

Evaluación cualitativa de la degradación de ADN en insectos plaga expuestos a radiación gamma

Yuriko Ortega¹, Johnny Vargas², Mónica Vivanco², Norberta Martínez³, Juan Agapito^{1,*}

¹ Laboratorio de Biología Molecular. Instituto Peruano de Energía Nuclear. Av. Canadá 1470, Lima. Perú.

² Laboratorio de Irradiación. Instituto Peruano de Energía Nuclear. Av. Canadá 1470, Lima. Perú.

³ Laboratorio de Entomología, Departamento de Zoología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Mayor de San Marcos.

Resumen

Los insectos producen grandes pérdidas en los granos almacenados, dependiendo del tipo de cereal y tiempo de almacenamiento, entre otros factores. El gorgojo del arroz *Sitophilus oryzae* L y el gorgojo falso de la harina *Tribolium confusum* son plagas importantes de los granos almacenados. El objetivo del estudio fue evaluar cualitativamente el efecto de la radiación gamma en el ADN de dos especies de insectos plaga a partir de muestras almacenadas de maíz chullpi y blanco infestados con gorgojos adultos. Las muestras fueron tratadas con dosis de radiación de 100, 400, 1000 y 2000 Gy y la extracción de ADN fue obtenida por tres métodos: TNES-urea, CTAB y NaOH. El daño en el ADN inducido por la radiación gamma en los gorgojos fue determinada mediante geles de electroforesis. Como resultado se encontró que la exposición de gorgojos adultos a una dosis de radiación de 100 y 400 Gy causó una mortalidad media de estos insectos, evidenciando cierto grado de resistencia a las radiaciones gamma. Sin embargo, las dosis de radiación de 1000 y 2000 Gy causó la mortalidad del 100 % de los insectos. Los resultados preliminares muestran que el daño en el ADN es proporcional a la cantidad de radiación gamma.

Palabras claves: *Sitophilus oryzae*, *Tribolium confusum*, ADN, radiación gamma

Qualitative evaluation of the DNA degradation in plague insects exposed to gamma radiation

Abstract

Insects produce large losses in stored grain depending on the type of cereal and storage time and other factors. The rice weevil *Sitophilus oryzae* L and the false flour beetle *Tribolium confusum* are important pests of stored grain. The study aimed to qualitatively evaluate the effect of gamma radiation on the DNA of two species of insect pests from samples stored Chullpi and white corn infested with adult weevils. Samples were treated with radiation doses of 100, 400, 1000 and 2000 Gy and DNA extraction was obtained by three methods: TNES-urea, CTAB and NaOH. The DNA damage induced by gamma radiation in weevils was determined by gel electrophoresis. As a result, it was found that exposure of adult weevils to a radiation dose of 100 Gy and 400 caused an average mortality of the insects, showing a degree of resistance to gamma radiation. However, radiation doses of 1000 and 2000 Gy caused 100 % mortality of insects. Preliminary results show that DNA damage is proportional to the amount of gamma radiation.

Key words: *Sitophilus oryzae*, *Tribolium confusum*, ADN, gamma radiation

1. Introducción

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los productos agrícolas más importantes del mundo. En el Perú se conocen 56 variedades locales [1] distribuidas principalmente en la sierra [2]. A nivel nacional el maíz es el cultivo de mayor área sembrada, siendo el más importante el maíz amarillo duro, para alimento en la avicultura y porcicultura. La producción nacional de maíz satisface solo la

mitad de su demanda por lo que es necesario importarlo de Argentina en un 80 % y el resto de Estados Unidos y otros países. Para satisfacer la necesidad de una población creciente, se debe aumentar la producción, lo cual ocasiona problemas de almacenamiento.

Actualmente, uno de los problemas observados en estos productos son las plagas

* Correspondencia autor: jagapito@ipen.gob.pe

de insectos que contaminan los alimentos almacenados y procesados, ocasionando grandes pérdidas a agricultores y comerciantes. Dentro de estas plagas el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* es el más serio del grano almacenado y en menor proporción *Tribolium confusum* [3,4,5].

Mundialmente el *S. zeamais* es considerado una de las principales plagas de maíz almacenado, pudiendo ocasionar pérdidas del orden de 20-25 %. [6]. Además, se estima que entre un 5 al 10 % de cereales se pierde durante el almacenamiento como resultado de la infestación por insectos [7].

