

COMUNICADO
TÉCNICO

209

Brasília, DF
Novembro, 2021

Embrapa

Otimização de protocolo de extração de DNA genômico do bicho-mineiro do café (*Leucoptera coffeella*) para sequenciamento *Long-Read*

Eliza F. de Melo Bellard do Nascimento
Luiz Carlos Gonçalves dos Santos
Leonardo A. Vidal
Vívian dos Santos Lucena-Leandro
Camila Ivo C. Vilarinho Fernandes Junqueira
Juliana Dantas de Almeida
Thompson França Tomatieli
Andrea Queiroz Maranhão
Érika Valéria Albuquerque Saliba Albuquerque

Otimização de protocolo de extração de DNA genômico do bicho-mineiro do cafeeiro (*Leucoptera coffeella*) para sequenciamento *Long-Read*¹

¹ **Eliza F. de Melo Bellard do Nascimento**, bióloga, doutora em Botânica, bolsista FUNAPE na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. **Luiz Carlos Gonçalves dos Santos**, biólogo, bolsista FUNAPE na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. **Leonardo A. Vidal**, graduando em agronomia, bolsista Concafé na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. **Vivian dos Santos Lucena-Leandro**, bióloga, mestre em fitopatologia, bolsista FUNAPE na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. **Camila Ivo C. Vilarinho Fernandes Junqueira**, graduanda em agronomia, bolsista CNPq na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. **Juliana Dantas de Almeida**, bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. **Thompson França Tomatieli**, biólogo, doutorando em Biologia Molecular, técnico de laboratório na Universidade de Brasília (UnB). **Andrea Queiroz Maranhão**, bióloga, doutora em Biologia Molecular, professora associada ao Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília (UnB). **Érika Valéria Albuquerque Saliba Albuquerque**, bióloga, doutora em Systèmes Intégrés en Biologie e em Biologia Celular e Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Introdução

O bicho-mineiro do cafeeiro (BMC) (*Leucoptera coffeella*) (Guérin-Mèneville & Perrottet) (Lepidoptera: Lyonetiidae) é uma praga exclusiva dos cafeeiros, capaz de causar prejuízos de até 87% na produção (Neves, 2016; Souza et al., 2006). Durante os estádios iniciais, os quatro instares larvais do BMC se alimentam do mesofílo foliar (Motta et al., 2021), causando necrose e desfolha que comprometem a capacidade fotossintética da planta, afetando diretamente a qualidade e produção dos grãos de café (Costa et al., 2012; Guérin-Mèneville; Per-

rottet, 1842). Apesar de ser um grão não essencial à alimentação humana, o café é produzido por milhões de produtores em mais de 60 países, sendo o Brasil o maior produtor, o que reflete em uma ampla cadeia produtiva, considerada uma das mais lucrativas do mundo (Concafé, 2020; USDA, 2021). Entretanto, a manutenção dessa cadeia produtiva enfrenta desafios em função das diferentes pragas que a ameaçam.

O controle do BMC a partir de pesticidas químicos é necessário, entretanto acarreta desvantagens como a seleção de populações resistentes, custos elevados e efeitos

nocivos ao ambiente e à saúde humana (Leite et al., 2020; Leite et al., 2021; Dantas et al., 2021). Estas limitações evidenciam a necessidade do desenvolvimento de estratégias para a implementação de sistemas de manejo integrado de pragas (MIP), que permitam o aumento e qualidade da produção dos grãos e concomitantemente proteja o ambiente (Sawinska et al., 2020; Dantas et al., 2021).

Nesse sentido, a caracterização molecular de *L. coffeella* com o sequenciamento do seu genoma de referência é fundamental para o aprimoramento de técnicas de melhoramento genético, além de ser referência para análises do seu transcriptoma, que permitirá, por exemplo, estudos moleculares como a exploração de genes-alvo para o silenciamento gênico via RNA interferente (RNAi) e marcadores moleculares. Estas abordagens viabilizarão o desenvolvimento de soluções biotecnológicas visando o controle dessa importante praga nos parques cafeícolos.

Para tal, desenvolvemos um novo método que garantiu de forma consistente a obtenção de DNA genômico (DNAg) com alta qualidade, exigida para sequenciamento

Long-Read (PacBio). Essa tecnologia permite grande comprimento de leitura, podendo alcançar até 60–80 kb, necessitando o estabelecimento de extração de amostras de DNAg com tamanho de fragmento e qualidade suficientemente altos que permitam comprimentos de leitura mais longos (Oppert et al., 2019). Descrevemos a seguir o protocolo de extração de DNAg estabelecido para o BMC.

