

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Plutella*
xylostella (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) UTILIZANDO
MARCADORES MOLECULARES RAPD**

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Helio Tollini
Marcelo Barbosa Saintive
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor Presidente

José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Deane de Abreu Sá
Diretores Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 89

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Plutella
xylostella* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) UTILIZANDO
MARCADORES MOLECULARES RAPD**

**E. S. Martins
P. R. Queiroz
L. H. C. Lima
R.G. Monnerat**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3348-4739 Fax: (61)

3340-3666 <http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2005):

M 379 Martins, E. S.

Análise da variabilidade genética de *Plutella xylostella* (Lepidóptera: Noctuidade) utilizando marcadores moleculares RAPD / E. S. Martins, P. R. Queiroz, L. H. C. Lima e R. G. Monnerat. – Brasília, DF : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

16 p.: il. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 89)

1. *Plutella xylostella* (Lepidóptera: noctuidae) – variabilidade genética.
2. *Plutella xylostella* (Lepidóptera: noctuidae) – marcadores moleculares RAPD. I. Queiroz, P. R. II. Lima, L. H. C. III. Monnerat, R. G. IV. Série.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUÇÃO	8
MATERIAL E MÉTODOS.....	8
MÉTODOS	9
REAÇÕES DE RAPD-PCR.....	9
OBTENÇÃO DE PERFIS ELETROFORÉTICOS.....	10
ANÁLISE DOS DADOS	10
RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	10
CONCLUSÃO	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	15

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Plutella xylostella* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES RAPD

E. S. Martins¹

P. R. Queiroz²

L. H. C. Lima³

R. G. Monnerat⁴

RESUMO

Neste trabalho indivíduos de uma mesma população de *P. xylostella* foram caracterizados geneticamente por meio de RAPD-PCR. Para isso, foi utilizada uma metodologia já estabelecida para a extração de DNA a partir de lepidópteros e selecionados primers OPA-03, OPA-04, OPA-10, OPA-11 e OPA-13. Foi encontrada alta variabilidade genética, apontada por um coeficiente de similaridade que variou de 35 a 90%.

Palavras-chave: *Plutella xylostella*, Insecta, RAPD, Caracterização molecular.

¹ Bióloga – MSc. Patologia Molecular – Universidade de Brasília – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Biólogo – Doutorando em Biologia Animal – Universidade de Brasília – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Bióloga – PhD - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁴ Bióloga – PhD - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

ABSTRACT

In this work, insects of the same *P. xylostella* population were genetically characterized through RAPD-PCR. For this purpose a well established DNA extraction method from lepidoptera was tested with the selected primers OPA-03, OPA-04, OPA-10, OPA-11 and OPA-13. A coefficient of genetic similarity between 35 to 90% showed a high degree of genetic variability in this population.

INTRODUÇÃO

Um aspecto importante no controle de pragas é o conhecimento de suas características genotípicas. Este conhecimento pode auxiliar no estabelecimento do perfil genético dos insetos e na identificação de marcadores que apontem para populações resistentes a inseticidas ou potencialmente transmissoras de doenças. A técnica de RAPD (WILLIAMS et al., 1990) é muito utilizada na obtenção de informações na análise genômica por possuir características distintas como a utilização de um único primer de seqüência arbitrária capaz de reconhecer seqüências desconhecidas do material genético alvo, fornecendo marcadores moleculares úteis para a análise genética e para o desenvolvimento de novos métodos de análise genômica. Os marcadores RAPD são baseados na amplificação do DNA gerando simplicidade e rapidez a baixos custos. Assim, grande quantidade de polimorfismo e segmentos de DNA são obtidos em curto espaço de tempo a partir da amplificação utilizando-se a enzima termoestável *Taq* DNA polimerase (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Uma característica deste tipo de marcador é o seu comportamento como marcador genético dominante (CIAMPI e MAGALHÃES, 2001). O presente trabalho tem como objetivos estabelecer uma metodologia simplificada de extração de DNA, como também, determinar a variabilidade genética entre indivíduos de uma população de *P. xylostella* por meio de marcadores moleculares RAPD.

MATERIAL E MÉTODOS

Os indivíduos de *P. xylostella* de terceiro ínstar foram coletados aleatoriamente de uma colônia mantida no laboratório de criação de insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e mantidos em etanol 100 % a – 20 °C.