Este problema también se ha tratado de resolver mediante el control químico, el cual resulta desventajoso porque genera incremento en los costos, contaminación del producto y deterioro del ambiente [8]. Como se ha comprobado en trabajos realizados recientemente, las radiaciones ionizantes constituyen un medio muy prometedor en la lucha contra los insectos, pudiendo servir de complemento a los insecticidas químicos actualmente en uso. Las radiaciones ofrecen no solamente un método para eliminar completamente la infestación, sino que pueden asegurar una protección parcial contra una nueva infestación al quedar estériles los

insectos. Otra razón más para aumentar el interés por la radiodesinfestación de granos, lo constituye la preocupación cada vez mayor por los peligros para la salud de la toxicidad residual de los insecticidas químicos [9,10,11,12].

Una alternativa para mejorar la vida útil de los alimentos almacenados es la eliminación de los microorganismos nocivos, mohos e insectos, mediante la tecnología de radiación [10]. La energía de irradiación se trasfiere al agua corporal de estos organismos, causando radicales libres que dañan su material genético y por ende su muerte. Sin embargo, existen organismos con sistemas de reparación de ADN muy eficiente que soportan grandes rangos de estrés abiótico con alto potencial biotecnológico de importancia científica. En ese sentido, el estudio evaluó tres distintos protocolos de extracción de ADN con el objeto de determinar cualitativamente los efectos que pueden causar las radiaciones ionizantes en gorgojos del maíz chulpi *Tribolium confusum* y del maíz blanco *Sitophilus oryzae*, de gran importancia económica como plaga de granos almacenados y determinar a partir de cuál de los protocolos se obtiene un ADN de mejor calidad.



Figura 1: a) Maíz blanco, b) Maíz chulpi infestados con gorgojos, c) Revisión del material infestado, d y e) Extracción de las muestras biológicas.

2. Experimental

2.1. Toma de muestras biológicas

Se analizaron muestras de maíz chullpi y maíz blanco infestados por plagas de gorgojos cuyas características reflejaron daño directo en las muestras. Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Irradiación del Instituto Peruano de Energía Nuclear y las plagas fueron separadas en placas petri para

su posterior identificación taxonómica (Figura 1).

2.2. Identificación taxonómica

La identificación taxonómica se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Entomología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con ayuda de claves taxonómicas especializadas [13] y de un estereoscopio (Figura 2).

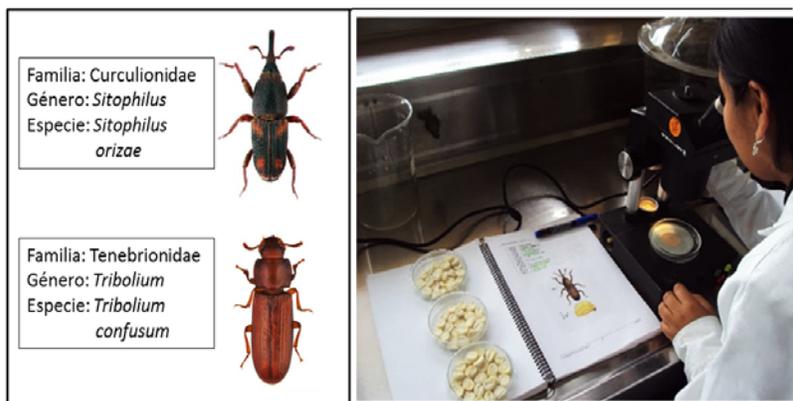


Figura 2. Identificación taxonómica de las muestras biológicas.

2.3. Determinación de la dosimetría física

La tasa de dosis absorbida mínima (14/02/14) fue de 74,16 Gy/min y en base a la dosis se establecieron los tiempos de irradiación para el experimento, considerando los parámetros de la Dosimetría estándar de referencia Fricke [14] (Tabla 1). Todas las placas fueron irradiadas a las dosis indicadas, excepto los controles de muestra (Figura 4).

Tabla 1. Dosis de radiación vs. Tiempo de irradiación.

