

Teste de amplificação de microssatélite de DNA de *Anastrepha fraterculus*

MAYARA FERREIRA MENDES¹; MARIA VICTORIA SILVERA CALVO²; MONICA LANER BLAUTH³ FLÁVIO ROBERTO MELLO GARCIA⁴

¹Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia – mayaramendes1993@hotmail.com

²Universidad de la Republica del Uruguay- calvomariavictoria@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia/Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética. - monicablauth@uol.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia/Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética. – flavio.garcia@pq.cnpq.br

1. INTRODUÇÃO

A família Tephritidae inclui insetos de grande importância econômica pelos danos causados à fruticultura mundial, bem como os quatro gêneros *Bactrocera*, *Ceratitis*, *Anastrepha* e *Rhagoletis* (FLETCHER, 1989). Ao longo das décadas de 1930 a 2000, a espécie *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830), descrita como multivoltina pois apresenta, no mínimo seis gerações anuais o que possibilita sua presença durante todos os meses do ano (MACHADO et al., 1995; SALLES, 1995; GARCIA et al., 2003).

Adaptou-se a diversas frutas silvestres e cultivadas, dentre estas, destacam-se a ameixeira, macieira, pereira, goiabeira, pessegueiro (SALLES, 1995). A Argentina, Uruguai, nos Estados do sul e sudeste do Brasil são locais, onde se concentram as maiores perdas e onde se tem desenvolvido as medidas de controle (MALAVASI et al., 2000).

Os microssatélites tornaram-se populares na década de 90 onde foi possível detectar uma variabilidade genética no número de repetições da sequência-motivo (LITT; LUTY, 1989; WEBER; MAY, 1989). São sequências de desoxiribonucleotídeos do genoma repetidas em tandem de sequências de DNA, com no máximo seis bases, encontradas em todos os organismos estudados (ALBA et al., 1999; SANTOS, 2003).

A utilização de marcadores microssatélites é recomendada para estudos de diversidade genética, bem como para identificar prováveis locais de origem e auxiliar no estabelecimento de programas no controle de pragas (BONIZZONI et al., 2000; BONIZZONI et al., 2001; BALIRAINÉ et al., 2003).

Sete pares de *primers* desenhados para microssatélites de *Bactrocera olea* (Boms14, Boms31, Boms58 e Boms60) e *Anastrepha obliqua* (Anob-04, Anob-09 e Anob-17) descritos na literatura (AUGUSTINOS et al., 2008; ISLAM et al., 2011,

respectivamente) amplificaram DNA de *A. fraterculus*, apesar de não terem sido identificado a sequência de microssatélite nos trabalhos originais. O objetivo do estudo é descrever *primers* que possam ser usados na amplificação de microssatélites para o estudo das populações do Rio Grande do Sul e Uruguai nas diferentes culturas. O objetivo específico do presente trabalho é descrever a potencialidade do uso dos primers Boms 31 e Boms60 na amplificação de sequência de microssatélites de *Anastrepha fraterculus* da região sul da América do Sul.

2. METODOLOGIA

2.1 Extração de DNA

O DNA de uma fêmea de *A. fraterculus* proveniente de cultura do Uruguai foi extraída com o kit de extração NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel). O DNA foi tratado com RNase A na concentração de 0,5mg/ml e sua integridade foi observada em gel de agarose 0,8%, com amostra corada com GelRed (Biotium) e quantificado também em gel pela comparação com DNA lambda íntegro de 30, 50 e 100 ng.

2.2 Amplificação do DNA

Amostra de aproximadamente 30ng de DNA foi submetida a amplificação por PCR usando o par de *primers* Boms60 e Boms31 (AUGUSTINOS et al., 2008) em reação de 15ul com 1x de tampão da Taq DNA polimerase, 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 0,045pmol de cada primer e 1U de Taq DNA polimerase. As condições de amplificação foram de 94°C por 10min, 35 ciclos de 94°C por 1min, 52°C por 30s e 72°C por 30s, e extensão final de 72°C por 10min.

2.3 Observação do PCR e Purificação da amostra

Uma amostra de 2ul da reação de PCR foi observada em gel de agarose 0,8%, com amostra corada com GelRed (Biotium) e quantificado pela comparação com DNA lambda íntegro de 30, 50 e 100ng. Dez ul da amostra foi tratada com Exo-SAP-IT PCR Product Cleanup (USB) conforme especificações do fabricante.

2.4 Sequenciamento

O fragmento de PCR purificado foi encaminhado para sequenciamento usando o mesmo par de *primer* utilizado na amplificação, gerando duas sequências do mesmo amplificado. Os eletroferogramas foram montados no programa GAP4 (Staden, 1996) e identidade foi verificada no bando de dados de nucleotídeos BLAST.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os pares de *primers* Boms60 e Boms31 amplificam um fragmento visualizado em gel de agarose 0,8% entre 100 e 200pb.