MÉTODOS

Para os estudos de caracterização molecular, o DNA de 20 indivíduos de terceiro ínstar de *P. xylostella* foram extraídos a partir de um protocolo previamente estabelecido (QUEIROZ et al., 2004) a partir de adaptações dos protocolos de Agusti et al. (1999) e Monnerat et al. (2004), onde submeteu-se um inseto inteiro à

maceração e, a seguir, adicionou-se 500 μL de tampão de extração (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,3 % e Proteinase K 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), incubando-se por 30 min a 65 $^{\circ}\text{C}$. O homogenato foi centrifugado por 10 min a 10.000xg e, o sobrenadante, transferido para um tubo plástico. Adicionou-se 500 μL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e as fases foram homogeneizadas em vortex por 5 s. O material foi centrifugado por 10 min a 10.000xg e a 10 $^{\circ}\text{C}$. A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo plástico, repetindo-se a etapa anteriormente descrita. O DNA foi precipitado pela adição de 30 μL de NaCl 5 M e 1 mL de etanol absoluto incubando-se por 2 h a – 20 $^{\circ}\text{C}$. Após centrifugação a 10.000xg por 10 min a 10 $^{\circ}\text{C}$, o DNA precipitado foi lavado duas vezes com 500 μL de etanol 70 %, seco à temperatura ambiente e ressuspensão em TE 0,1 X (Tris-HCl 1 mM pH 8, EDTA 0,1 mM) e armazenado a – 20 $^{\circ}\text{C}$. Para as análises de RAPD, utilizou-se o DNA diluído 10 X em TE 0,1 X.

REAÇÕES DE RAPD-PCR

Para os estudos de caracterização molecular, O DNA extraído de cada indivíduo da população foi utilizado em 30 μL de uma reação de RAPD-PCR, contendo tampão Tris-HCl 6 mM (pH 8,8), KCl 50 mM, MgCl_2 2 mM, dNTP's 0,2 mM, 0,4 μM de um primer de seqüência aleatória da Operon Technologies, Inc.(Tab. 1), 2,5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de *Taq* DNA polimerase (Pharmacia) e 5 μL de DNA.

Tabela 1 – Primers usados nas reações de RAPD-PCR.

Primer	Seqüência (5' → 3')
OPA-03	AGT CAG CCA C
OPA-04	AAT CGG GCT G
OPA-10	GTG ATC GCA G
OPA-11	CAA TCG CCG T
OPA-13	CAG CAC CCA C

OBTENÇÃO DE PERFIS ELETROFORÉTICOS

As ampliações foram efetuadas em termociclador (PTC 100 MJ Research) programado para 45 ciclos, contendo uma etapa inicial de desnaturação de 3 min a 94 °C. Cada ciclo foi constituído de uma etapa de desnaturação de 1 min a 93 °C, anelamento por 1 min a 35 °C e extensão por 2 min a 72 °C. Após os ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de 5 min a 72 °C. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5% submerso em tampão TBE 1X (Tris-borato 9 mM e EDTA 1 mM), fotografados e arquivados no sistema Eagle Eye. Em todos os géis, marcadores de massa molecular (Ladder 100 bp - GIBCO) foram usados para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados.

ANÁLISE DOS DADOS

As fotos das ampliações realizadas com os primers selecionados foram usadas para a análise do polimorfismo entre os indivíduos da população. As bandas presentes nos géis foram consideradas como marcadores RAPD. Foi gerada então uma matriz de similaridade levando-se em consideração as relações entre indivíduos, primers e massas moleculares das bandas obtidas com um dado primer. Utilizou-se o valor 1 para a presença de um marcador e 0 para a ausência. No caso de dúvida o número 9 foi usado como padrão. A seguir, a planilha obtida foi submetida a um programa de análise estatística multivariada para a determinação das distâncias genéticas entre os indivíduos. A matriz de similaridade foi obtida por meio do coeficiente de Jaccard, após, o que, através da análise por UPGMA produziu-se um dendograma que evidenciou o agrupamento dos indivíduos, utilizando-se o programa NTSYS versão 2.02 pc (RHOLF, 1993).

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Utilizando-se a metodologia de extração de DNA estabelecida inicialmente para *S. frugiperda*, foi possível obter perfis eletroforéticos para *P. xylostella* nas reações de RAPD utilizando-se os cinco primers. A fixação das células em etanol, seguida da conservação em baixa temperatura, permitiu a extração de DNA em

quantidade e em qualidade para as reações de amplificação por RAPD, produzindo diferentes perfis eletroforéticos entre os indivíduos analisados (Figura 1).