Material e Métodos

As extrações foram realizadas a partir de pupas do BMC coletadas em folhas de *C. arabica*, em que se utilizou o kit E.Z.N.A insect DNA (Omega BioTek, Cat. No.: D0926-02) para obtenção do DNAg do inseto. O protocolo fornecido pelo kit foi modificado para obter maior quantidade e qualidade de DNAg extraído.

Lise celular: devido a perda da quantidade e qualidade da amostra (dados não mostrados), não seguimos o protocolo sugerido pelo kit de maceração em nitrogênio líquido. Para promover a lise celular, macerar 20 pupas (aproximadamente 10 mg) em tubo *Dounce* acrescido de 700 μ L de tampão de lise (CTL) por aproximadamente 2 minutos. Transferir

a amostra macerada para um tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL com auxílio de uma pipeta de 1 mL com ponteira de boca larga.

Digestão de proteínas: adicionar 5 μL de proteinase K (Invitrogen, Cat. No.: AM2544) ao tecido macerado em tampão CTL. Inverter o tubo cuidadosamente 10 vezes e incubar por 16 horas a 37 °C sob agitação leve (100 rpm). A incubação por mais tempo (16 horas) e temperatura mais baixa (37 °C) aumentou o rendimento e reduziu a degradação das amostras.

Extração do DNA: adicionar 700 μL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e inverter o tubo cuidadosamente 20 vezes. Para evitar a degradação, não recomendamos o uso do Vortex. Centrifugar a 10.000 \times g por 2 minutos à temperatura ambiente. Transferir a fase aquosa (aproximadamente 500 μL) para um novo tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL com auxílio de uma pipeta com ponteira de boca larga. Evitar qualquer precipitado leitoso formado na interface.

Digestão de RNase: adicionar 3 μL de RNase A (Invitrogen, Cat. No.: 12091021). Inverter o tubo cuidadosamente 10 vezes e incubar por 30 minutos a 37 °C. Transferir a amo-

tra para novo tubo de microcentrífuga estéril de 2 mL. Adicionar 500 μL de tampão BL. Inverter o tubo cuidadosamente 20 vezes e incubar por 10 minutos a 70 °C.

Precipitação do DNA: adicionar 1 mL de etanol 100% e inverter o tubo cuidadosamente 20 vezes. Para evitar a degradação, não recomendamos o uso do Vortex.

Purificação do DNA: Com auxílio de uma pipeta de 1 mL com ponteira de boca larga, adicionar 750 μL da amostra à Mini Coluna HiBand DNA inserida em um tubo de coleta de 2 mL (ambos fornecidos no kit). Centrifugar a 15.000 \times g por 30 segundos. Descartar o filtrado e repetir a etapa anterior, na mesma coluna, até o volume da amostra acabar. O último volume deve ser centrifugado por 1 minuto. Adicionar 500 μL de tampão HBC. Centrifugar a 15.000 \times g por 1 minuto. Descartar o filtrado e adicionar 700 μL de tampão de lavagem de DNA (fornecido no kit). Centrifugar a 15.000 \times g por 1 minuto. Repetir a etapa anterior para uma segunda lavagem. Após as etapas de lavagem, centrifugar a coluna vazia por 2 minutos a 15.000 \times g. Transferir a coluna para um novo tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL. Adicionar cuidadosamente no centro da membrana

da coluna: 15 μ L do tampão de eluição à temperatura ambiente, incubar por 5 minutos, centrifugar a 15.000 \times g por 30 segundos, adicionar novamente mais 15 μ L do tampão de eluição à temperatura ambiente, incubar por mais 5 minutos e centrifugar a 15.000 \times g por 30 segundos.

Controle de qualidade e armazenamento: após a extração, o DNA deve ser avaliado quanto a sua quantidade e qualidade, analisados em NanoDrop, Qubit, eletroforese em gel de agarose e Femto Pulser. O DNA deve ser armazenado a 4 °C. Se necessário, as amostras podem ser congeladas a -20 °C, entretanto a qualidade pode ser comprometida.

Resultados e Discussão

Neste protocolo apresentamos uma nova metodologia, rápida e reproduzível para obtenção de DNAg do BMC com elevada qualidade para sequenciamento *Long-Read* (PacBio). Os insetos, em sua maioria, possuem altas quantidades de quitina em sua estrutura, além de apresentarem hábitos alimentares com componentes que dificultam a extração de material genético de alta qualidade (Wouters, 2020). Alguns

métodos tradicionais de extração de DNAg utilizados em outros insetos não foram aplicados com sucesso para as extrações das nossas amostras (Wouters, 2020). Dessa forma, exploramos diferentes protocolos bem sucedidos (recomendados pela PacBio) em insetos como *Anopheles coluzzii*, *Tribolium castaneum* e *Hyles vespertilio* (Kingan et al., 2019; Oppert et al., 2019; Pippel et al., 2020) para estabelecer o protocolo de extração de DNAg para o BMC.