O produto amplificado com o par de *primers* Boms60 não corresponde a um microssatélite e a nenhuma sequência gênica disponível na base de dados BLAST. O sequenciamento do produto de amplificação com o par de *primers* Boms31 precisará ser feito pois a sequência não teve boa resolução.

De uma forma geral, as PCRs realizadas com os *primers* descritos como positivos para *A. fraterculus* na literatura não tem se mostrado eficiente na amplificação das amostras do Rio Grande do Sul e Uruguai (dados não publicados) o que sugere uma grande variação das populações do região sul da América do Sul com as Europeias, como esperado. A sequência amplificada com os *primers* Boms60 e Boms31 confirmam este panorama já que geram fragmentos de tamanho diferente dos amplificados no trabalho de Augustinos et al. (2008), que foram fragmentos maiores, entre 500 e 400 pb.

O objetivo do projeto é estabelecer *primers* que possam amplificar microssatélites, sendo este passo de sequenciamento crucial para a identidade das sequências. Como perspectiva, uma nova amplificação com o par de *primers* Boms31 será realizado e a amostra será corrida em gel de agarose 1%, em gel mais longo, para melhor separação dos fragmentos de DNA, eliminando assim a existência de mais bandas de amplificação que possam estar interferindo no sequenciamento. Se a existência de mais bandas for confirmada, a PCR será realizada com temperatura de anelamento e/ou concentração de MgCl₂ mais baixa, aumentando a especificidade da reação.

4. CONCLUSÕES

Como os *primers* selecionados foram positivos para *A. fraterculus* obtidas de outras regiões, sugere-se que há uma variabilidade populacional, sendo o ideal a construção de *primers* para microssatélite obtidos de população local.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBA, M.M; SANTIBÁÑEZ-KOREF; HANCOCK, J.M. Conservation of polyglutamine tract size between mice and humans depends on codon interruption. **Molecular Biology and Evolution**, v.16, n.11, p.1641–1644. 1999.
- AUGUSTINOS, A.A. et al. Isolation and characterization of microsatellite markers from the olive fly, *Bactrocera oleae*, and their cross-species amplification in the Tephritidae family. **BioMed Central Genomics**. v.9, n. 618, p. 1-14, 2008.
- BALIRAINÉ, F.N; et al. Comparative analysis of microsatellite loci in four fruit fly species of the genus *Ceratitis* (Diptera: Tephritidae). **Bull Entomology Res.** v.93 p.1–10, 2003.
- BONIZZONI, M. et al. Microsatellite polymorphism in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. **Insect Molecular Biology**. v.9, n.3, p.251-261, 2000.
- BONIZZONI, et al. Microsatellite analysis of medfly bioinfestations in California. **Molecular Ecology**, v.10, p.2515–2524, 2001.
- GARCIA, F.R.M.; CAMPOS, L.V.; CORSEUIL, E. Flutuação populacional de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera, Tephritidae) na Região Oeste de Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**. v.47, n.3, p.415-420, 2003.
- ISLAM, Md. S.; ARCE, R.R. Microsatellite markers for the west Indian fruit fly (*Anastrepha obliqua*) and cross species amplification in related pest species. **Conservation Genet Resour.** n.3, p.549-551, 2011.
- FLETCHER, B.S. Life history strategies of tephritid fruit flies. In **Fruit flies, their biology, natural enemies and control**, Edited by: Robinson AS, Hooper G. Amsterdam: **Elsevier Science Publishers**, v.3B, p.195-208, 1989.
- LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American journal of human genetics**, v.44, n.3, p.397-401, 1989.
- MACHADO, A. E.; L. A. B. SALLES & A. E. LOECK. Exigências térmicas de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) e estimativa do número de gerações anuais em Pelotas, RS. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v.24, n.3, p.573-578, 1995.
- MALAVASI, A.; R. A. ZUCCHI & R. L. SUGAYAMA. Biogeografia, p. 93-98. In: **A. MALAVASI & R. A. ZUCCHI (edit.). Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto, Holos Editora, p. 327, 2000.
- SANTOS, M.L.B. **Isolamento e caracterização de microssatélites do genoma de *Echinococcus granulosus* (Cestoda, Taeniidae)**. 2003. 85f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- SALLES, L. A. B. Bioecologia e controle da mosca-das-frutas sul-americana. Pelotas, **EMBRAPA - CPACT**, v.58 p.58, 1995.
- STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnol.** v.5, p.233-241, 1996.
- WEBER, J.L.; MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of human genetics**, v.44, n.3, p.388-396, 1989.