

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ANÁLISE DO MARCADOR MOLECULAR ISSR EM *Tribolium castaneum* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

Laura Ivana Ramos (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Maria de Fátima Pires da Silva
Machado (Orientador), e-mail: mfpsmachado@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Biotecnologia,
Genética e Biologia Celular, Centro de Ciências Biológicas / Maringá, PR.

Área: 2.02.00.00-5 Genética / Subárea: 2.02.03.00-4 Genética Vegetal

Palavras-chave: Controle de insetos; Diversidade genética; Praga de grãos.

Resumo

O *Tribolium castaneum*, conhecido como caruncho, é considerado uma praga que infecta grãos e sementes, o que provoca perdas quantitativas e qualitativas na produção. Dessa maneira, o presente estudo tem como objetivos estabelecer a melhor técnica de extração de DNA para esta espécie, selecionar *primers* polimórficos e estabelecer as condições adequadas de amplificação e de separação do produto amplificado, para futuros estudos do polimorfismo de DNA, utilizando o marcador ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Para o desenvolvimento deste projeto, os carunchos que foram coletados nos estabelecimentos de Maringá, foram utilizados para a realização da extração de DNA. Posteriormente, os DNAs foram quantificados em Picodrop, amplificados em PCR e analisados em géis de agarose com concentração 1,7g. Os resultados obtidos com esse marcador permitirão o conhecimento sobre a estrutura genética das populações do *T. castaneum*, contribuindo, portanto, para o seu manejo e controle adequados.

Introdução

O *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), popularmente denominado de caruncho, é considerado uma praga de grãos e sementes que já foram danificados por outros animais, considerado assim, uma praga secundária. Ao consumir os produtos, este caruncho excreta compostos que proporciona o crescimento de fungos nos produtos infectados, o que causa uma perda quantitativa e qualitativa para os produtores e comerciantes (SMIDERLE, 2015).

No Brasil, cerca de 60 milhões de toneladas de grãos são perdidos anualmente devido ao ataque de pragas durante o armazenamento (CAMPOS, 2005). Uma das estratégias é o uso de inseticidas, principalmente da classe dos organofosforados que devido às aplicações por vários anos, tem contribuído para o desenvolvimento da resistência (ZETTLER & CUPERUS, 1990).

Desse modo, entender a estrutura genética das populações destes insetos praga é de grande importância, uma vez que o conhecimento da variabilidade genética, do polimorfismo, da dinâmica populacional e da similaridade entre as populações podem contribuir bastante no controle destes insetos (SMIDERLE, 2015).

Os estudos sobre variabilidade genética têm sido promissores utilizando os marcadores moleculares. Um dos marcadores bastante difundido para estudo genético de diferentes espécies é o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Este marcador foi criado pela necessidade de explorar repetições de microssatélites sem a utilização do sequenciamento do DNA, além de ser uma técnica simples, rápida e de baixo custo (BORNET & BRANCHARD, 2001).

Apesar de ser um marcador dominante, característica esta desvantajosa, visto que não identifica os fenótipos heterozigotos, o ISSR é considerado mais específico do que os outros marcadores dominantes, pois o *primer* pode ser ancorado na extremidade 5' ou 3', com 1 a 3 nucleotídeos adicionais à sequência repetitiva (BORNET & BRANCHARD, 2001).

Materiais e métodos

Obtenção do Material Biológico

Para iniciar o projeto, foi necessário buscar grãos e sementes infestadas com o coleóptero *Tribolium castaneum* nos estabelecimentos comerciais da cidade de Maringá. Os insetos foram mantidos vivos em frascos contendo farinha de trigo até serem usados para extração de DNA.

Extração do DNA Genômico

A técnica utilizada para a extração do DNA foi baseada no método utilizado por Coelho-Bortolo et al. (2015). Foram utilizados oito insetos adultos para extração do DNA genômico. Cada inseto foi individualmente macerado com 200 µL de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM, pH 8,0; EDTA 50 mM pH 8,0; NaCl 2 M, SDS 2%, metabissulfito de sódio 20 mM e proteinase K 100 µg/mL), e incubado em banho-maria por 30 minutos em 65°C. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio álcool-isoamílico (24:1) e as fases foram homogeneizadas. O material foi centrifugado por 10 minutos com 12.000 r.p.m. à temperatura ambiente. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo plástico, e novamente foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio álcool-isoamílico (24:1). O material foi centrifugado novamente por 10 minutos com 12.000 r.p.m. à temperatura ambiente e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo plástico. O DNA foi precipitado pela adição de 50 µL de isopropanol gelado e permaneceu em *overnight* a -20°C. O próximo passo foi à centrifugação por 10 minutos com 12.000 r.p.m. à temperatura ambiente. Em seguida, foi descartado o isopropanol e lavado o DNA precipitado com a adição de 200 µL de etanol 70% gelado, que foi seco em temperatura ambiente, ressuspensionado em TE 0,1 X (Tris-HCl 1 mM pH 8,0; EDTA 0,1 mM) e armazenado à -4°C.