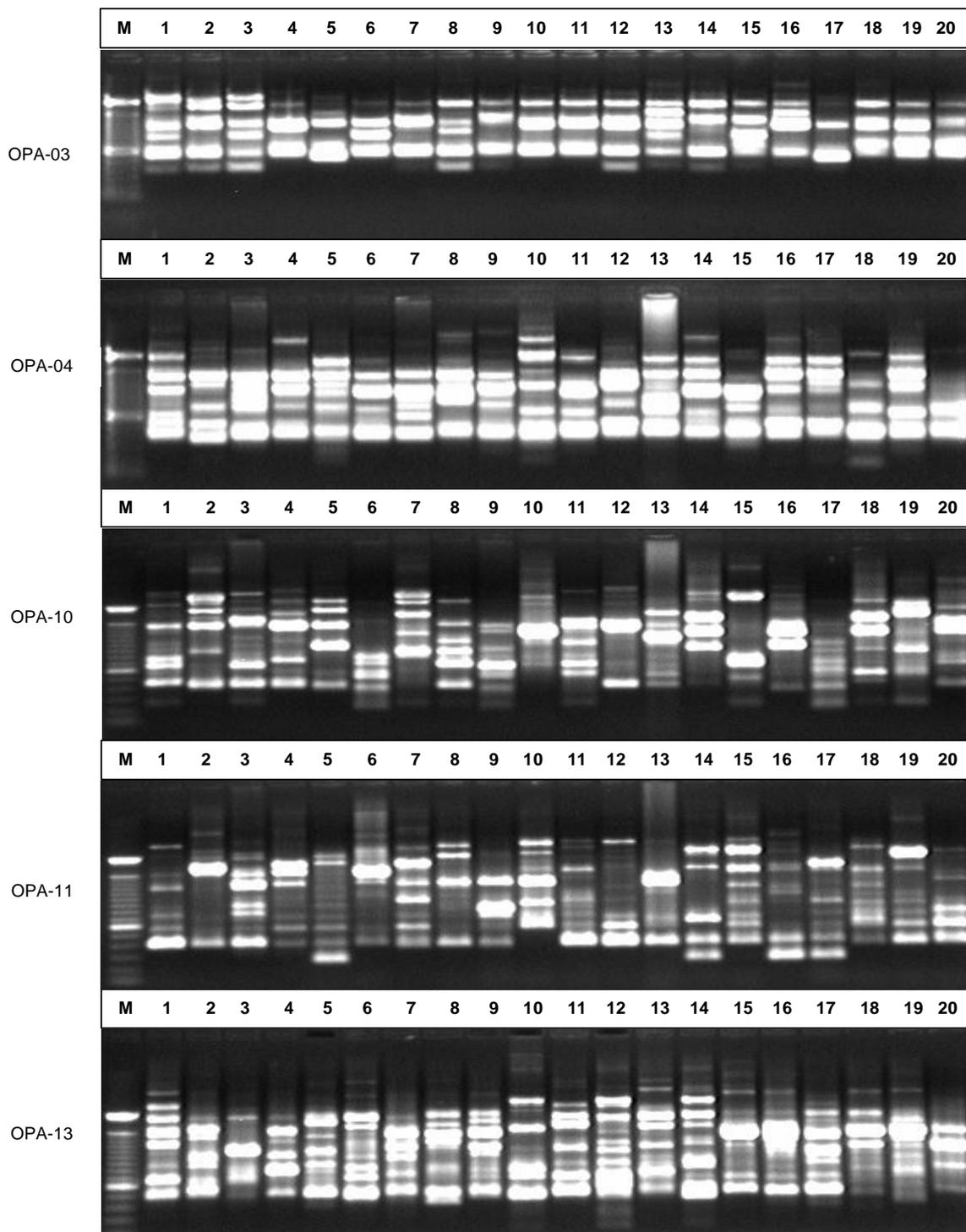


Figura 1 – Perfis eletroforéticos de vinte indivíduos de *P. xylostella* produzido por cinco primers de RAPD. A letra M representa o marcador 100 pb ladder. Os números de 1 a 20 representam os indivíduos analisados nas reações de amplificação.