<i>Dosis de radiación (Gy)</i>	<i>Tiempo de irradiación (minutos)</i>
100	1.35
400	5.40
1000	13.50
2000	27.00

2.4. Extracción de ADN

Se evaluaron tres métodos de extracción de ADN:

2.4.1. Protocolo 1: Extracción de ADN con buffer TNES-urea

Se seleccionó 1 gorgojo de un individuo el cual fue lavado con agua destilada estéril y secado a temperatura ambiente, para luego ser transferido a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL conteniendo 200 μ l de TNES-urea (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 125 mM NaCl; 10 mM EDTA pH 8.0; 0.5 %SDS; 4M urea). La muestra fue triturada con un micromartinete estéril y se agregó 10 μ l de Proteinasa K (20 mg/mL) para ser incubado a temperatura de 56°C por toda la noche. Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante fue transferido a otro tubo de microcentrifuga de 1.5 mL conteniendo 500 μ l acetato de sodio 3M y 450 μ L de isopropanol a 4 °C. La muestra fue centrifugada a 14000 rpm por 30 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet de ADN fue lavado con etanol frío al 70 %. Finalmente, el ADN fue resuspendido en 50 μ l de TE 1X.

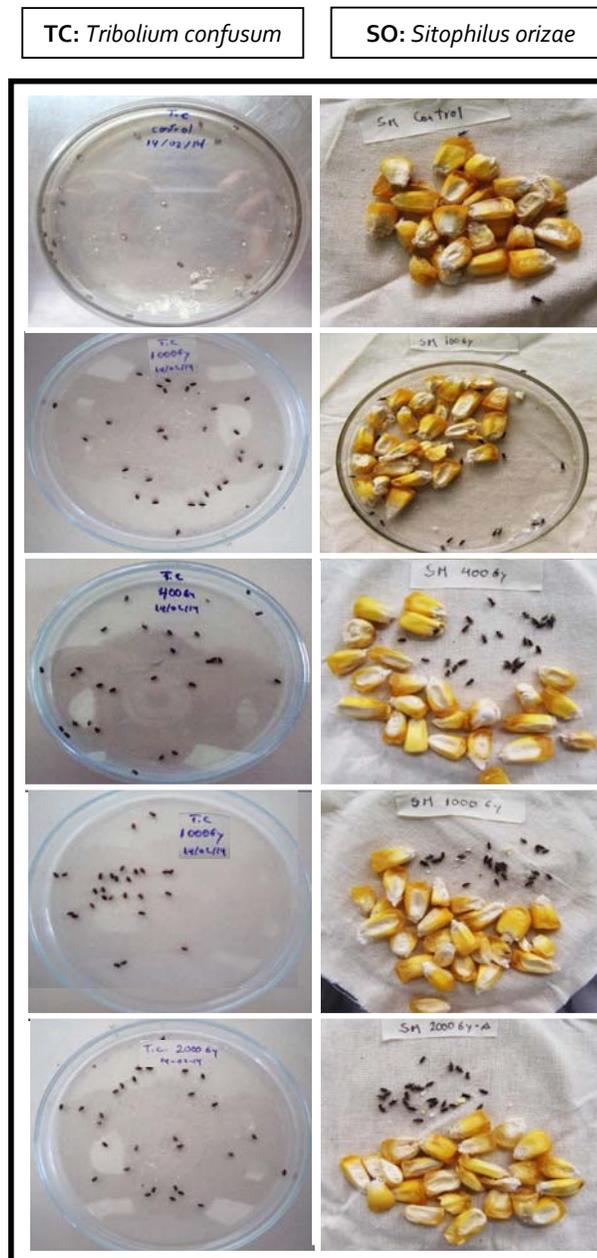


Figura 4. Gorgojos expuestos a diferentes dosis de radiación.

2.4.2. Protocolo 2: Extracción de ADN con buffer CTAB.

Se parte de un gorgojo previamente lavado con agua destilada estéril y homogenizado con 300 μ l de de buffer conteniendo 100 mM de Tris/HCl, 1,4 M de NaCl, 20 mM de EDTA, 2 % de CTAB, 2 % de PVP, 0,2 % de β -mercaptoetanol. La muestra fue triturada con un micromartinete estéril. Posteriormente se agregó 10 μ l de Proteínasa K (20 mg/mL) y se incubó por 2 horas a 60 °C. Luego, la

muestra fue centrifugada a 12,000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante acuoso fue removido a otro microtubo de 1.5 mL, se le agregó 300 μ l de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) se invirtieron varias veces los microtubos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos. Se transfirió nuevamente la fase acuosa a otro tubo y se le agregó 25 μ l de Acetato de amonio 3 M, seguido de una incubación por 30 minutos a -20 °C. Luego el ADN precipitado se centrifugó a 15 000 rpm por 15

min el sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó una vez con 1 mL de etanol frío al 70 %. Después de centrifugar a 12 000 rpm por 15 minutos, se descartó el sobrenadante. El ADN fue disuelto en 50µl de TE 1X.