Após realizarmos testes de extrações de diferentes estádios de desenvolvimento (pupas, diferentes estádios larvais e adultos), concluímos que as pupas forneceram DNA de melhor qualidade, por não apresentarem abundância de material quitinoso e vestígios alimentares em seu sistema digestivo. As amostras de DNAg extraídas apresentaram concentrações, relações de absorvância (A260/A280 e A260/A230) e integridade recomendadas para sequenciamento *Long-Read* (PacBio). As avaliações desses parâmetros foram conduzidas em *NanoDrop* e *Qubit* (Tabela 1), gel de agarose (Figura 1) e *Femto Pulse* (Figura 2).

Tabela 1: Razões de absorbância e concentrações de DNAG de pupas de *L. coffella* quantificadas no *Nanodrop* e *Qubit*, respectivamente

Amostra	A260/A280	A260/A230	Concentração (ng/μL) Nanodrop	Concentração (ng/μL) Qubit
P1	1,83	2,22	360,8	309,6
P1	1,88	2,25	370,1	260,0

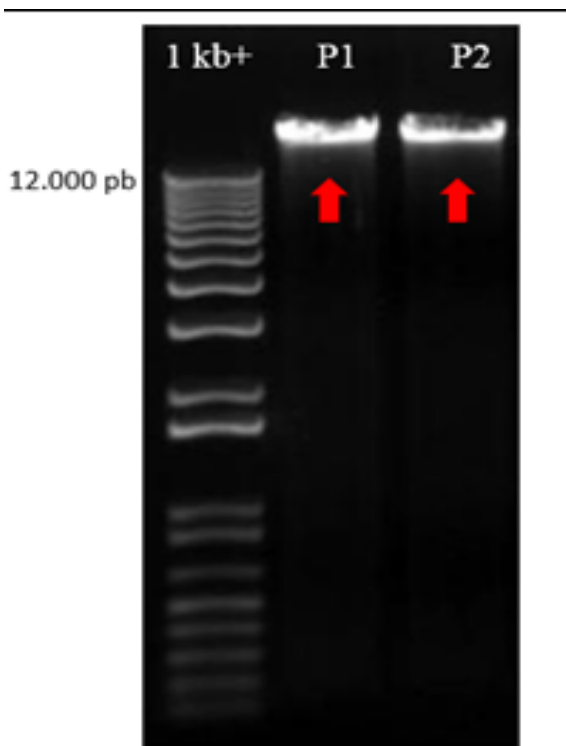


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio após 1 hora e 30 minutos de corrida a 50 volts (V). O marcador utilizado foi o 1Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen) (poço 1). Amostras P1 e P2 com bandas de DNAG com tamanho superior a 12.000 pb (setas vermelhas).

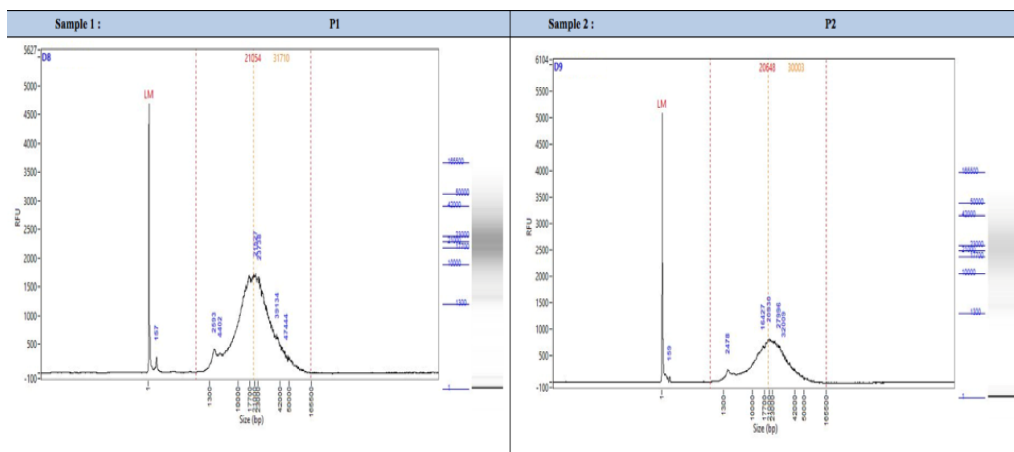


Figura 2: Eletroferograma do controle de qualidade das amostras de DNAg estimado no *Femto Pulse* (Agilent). P1: 46,3 % de fragmentos acima de 20.000 pb; P2: 49,9 % de fragmentos acima de 20.000 pb, ideal para o sequenciamento PacBio.

