para a extração de DNA de lagartas, onde outros experimentos podem ser feitos visando outras pesquisas importantes.

Sugere-se a continuidade da pesquisa, visando obter um protocolo mais eficiente na extração de DNA de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*, fazendo outras modificações no protocolo MINIPREP (modificado de Raeder; Broda, 1985) e testar outros protocolos para serem comparados com o utilizado nesta pesquisa.

Referências

- Almeida, K. Lagarta do cartucho, inimigos naturais podem salvar a lavoura. 1-2p, 2003. Disponível em: <<http://revista.fapemig.br/materia.php>>. Acesso em: 30 de novembro de 2009.
- Barea, A J.; Pardini, C. M. I. M.; Gushiken, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de

polimerização em cadeia (PCR). Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. São Paulo: UNESP, 2004.

Brown, T.A. Clonagem genética e análise de DNA. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 13-80 p., 2003.

Farah. S. B. DNA segredos e mistérios. São Paulo: Sarvier, 16-118 p., 1997.

Ferraz, L.C.C.B. As meloginoidoses da soja: passado, presente e futuro. Londrina: Embrapa soja e sociedade Brasileira de Nematologia., 18 p, 2001.

Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores em análise genética. 3ª ed. Brasília: Embrapa/Cenargem, 121-125 p., 1998.

Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores em análise genética. 2ª ed. Brasília: Embrapa/Cenargem, 220 p., 1996.

Mesquita, R. A.; Anzai, K. E.; Oliveira, N. R.; Nunes, D. F. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. Pesquisa odontologia Brasileira. 314-319 p., 2001.

Molinari, B.H; Crochemore, L. M. Extração de DNA genômico de Passiflora spp. Para análises PCR-RAPD. Jaboticabal: Revista Brasileira de Fruticultura, 1-8 p., 2001.

Oliveira, F. Engenharia genérica: o sétimo dia da criação. São Paulo: Moderna, 21- 66 p., 1995.

Savoldi, M. Ocorrência de lagartas representa uma ameaça á cultura da soja. Área de Comunicação Empresarial da Embrapa Trigo, 1 p. 2000.

Siqueira, A. ICB desenvolve bioinseticida para combater praga do milho. 1-2p, 2002. Disponível em: <<http://ufmg.br.boletim/bol1349/terceira.syhml>> Acesso em: 30 de novembro de 2005.

Turnipseed, S. G; Kogan, M. Integrated control of insect-pest. Soybeans: improvent, production and uses. Madison: Agronomy, 779-817 p., 1987.

Vieira, N. S. E. Purificação e análise de ácido nucléicos. Toledo: UNIPAR, 2-7 p., 2005.

Walker, M. R.; Rapley. Guia de rotas da tecnologia do gene. São Paulo: Artheneu, 334 p., 1999.