2.4.3. Protocolo 3: Extracción de ADN mediante la alcalinización con hidróxido de sodio (NaOH)

La muestra fue lavada por cinco veces con agua destilada estéril y trasferida a un microtubo de 1.5 mL, se agregó 50 µl de NaOH 0.25M y con la ayuda de un micromartinete estéril se trituró hasta obtener partículas pequeñas. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 24 horas. Luego, el tubo fue colocado en baño María a 95 °C por 5 minutos. Posteriormente se agregó 8 µl de HCl concentrado, 15 µl de Tris-HCl 0.5 M pH 8.0 y 8 µl de 2 % Triton X-100, seguido de una segunda incubación en baño María a 95 °C por 5 minutos y se centrifugó a 12000 rpm por 20 minutos. Finalmente, se transvasó el sobrenadante que contiene el ADN a un microtubo de 1.5 mL y se almacenó a -20 °C.

2.5. Electroforesis en geles de agarosa

La calidad y cantidad de ADN se verificó mediante una corrida electroforética en geles de agarosa al 1 % junto con un marcador de peso molecular. El revelado se realizó con bromuro de etidio y las bandas fueron visualizadas por fluorescencia emitida al ser irradiadas con luz ultravioleta a 320 nm. Así mismo, las muestras fueron cuantificadas

mediante espectrofotometría con un equipo NanoDrop™ND-1000 Spectrophotometer.

3. Resultados y Discusión

3.1. Prueba de integridad del ADN por electroforesis en gel de agarosa:

Cada protocolo de extracción de ADN mostró un patrón de corrida característico para cada una de las muestras de gorgojos *Sitophilus oryzae* “gorgojo del arroz” y *Tribolium confusum* “gorgojo falso de la harina”, lo que implica que los procedimientos fueron consistentes. La Figura 5, muestra un resumen de los resultados obtenidos, donde se puede observar que para algunos protocolos fue posible obtener ADN de buen peso, mientras que para otros se limita a fragmentos pequeños.

3.2. Evaluación de los protocolos de extracción de ADN

El método de extracción usando el buffer TNES-urea mostró los mejores resultados, obteniendo ADN en todas las muestras, además se pudo observar una fluorescencia clara en los pozos; mientras que la extracción de ADN con CTAB fue medianamente exitosa porque en algunos de los casos no se obtuvo ADN. La extracción de ADN mediante la alcalinización con hidróxido de sodio (NaOH) fue la menos eficiente debido a que se obtuvo poco ADN en solo 4 muestras.

Tabla 2. Cuantificación de ADN de gorgojos con NanoDrop™ND-1000 Spectrophotometer.

Sample ID	ng/µL	Sample ID	ng/µL	Sample ID	ng/µL
TC-control-TNES	37.15	TC-control-CTAB	429.47	TC-control-NaOH	241.34
TC-100Gy-TNES	63	TC-100Gy-CTAB	497.81	TC-100Gy-NaOH	339.93
TC-400Gy-TNES	20.21	TC-400Gy-CTAB	383.03	TC-400Gy-NaOH	361.27
TC-1000Gy-TNES	57.24	TC-1000Gy-CTAB	242.21	TC-1000Gy-NaOH	280.47
TC-2000Gy-TNES	68.04	TC-2000Gy-CTAB	268.97	TC-2000Gy-NaOH	339.7
SO-control-TNES	43	SO-control-CTAB	369.85	SO-control-NaOH	503.2
SO-100Gy-TNES	31.92	SO-100Gy-CTAB	562.07	SO-100Gy-NaOH	492.9
SO-400Gy-TNES	56.99	SO-400Gy-CTAB	403.89	SO-400Gy-NaOH	496.29
SO-1000Gy-TNES	98.81	SO-1000Gy-CTAB	281.81	SO-1000Gy-NaOH	492.2
SO-2000Gy-TNES	112.88	SO-2000Gy-CTAB	403.79	SO-2000Gy-NaOH	460

3.3. Evaluación de la pureza y concentración del ADN por espectrofotometría de luz U.V. y electroforesis

Una vez extraído y purificado el ADN de las muestras biológicas es necesario conocer la concentración de las muestras, por lo que se procedió a cuantificar el ADN por

espectrofotometría de luz ultravioleta a 260 y 280 nm utilizando un NanoDrop™ND-1000 Spectrophotometer.