Mudanças importantes foram realizadas no protocolo do *kit E.Z.N.A insect DNA*: 1) o material vegetal não foi macerado em nitrogênio líquido. Para promover a lise celular, as pupas foram maceradas em tubos *Dounce* com tampão CTL (fornecido no *kit*); 2) para evitar a degradação do DNAg, pipetas de calibre maior e com ponteira de boca larga foram utilizadas para qualquer movimentação da amostra; 3) o Vórtex não foi adotado para misturar as amostras. Foram realizados movimentos suaves por inversão; 4) durante a lise celular e digestão de proteínas, as amostras foram incubadas por mais tempo a uma temperatura mais baixa e sob agitação leve para au-

mentar o rendimento e reduzir a degradação das amostras; 5) o DNAg não foi eluído em tampão aquecido a 70 °C. O DNAg se manteve mais íntegro após a eluição em tampão à temperatura ambiente e 6) o volume do tampão de eluição foi reduzido para não diluir as amostras. Essas recomendações forneceram melhorias significativas para a obtenção do DNAg de *L. coffella* e podem ser aplicadas para outras espécies de insetos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao pesquisador Adriano Veiga da Embrapa Cerrados, por fornecer acesso às plantações de café e por ajudar na coleta de insetos e à Genomix Data, pela assessoria científica durante o desenvolvimento do trabalho. Trabalho apoiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café - Bolsa CBP & D / Café nº 10.18.20.004.00.00. As bolsas de Eliza F. de Melo Bellard do Nascimento, Luiz Carlos Gonçalves dos Santos, Leonardo A. Vidal e Vívian dos Santos Lucena-Leandro foram financiadas pelo Consórcio Pesquisa Café (Concafé) via Fundação de Apoio à Pesquisa - FUNAPE. A bolsa de Camila Ivo C. Vilarinho Fernandes Junqueira foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

Referências

CONCAFE. Consórcio Pesquisa Café. **Produção dos Cafés do Brasil atinge 61,62 milhões de sacas de 60kg em 2020, volume 25% maior que 2019.** 2020. Disponível em: <[\[quisacafe.com.br/index.php/imprensa/noticias/1023-2020-09-29-15-22-05\]\(http://quisacafe.com.br/index.php/imprensa/noticias/1023-2020-09-29-15-22-05\)>. Acesso em: 21 out. 2020.](http://www.consorciopes-</p>
</div>
<div data-bbox=)

COSTA, J. N. M.; TEIXEIRA, C. A. D.; JÚNIOR, J. R. V.; ROCHA, R. B.; FERNANDES, C. de F. **Informações para facilitar a identificação das diferentes fases do bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) em campo.** Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2012. 4 p. (Embrapa Rondônia / Comunicado Técnico, 384).

DANTAS, J., MOTTA, I.O., VIDAL, L.A., NASCIMENTO, E.F.M.B., BILIO, J., PUPE, J.M., VEIGA, A., CARVALHO, C., LOPES, R.B., ROCHA, T.L., SILVA, L.P., PUJOL-LUZ, J.R., ALBUQUERQUE, É.V.S. A Comprehensive Review of the Coffee Leaf Miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae)—A Major Pest for the Coffee Crop in Brazil and Others Neotropical Countries. *Insects*, v. 12, n. 12, p. 1130, dez. 2021

GUÉRIN-MÉNEVILLE, F.-É.; PERROTET, S. **Mémoire sur un insecte et un champignon qui ravagent les cafiers aux Antilles.** Paris: Bouchard-Huzard, 1842. 40 p.

KINGAN, S. B.; HEATON, H.; CUDINI, J.; LAMBERT, C.C.; BAYBAYAN, P.; GALVIN, B. D.; DURBIN, R.; KORLACH, J.; LAWNICZAK, M. K. N. A high-quality de novo genome assembly from a single mosquito us-

ing pacbio sequencing. **Genes**, v. 10, n. 62, 2019. doi:10.3390/genes10010062.

