

## PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ANÁLISE DO MARCADOR MOLECULAR ISSR EM *SITOPHILUS ORYZAE* E *S. ZEAMAI*S (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

Alexia Marques Fernandes dos Santos (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Ana Silvia Lapenta (Orientador), e-mail: aslapenta@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia, PR

### Área Genética/ subárea Genética Animal

**Palavras-chave:** *Sitophilus zeamais*, marcadores ISSR, extração de DNA.

### Resumo

Grandes perdas da produção ocorrem durante o processo de armazenagem destes grãos, sendo que as espécies *Sitophilus oryzae* e *S. zeamais* são importantes pragas de grãos armazenados, responsáveis por grande prejuízo econômico. O desenvolvimento deste trabalho teve por objetivo estabelecer a melhor técnica de extração de DNA para esta espécie, selecionar os *primers* e estabelecer as condições ideais de amplificação e de separação do produto amplificado para futuros estudos do polimorfismo de DNA, utilizando o marcador ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Com essa finalidade foram testados 41 *primers*, dos quais 27 *primers* polimórficos foram selecionados.

### Introdução

O mau armazenamento de grãos pode levar depreciação dos produtos e perda de valor comercial. Dentre as principais causas estão os ataques por insetos, tendo como destaque o gorgulho do arroz e do milho, *Sitophilus oryzae* e *Sitophilus zeamais*, respectivamente (DROSDOSKI, 2015). Os estudos sobre a estrutura genética das populações de insetos praga podem contribuir para o seu controle, visto que restrições no fluxo gênico entre as linhagens possuem um importante papel na evolução e adaptação local, incluindo o desenvolvimento de resistências a inseticidas (GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2002). Muitas pesquisas sobre variabilidade genética nos últimos anos são baseadas em análises utilizando marcadores moleculares. O ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), é um marcador bastante difundido. Por meio da análise deste marcador são gerados fragmentos de DNA de 100 a 3000 pb, amplificados via PCR usando somente um *primer* com 16 a 20 pb, desenhado a partir de sequências de microssatélites, amplificando a região inter-SSR (ZIETKIEWICZ et al., 1994). O objetivo desse trabalho foi estabelecer a melhor técnica de

extração de DNA dos insetos da espécie estudada, selecionar os *primers* ideais e estabelecer as condições de amplificação e de separação do produto amplificado para futuros estudos de polimorfismo de DNA utilizando o marcador ISSR.

## Materiais e métodos

### *Extração, quantificação e amplificação de DNA e análise dos ISSR*

A extração de DNA genômico foi baseada no protocolo de Coelho-Bortolo et al. (2015). Foram avaliados 80 indivíduos provenientes de 4 populações de *Sitophilus zeamais* de estabelecimentos comerciais das cidades de Maringá e Toledo. Cada inseto foi individualmente macerado com 200 µl de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM, pH 8, EDTA 50 mM pH 8, NaCl 2 M, SDS 2%, e Proteinase K 100 µg/ml) e incubado por 30 minutos a 65 °C. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio ácool-isoamílico (24:24:1) e as fases homogêneas por três minutos. O material foi centrifugado por 10 minutos, 12.000 rpm à temperatura ambiente. A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo plástico, e adicionado 150µl clorofórmio ácool-isoamílico (24:24:1), como descrito anteriormente. O DNA precipitou pela adição de 50 µL de isopropanol gelado e permaneceu em *over night* -20°C. Em seguida, centrifugou-se as amostras por 10 minutos 12.000 rpm à temperatura ambiente. O DNA precipitado foi lavado com 50 µL de etanol 70% gelado, seco em à temperatura ambiente, ressuspensão em TE 0,1X (Tris-HCl 1 mM pH 8, EDTA 0,1 mM), e então adicionado RNAase (10µg.ml<sup>-1</sup>) e armazenado a - 4 °C. A quantificação das amostras foi feita no *Picodrop®* - Espectrofotômetro UV-Vis. Foram utilizados para esse estudo 41 marcadores de ISSR. A PCR foi realizada no termociclador Techne TC-512. Os reagentes empregados para cada reação foram tampão de reação 1X (10 mM de Tris-HCl, pH 8,8), diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de cada dNTP, 1U de *Taq-DNA Polimerase Platinum* (Invitrogen) a concentração de DNA que foi avaliada, o *primer* específico e água mili-Q para um volume final de 20 µL de solução. A temperatura de anelamento foi padronizada para cada *primer* num intervalo de 48 °C até 52. Aos produtos da amplificação foram adicionados 2µL de tampão *Loading* (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30%) e estes separados em gel de agarose com concentração definida, usando tampão TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA). Os géis foram expostos a um campo elétrico de 60 Volts, por aproximadamente 4 horas e após este período foram corados em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL. A imagem foi capturada em transluminador L-PIX HE, Loccus biotecnologia.