Se determinó la concentración y calidad del proceso de extracción de ADN en base al análisis de los valores de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. (Tabla 2).

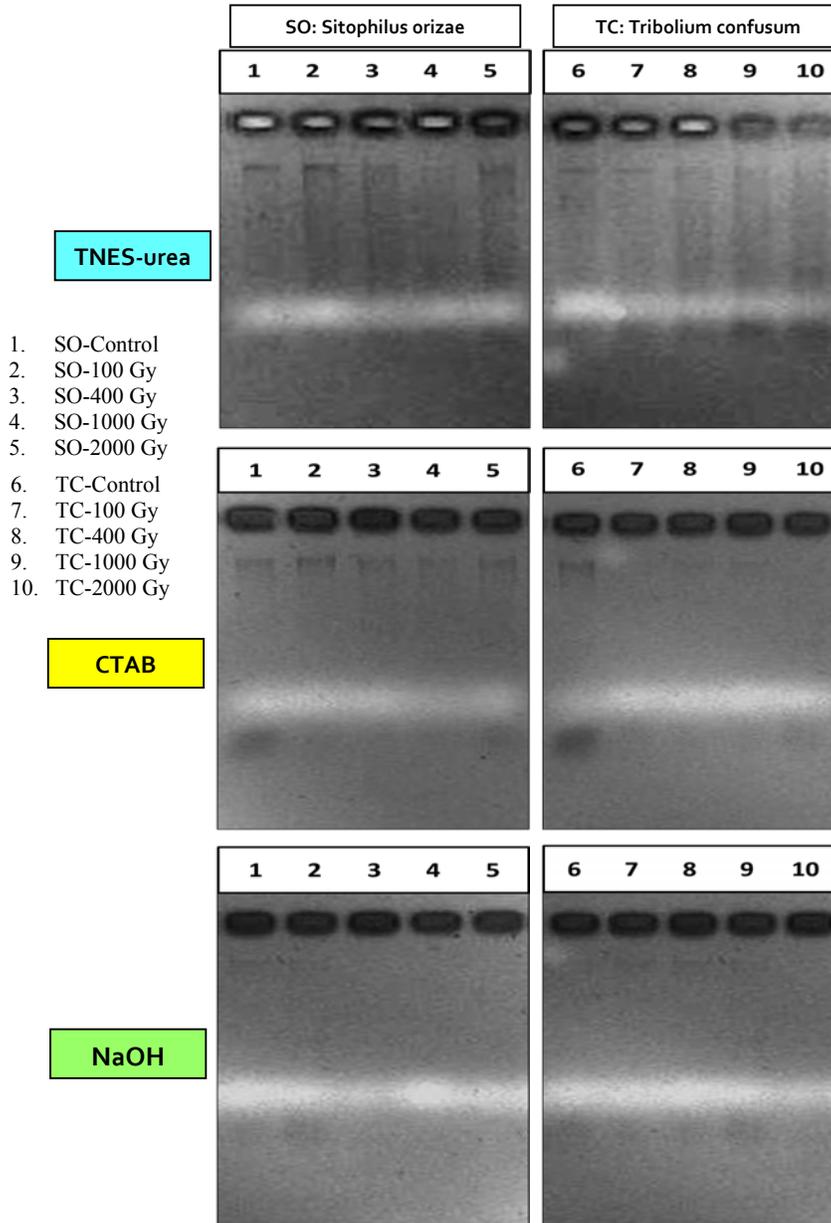


Figura 5. Electroforesis en geles de agarosa al 1 %. Calidad de ADN de gorgojos, nótese las bandas con barrido en los carriles de corrida electroforética de las muestras con altas dosis de radiación.