Com o emprego do primer OPA-03 observou-se variação de 2 a 6 bandas entre os indivíduos constituintes da população. Esse primer produziu uma banda de 800 pb presente na maioria das amostras testadas. Apenas o indivíduo 17 apresentou uma banda com massa molecular inferior a 800 pb. Utilizando-se o primer OPA-04 nas reações de RAPD produziu-se um fragmento de 600 pb monomórfico. Para o primer OPA-11 obteve-se também uma banda de 400 pb monomórfica para essa população. Dessa forma, o uso dos primers OPA-03, OPA-04 e OPA-11 produziram bandas candidatas para o desenvolvimento de marcadores específicos para a detecção dessa espécie em campo. Contudo, com os primers OPA-10 e OPA-13 não se observou padrão de bandas monomórficas dentro da população. Essa variação no perfil eletroforético revela a variabilidade presente nessa espécie mesmo utilizando-se um número reduzido de primers.

Os dados binários produzidos por cada organismo quando da utilização dos cinco primers de seqüência aleatória foram então utilizados para a determinação da matriz de distância pelo programa NTSYS (Tabela 1).

Tabela 1 - Matriz de distância genética produzida por 20 indivíduos de uma população de *P. xylostella*.

	px1	px2	px3	px4	px5	px6	px7	px8	px9	px10	px11	px12	px13	px14	px15	px16	px17	px18	px19	px20
px1	0.00																			
px2	0.35	0.00																		
px3	0.41	0.41	0.00																	
px4	0.35	0.31	0.37	0.00																
px5	0.49	0.45	0.43	0.41	0.00															
px6	0.40	0.42	0.34	0.32	0.54	0.00														
px7	0.39	0.31	0.33	0.27	0.49	0.36	0.00													
px8	0.28	0.34	0.26	0.28	0.42	0.44	0.40	0.00												
px9	0.55	0.47	0.37	0.39	0.57	0.36	0.20	0.44	0.00											
px10	0.42	0.46	0.36	0.34	0.36	0.31	0.30	0.35	0.30	0.00										
px11	0.41	0.41	0.43	0.37	0.31	0.34	0.45	0.42	0.49	0.24	0.00									
px12	0.22	0.25	0.31	0.29	0.35	0.38	0.29	0.30	0.41	0.32	0.27	0.00								
px13	0.41	0.37	0.31	0.37	0.43	0.28	0.33	0.44	0.37	0.28	0.31	0.31	0.00							
px14	0.47	0.39	0.49	0.47	0.45	0.46	0.39	0.54	0.51	0.42	0.41	0.37	0.49	0.00						
px15	0.51	0.35	0.45	0.39	0.41	0.52	0.39	0.48	0.43	0.38	0.37	0.41	0.45	0.47	0.00					
px16	0.47	0.35	0.53	0.43	0.41	0.34	0.43	0.46	0.51	0.30	0.41	0.45	0.37	0.31	0.47	0.00				
px17	0.45	0.41	0.55	0.41	0.35	0.34	0.45	0.50	0.49	0.44	0.47	0.51	0.51	0.45	0.53	0.33	0.00			
px18	0.47	0.35	0.49	0.39	0.37	0.50	0.39	0.46	0.43	0.30	0.37	0.41	0.45	0.39	0.27	0.35	0.45	0.00		
px19	0.35	0.43	0.45	0.35	0.41	0.44	0.24	0.44	0.35	0.22	0.33	0.37	0.37	0.39	0.35	0.39	0.41	0.27	0.00	
px20	0.37	0.45	0.43	0.33	0.39	0.46	0.37	0.30	0.41	0.28	0.39	0.35	0.47	0.53	0.37	0.45	0.51	0.37	0.33	0.00

Pela determinação da matriz de similaridade, foi possível observar que a distância genética entre os indivíduos analisados variou de 20 % a 57 %. Essa informação sugere uma elevada variabilidade genética dentro do grupo em estudo.

Após a análise do perfil eletroforético, foram gerados dados binários correspondentes aos vários indivíduos da população de *A. gemmatalis* em estudo para a determinação de um dendrograma para o estabelecimento das similaridades filogenéticas (Figura 2).