LEITE, S. A.; GUEDES, R. N. C.; SANTOS, M. P. DOS; COSTA, D. R. DA; MOREIRA, A. A.; MATSUMOTO, S. N.; LEMOS, O. L.; CASTELLANI, M. A. Profile of coffee crops and management of the neotropical coffee leaf miner, *Leucoptera Coffeella*. **Sustainability**, v. 12, n. 8011, 2020, doi:10.3390/su12198011.

LEITE, S. A.; SANTOS, M. P. DOS; COSTA, D. R. DA; MOREIRA, A. A.; GUEDES, R. N. C.; CASTELLANI, M. A. Time-concentration interplay in insecticide resistance among populations of the neotropical Coffee Leaf Miner, *Leucoptera Coffeella*. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 23, p. 232-241, 2021. doi:10.1111/afe.12425.

MOTTA, I.O., DANTAS, J., VIDAL, L., BÍLIO, J., PUJOL-LUZ, J.R., ALBUQUERQUE, É.V.S., The coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae): identification of the larval instars and description of male and female genitalia. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 65, 27 ago. 2021.

NEVES, M. F. **Análise dos benefícios econômicos e sociais da utilização do carbofurano no controle de nematoides, Bicho Mineiro (*Leucoptera Coffeella*) e cigarra do cafeeiro (*Quesada Gigas* e *Fidicina Pronoe*) na cultura do café.** Universidade

de São Paulo, 2016.

OPPERT, B.; STOSS, S.; MONK, A.; SMITH, T. Optimized Extraction of Insect Genomic DNA for Long-Read Sequencing. **Methods and Protocols**, v. 2, n. 4, p. 89, 2019. doi:10.3390/mps2040089.

PIPPEL, M.; JEBB, D.; PATZOLD, F.; WINKLER, S.; VOGEL, H.; MYERS, G.; HILLER, M.; HUNSDOERFER, A. K. A Highly Contiguous Genome Assembly of the Bat Hawkmoth Hyles Vespertilio (Lepidoptera: Sphingidae). **GigaScience**, v. 9, 2020. doi:10.1093/gigascience/giaa001.

SAWINSKA, Z.; ŚWITEK, S.; GŁOWICKA-WOŁOSZYN, R.; KOWALCZEWSKI, P.Ł. Agricultural practice in Poland before and after mandatory IPM implementation by the European Union. **Sustainability**, v. 12, p. 1107, 2020. doi:10.3390/su12031107.

SOUZA, J.C. DE; REIS, P. R.; RIGITANO, R. L. DE O.; CIOCIOLA JÚNIOR, A. I. Eficiência de thiamethoxam no controle do bicho-mineiro do cafeeiro. II - Influência na época de aplicação via irrigação por gotejamento. **Coffee Science**, Lavras, v. 1, n. 2, p. 150-155, jul./dez. 2006.

USDA. ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **Coffee: World Markets and Trade.** Washington: Department of Agricul-

ture, 2021. Disponível em: < . Acesso em: 4 ago. 2021.

WOUTERS, R. E; MUGFORD, S.; BIELLO, R.; HEAVENS, D.; HOGENHOUT, S. **Extraction of High Molecular Weight DNA from Aphids and Other Sap-Feeding Insects for Long-Read Sequencing.** *Protocols*. io. 2020. Disponível em: <<https://www.protocols.io/view/extraction-of-high-molecular-weight-dna-from-aphid-bhftj3nn>>. Acesso em: 04 ago. 2021. doi:10.17504/protocols.io.bhftj3nn.

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Parque Estação Biológica
PqEB, Av. W5 Norte (final)
70970-717, Brasília, DF Fone: +55 (61) 3448-470
Fax: +55 (61) 3340-3624
www.embrapa.br www.embrapa.br/fale-conosco/sac Comitê Local de Publicações da Unidade Responsável

Embrapa

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



**PÁTRIA AMADA
BRASIL**
GOVERNO FEDERAL

Presidente
Wagner Alexandre Lucena
Secretária-Executiva
Daniela Aguiar de Souza
Membros
Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes;
Andrielle Camara Amaral Lopes; Bruno
Machado Teles Walter; Daniela Aguiar de
Souza; Debora Pires Paula; Edson Junqueira
Leite; Márcio Martinello Sanchez; Marcos
Aparecido Gimenes; Solange Carvalho Barrios
Roveri Jose
Supervisão editorial
Daniela Aguiar de Souza
Revisão de texto
Jakcelia Costa da Silva
Normalização bibliográfica
Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes
Tratamento das ilustrações
Marcus Vinicius Pereira e Souza
Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro
Editoração eletrônica
Marcus Vinicius Pereira e Souza
Foto da capa
Leonardo A. Vidal
1ª edição
1ª impressão (2021): tiragem