Quantificação do DNA

A quantificação dos DNAs foi realizada utilizando o Picodrop, um equipamento que realiza a quantificação por espectrofotômetro.

Amplificação e análise dos ISSR (Inter Single Sequence Repeats)

Nessa etapa foram avaliados os 39 *primers* de ISSR que fazem parte do banco de *primers* de ISSR do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (DBC/UEM). A PCR foi preparada em microtubos de 0,2 mL, sendo utilizado para cada reação 3,0 µL de DNA diluído; 10,9 µL de água mili-Q; 2,0 µL de tampão; 2,4 µL de MgCl₂; 0,8 µL de dNTPs; 0,3 µL de *Taq-DNA Polimerase Platinum* (Invitrogen); e 0,6 µL do *primer* ISSR, totalizando um volume final de 20 µL de solução. A PCR será realizada no termociclador Techne TC-512, seguindo as temperaturas descritas na Tabela 1, com variação para a temperatura de anelamento de cada *primer*. Em cada produto de amplificação foi acrescentado 2µL de tampão *Loading* (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30%) e separados em gel de agarose com concentração 1,7g, 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 4 horas, e em seguida foram corados em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL por 40 minutos. A imagem foi capturada em transluminador L-PIX HE, Locus biotecnologia.

Tabela 1- Sequência das etapas do programa utilizado para amplificação do DNA com marcador ISSR.

Passo	Etapas	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	94°C	5 minutos
2	Desnaturação	94°C	1 minuto
3	Anelamento	48 a 52°C	1 minuto
4	Extensão	72° C	1 minuto e 30 segundos
5	Voltar ao passo 2 ao 4 por 34 vezes	-	-
6	Extensão final	72°C	7 minutos
7	Imersão	4°C	∞

Resultados e Discussão

Foram testados 39 *primers* ISSR com temperatura de anelamento de 52°C. Nessa temperatura, 23 *primers* anelaram de maneira satisfatória, representado a seguir: 11, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 807, 811, 816, 825, 17898A, 17898B, UBC808, UBC812, UBC827, UBC826, HB10, HB11, HB12 e HB15.

Os *primers* que não anelaram de forma correta na temperatura de 52°C, serão testados em temperaturas diferentes, para tornar possível as suas padronizações. A Tabela 2 contém os nomes dos *primers* que não anemaram e as temperaturas que serão testadas.

Tabela 2- Sequência de *primers* que não anelaram a 52°C e suas possíveis temperaturas de anelamento.

Temperatura	<i>Primers</i>
48°C	12, 16, 813, 822, 828 e 884b
50°C	8, 9, 10, 23 e 864
50°C e 52°C	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 13

Conclusões

Conclui-se que aproximadamente 60% dos *primers* testados anelaram de maneira satisfatória a 52°C. Os demais *primers* serão testados em temperatura de 48°C e 50°C para que se torne possível descobrir as temperaturas adequadas para os seus anelamentos.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida e ao laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal pela oportunidade de desenvolver este projeto.

Referências

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology**, v.19, p.209–215, 2001.

CAMPOS, T. B. Pragas dos grãos armazenados. In: **Reunião itinerante de fitossanidade do instituto biológico - pragas agroindustriais**. Ribeirão Preto: Anais, p.93, 2005.

COELHO, T. B.; LAPENTA, A. S.; MANGOLIN, C. A. 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, p. 47–53, 2016.

SMIDERLE, O. **Manejo integrado de pragas de grãos armazenados**. 1ª ed. Brasília: Embrapa, 2015.

ZETTLER, J. L. & CUPERUS, G. W. Pesticide resistance in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Rhizopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) in wheat. **Journal of Economic Entomology**, v. 83, p. 1677–1681, 1990.