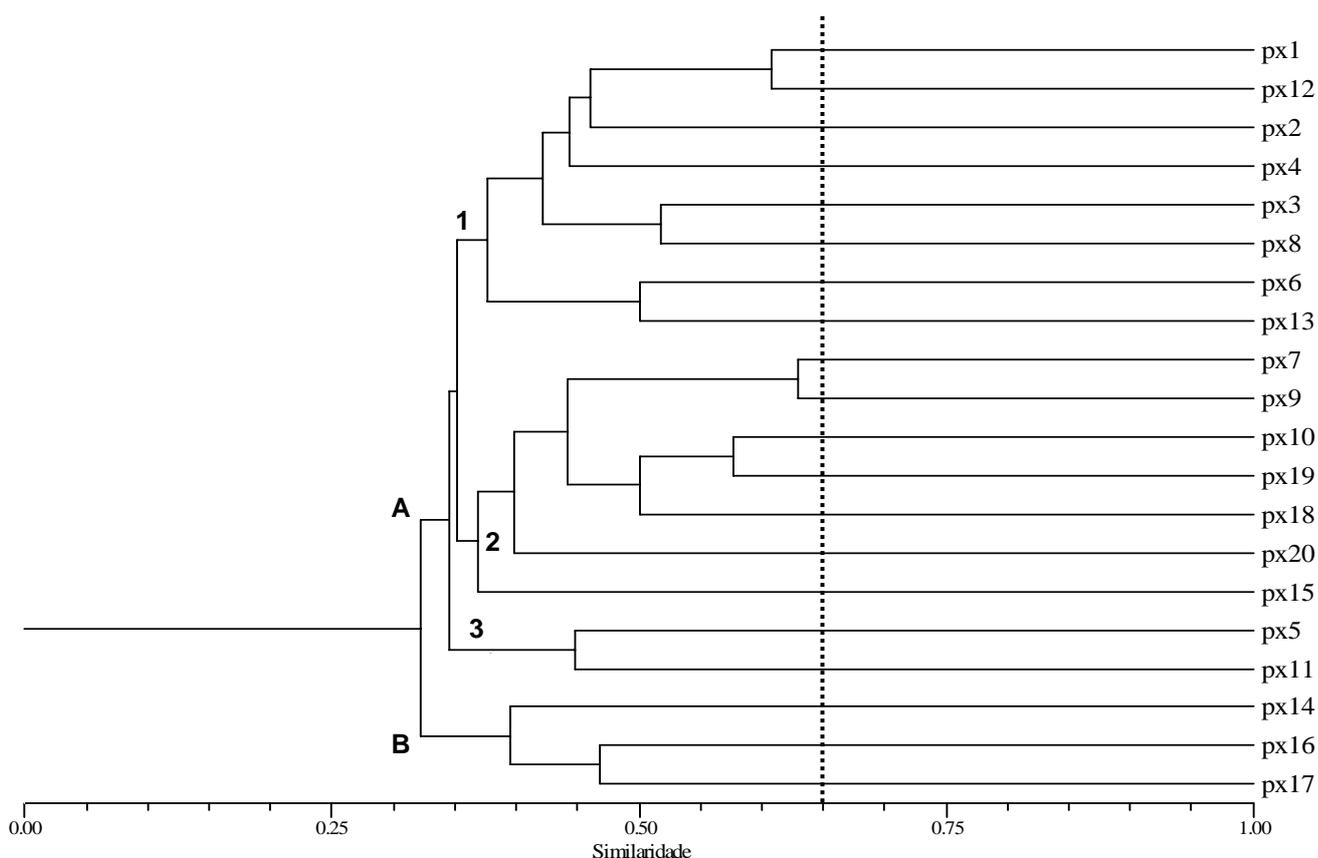


Figura 2 – Dendrograma construído a partir de dados obtidos de RAPD de uma população de 20 indivíduos de *P. xylostella* mantida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As letras indicam a formação das divisões principais dentro da população e os números indicam o número de sub-divisões. A linha pontilhada indica o limite máximo de similaridade do grupo.

A análise pelo programa NTSYS-pc utilizando-se os primers de RAPD permitiu observar um elevado grau de variabilidade genética entre os indivíduos constituintes da população que foi expressa em um índice de similaridade genética inferior a 65 %. Pelos dados gerados pelos marcadores de DNA, observou-se a

formação de dois grupos. O grupo **B** apresentou 33 % de similaridade em relação ao grupo **A**, sendo constituído pelos indivíduos 14, 16 e 17 da população em estudo. O grupo **A** apresentou 3 sub-divisões. A primeira sub-divisão apresentou 37 % e 34 % de similaridade em relação às sub-divisões **2** e **3**, respectivamente e sendo composta por 8 indivíduos da população. A segunda sub-divisão ficou constituída por 7 indivíduos. A terceira sub-divisão, por sua vez, ficou constituída pelos indivíduos 5 e 11. Em virtude de seu amplo espectro de uso, a técnica de RAPD tem sido aplicada em diferentes níveis de estudo na caracterização molecular tanto de populações de insetos-praga quanto das possíveis espécies relacionadas. Monnerat et al. (2004), por exemplo, demonstraram que não havia variabilidade genética intra-populacional em três espécies de *Diadegma* (Himenoptera: Ichneumonidae), um importante parasitóide de larvas das traças das crucíferas *Plutella xylostella*.