El protocolo de extracción con el buffer CTAB obtuvo mejores resultados en concentración e integridad del ADN, seguido por el protocolo de extracción con NaOH y por último la extracción con el buffer TNES-

urea (Tabla 2). Además, la calidad de ADN se verificó con una corrida electroforética de agarosa al 1 %, obteniéndose ADN puro y sin evidencias de degradación en todos los controles. Sin embargo, se observaron

barridos (*smear*) largos medianamente intensos en todo el carril como resultado de la alta dosis de radiación, evidenciando el nivel de degradación del ADN (Figura 5).

4. Conclusiones

1. El tratamiento de gorgojos adultos a una dosis de radiación de 100 y 400 Gy causó una mortalidad media de la muestra tratada, evidenciando cierto grado de resistencia en los insectos.
2. Las dosis de radiación de 1000 y 2000 Gy dieron lugar a ningún adulto vivo después del tratamiento, lo que indica que estas dosis de radiación causaron la mortalidad al 100 %.
3. Los resultados preliminares muestran degradación del ADN, la cuál es proporcional a la cantidad de radiación gamma evaluada.
4. El protocolo basado en la extracción con buffer TNES-urea fue la más eficiente para extraer ADN de calidad en las muestras irradiadas.

5. Agradecimientos

Este trabajo contó con la participación del estudiante del último año de Biología Joe Hermosilla Jara (modalidad Prácticas pre-profesionales. IPEN-2014).

6. Bibliografía

- [1]. Gutiérrez Rosati A. Maíz: riqueza genética. Lima: Asociación Desarrollo Medio Ambiental Sustentable; 2006.
- [2]. Sevilla R, Basurto A, Camarena F, *et al.* Magnitud e impacto de la liberación de organismos genéticamente modificados y sus productos comerciales. Casos: Algodón, leguminosas de grano, maíz y papa. Consejo Nacional del Ambiente (CONAM). 2005.
- [3]. Dix EE, All JN. Invasion patterns sex ratio dynamics of the maize weevil (Coleoptera: Curculionidae) Infesting field corn. Jour. Econ. Entomol. 1985; 78(5): 1072-75.
- [4]. Okelana FA, Osuji FNC. Influence of relative humidity at 30 °C on the oviposition, development and mortality of *Sitophilus zeamais* M. (Coleoptera: Curculionidae) in maize kernels. Jour. Stored Product Res. 1985; 21(1): 13-19.
- [5]. Yezerki A, *et al.* A genetic linkage map for *Tribolium confusum* based on random amplified polymorphic DNAs and recombinant inbred lines. Insect Molecular Biology. 2003; 12(5): 517-526.
- [6]. Sifuentes AJ. Plagas de los granos almacenados y su control. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas de la SARH. Folleto de Divulgación N° 68; 1977.
- [7]. Ahmed M. Disinfestation of stored grains, pulses, dried fruits and nuts, and other dried foods. In: Molins R. (Ed.). Food irradiation: Principles and applications. New York: John Wiley & Sons; 2001. p. 77e112.
- [8]. Mc Gregor LR. Los problemas sobre resistencia de granos al ataque de insectos del almacén en México. In: Moreno E, Ramírez M, eds. Memorias del Coloquio Internacional sobre Conservación de Semillas y Granos Almacenados. UNAM. México. 1980. 220 p.
- [9]. Follet PA, *et al.* Irradiation quarantine treatment for control of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) in rice. Journal of Stored Products Research. 2013; 52: 63-67.
- [10]. Lindquist DA. Insects, isotopes and radiation. IAEA Bulletin, 1987; 29(2): 9-12.
- [11]. Metta VC, Johnson BC. Radiation sterilization of foods, biological value of gamma irradiated corn protein and wheat gluten. J. Agr. and Food Chem. 1959; 7(2): 131-133.
- [12]. Cornwell PB. The entomology of radiation disinfestation of grain. London: Pergamon Press; 1966.
- [13]. Vergara C, Narrea M. Identificación de Plagas de Productos Almacenados. Universidad Nacional Agraria La Molina. Departamento de Entomología. 2012. 134 p.
- [14]. American Society for Testing and Materials (ASTM). ASTM E-1026-04 Practice for using the Fricke. Reference Standard Dosimetry Systems. Pennsylvania, United States; 2004.