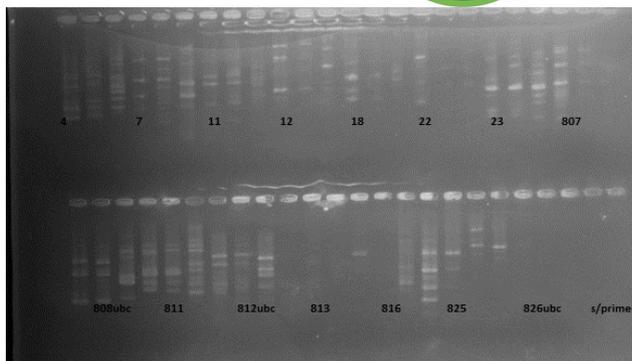
## Resultados e Discussão

O protocolo de Coelho-Bortolo et al.(2015) mostrou-se eficaz para a extração do DNA genômico. As concentrações de DNA das amostras variaram entre

7,7ng e 270,5ng. Para testar os 41 *primers* ISSR disponíveis em nosso laboratório foram utilizados quatro indivíduos. Deste total de *primers*, 27 foram selecionados quanto ao padrão polimórfico e a qualidade das bandas visualizadas em gel de agarose. A figura 1 mostra o padrão de amplificação de 15 *primers* amplificados em gel de agarose 1,7%. Os 27 marcadores ISSR selecionados produziram fragmentos que foram amplificados em duas temperaturas de anelamento diferentes. Como é possível observar na tabela 1, dos 27 *primers* polimórficos selecionados, 19 amplificaram à temperatura de anelamento de 50°C e seus fragmentos foram melhor separados e visualizados em gel de agarose 1,7% em 16 *primers* e em gel de agarose 1,5% no restante. Os demais *primers* amplificaram à 48 °C e seus fragmentos foram separados e visualizados em gel de agarose 1,7%.

**Tabela 1** O nome, a sequência dos *primers* selecionados, a temperatura de anelamento e a concentração do gel de agarose, estão representados na tabela 1.

<i>primer</i> –sequência	Temperatura de anelamento(°C)	Concentração do gel de agarose(%)
ISSR-4 (GACA) <sub>4</sub>	50	1,7
ISSR-7(AG) <sub>8</sub> GA	50	1,7
ISSR-11 (AC) <sub>8</sub> CA	50	1,7
ISSR-12 (AG) <sub>8</sub> GCT	50	1,7
ISSR-19 (AG) <sub>8</sub> TG	50	1,7
ISSR-23 (AG) <sub>8</sub> AT	50	1,7
ISSR-807 (AG) <sub>8</sub> T	50	1,7
ISSR-808UBC (AG) <sub>8</sub> C	50	1,7
ISSR-811 (GA) <sub>8</sub> C	50	1,7
ISSR-812UBC (GA) <sub>8</sub> A	50	1,7
ISSR-816 (CA) <sub>8</sub> T	50	1,7
ISSR-17898A (CA) <sub>6</sub> AC	50	1,7
ISSR- 17898B (CA) <sub>6</sub> GT	50	1,7
ISSR- HB-11 (GT) <sub>6</sub> CC	50	1,7
ISSR- HB-12 (CAC) <sub>3</sub> GC	50	1,7
ISSR- HB-15(GTG) <sub>3</sub> GC	50	1,7
ISSR-1 (AC) <sub>8</sub> TT	48	1,7
ISSR-2 (AC) <sub>8</sub> AG	48	1,7
ISSR-3 (AC) <sub>8</sub> TG	48	1,7
ISSR-5 (AC) <sub>8</sub> AA	48	1,7
ISSR-826UBC (AC) <sub>8</sub> C	48	1,7
ISSR-827UBC (AC) <sub>8</sub> G	48	1,7
ISSR-864UBC (ATG) <sub>5</sub>	48	1,7
ISSR-HB-10 (GA) <sub>6</sub> CC	48	1,7
ISSR--13 (AC) <sub>8</sub> CC	50	1,5
ISSR-14 (AC) <sub>8</sub> CT	50	1,5
ISSR-17 (AG) <sub>8</sub> CG	50	1,5



**Figura 1** – Padrão de amplificação de 15 *primers* amplificados em gel de agarose 1,7%

## Conclusões

A técnica de extração de DNA utilizada foi ideal para extrair material genômico íntegro e em boa quantidade para o sucesso da técnica de PCR que utilizou o marcador molecular ISSR. Os locos ISSR polimórficos selecionados apresentaram fragmentos de visíveis e poderão ser utilizadas para estudos de diversidade genética das quatro populações de *Sitophilus zeamais*, propostas nesse trabalho.

## Agradecimentos

Ao CNPq por conceder a bolsa de estudos

## Referências

COELHO-BORTOLO, T.; MANGOLIN, C.A.; LAPENTA, A.S. Genetic variability in the natural populations of *Lasioderma serricorne* (F.) (Coleoptera: Anobiidae), detected by RAPD markers and by esterase isozymes. **Bulletin of Entomological Research**. v. 106, n. 1, p. 47-53, 2015

DROSDOSKI, S. D. **Identificação e caracterização de esterases e análise da resistência à inseticidas em *Sitophilus zeamais* e *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae)**. 2015. 36 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2015.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A., BENREY, B., CALLEJAS, A., & OYAMA, K. Inter- and intraspecific genetic variation and differentiation in the sibling bean weevils *Zabrotes subfasciatus* and *Z. sylvestris* (Coleoptera: Bruchidae) from Mexico. **Bulletin of Entomological Research**, v. 92, n. 2, p.185-189, 2002.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, n. 2, p. 176-183, 1994.