Além disso, a partir dos marcadores moleculares gerados por RAPD foi possível o desenvolvimento de primers específicos para as espécies de lepidópteras. Essa estratégia foi aplicada por Agusti et al. (1999) que desenvolveram primers específicos para a detecção de *H. armigera* no intestino de possíveis predadores dessa espécie. Usando a técnica de RAPD gerou-se um fragmento de 1200 pb - presente apenas em *H. armigera* e ausente no predador *Dicyphus tamaninii* - que foi então usado para a obtenção de um par de primers específico para essa região em *H. armigera*. Com essa estratégia foi possível detectar o inseto no intestino do respectivo predador. Dessa forma, os marcadores moleculares obtidos por RAPD mostram-se úteis para o desenvolvimento de várias estratégias para o estudo da dinâmica das populações de lepidópteras, assim como, para a caracterização de potenciais agentes de biocontrole.

Contudo, o sucesso na obtenção de marcadores moleculares por RAPD é dependente da qualidade do DNA obtido a partir dos tecidos do inseto. A técnica de extração utilizada nesse trabalho, forneceu DNA com qualidade para analisar a variabilidade genética de uma população de *P. xylostella* utilizando-se cinco primers de RAPD, como também, permitindo analisar os marcadores moleculares em estágios iniciais do desenvolvimento desse inseto.

Uma futura aplicação poderá ser o desenvolvimento de um banco de marcadores moleculares de RAPD representativo de locais de ocorrência e culturas diferentes visando o monitoramento dessa espécie em campo.

CONCLUSÃO

O protocolo de extração modificado para uso nesse trabalho produziu DNA em quantidade e em qualidade para as reações de amplificação de RAPD usando um número reduzido de primers. Esses primers produziram perfis eletroforéticos para a caracterização e a análise da variabilidade genética dos indivíduos de uma população de *P. xylostella*, fornecendo bandas de DNA com potencial de uso para o desenvolvimento de marcadores específicos para a identificação dessa espécie de lepidóptera em campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUSTI, N.; DE VICENTE, M. C.; GABARRA, R. Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction-based technique for predator gut analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, p. 1467-1474, 1999.

CARVALHO, R. P. L. **Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho, em condições de campo.** 1970. 170p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo.

CIAMPI, A. Y.; MAGALHÃES, M. T. Q. **Análise da variabilidade genética de três espécies arbóreas utilizando marcador molecular RAPD.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 8 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 60)

CRUZ, I.; TURPIN, F. T. Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estágios de crescimento da cultura de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 355-359, 1982.

CRUZ, I.; VALICENTE, F. H.; SANTOS, F. H. dos; WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A. **Manual de Identificação de Pragas da Cultura do Milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 1997. 71p.

CRUZ, I., VIANNA, P. A.; WAQUIL, J. M. **Manejo das pragas iniciais de milho mediante o tratamento de sementes com inseticidas sistêmicos**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 1999. 39p. (EMBRAPA/CNPMS. Circular Técnica, 31).

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 20)

MEREGE, W. H. **Milho (*Zea mays* L.)**. Disponível em: < <http://www.agrobyte.com.br/milho.htm> >. Acesso em: 4 maio, 2001.

MONNERAT, R. G.; LEAL-BERTIOLI, S.; BERTIOLI, D.; BUTT, T.; BORDAT, D. Variabilidade Genética do Parasitóide *Diadegma* sp. através de RAPD-PCR. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 90-92, 2004.

MONTESBRAVO, E. P. **Control biológico de *Spodoptera frugiperda* Smith em maiz**. Disponível em: < <http://codagea.edoags.gov.mx/~produce/SPODOPTTE.htm> >. Acesso em: 26 abr., 2001.

QUEIROZ, P. R.; MARTINS, E. S.; MONNERAT, R. G.; LIMA, L. H. C. **Análise da variabilidade genética de uma população de *Spodoptera frugiperda* (j.e. smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) por meio de marcadores moleculares RAPD**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 18 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 75).

RHOLF, F. J. **NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate System**. Version 2.9. New York: Applied Biostatistics, 1993.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V.
DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.
Nucleic Acids Research, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.