



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Laboratório de Melhoramento Genético de Bicho-da-Seda

Biotecnologia aplicada à sericultura

Prof^ª. Dr^ª. Maria Aparecida Fernandez

Doutorando Alex Sandro Chiarello

Doutoranda Grazielle Pessini

Doutoranda Verônica A. Fassina

MARINGÁ

2016

Introdução

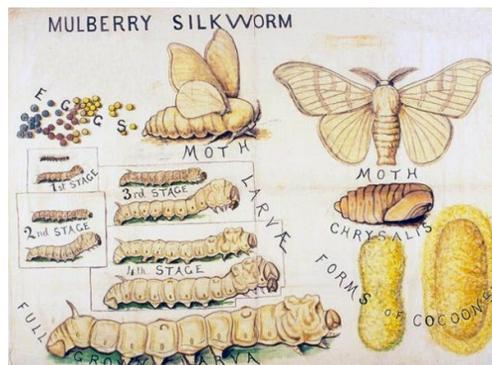
1. Bicho-da-seda

Bombyx mori foi descrito por Linnaeus em 1758, pertence ao reino Animalia, filo Artropoda, classe Insecta, ordem Lepidoptera, família Bombycidae, gênero *Bombyx*. O bicho-da-seda é, juntamente com a abelha, o único inseto domesticado com finalidade comercial.

A espécie domesticada de *B. mori* foi propagada em larga escala e utilizada para a produção de seda na China, Japão e Europa, chegando ao Brasil apenas no ano de 1.740. Devido ao seu antigo processo de domesticação, as lagartas não conseguem se alimentar em seu ambiente natural, necessitando que o alimento seja fornecido pelo homem. As mariposas de *B. mori* apresentam asas e aparelho digestório degenerados e não podem mais voar ou se alimentar, ou seja, esta espécie é totalmente dependente do homem, o que caracteriza a completa domesticação (Munhoz, 2010).

1.1 Ciclo de Vida

O bicho-da-seda é um inseto holometábolo, ou seja, apresenta metamorfose completa, sendo o inseto jovem completamente diferente do inseto adulto. Este inseto passa por quatro estágios no seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa e mariposa. A mariposa desova entre 400 e 500 pequenos ovos, que se transformam em pequenas larvas de cerca de 1mm de comprimento, as quais se alimentam de folhas de amoreira para o desenvolvimento, tendo 4 mudas no total. Quando as larvas atingem o tamanho máximo de 70 a 80 mm de comprimento, em cerca de 30 dias, passam a produzir os casulos verdes. Dentro do casulo, a larva se transforma em crisálida e com 10 ou 12 dias se transforma em mariposa. Na fase adulta do inseto, como mariposa pode-se verificar o dimorfismo sexual, sendo que as fêmeas são significativamente maiores que os machos.



1.2 Sericicultura

A sericicultura é a atividade agropecuária de criação do bicho-da-seda para obtenção de casulos destinados à produção de seda. Esta atividade inclui o cultivo da amoreira, a produção dos ovos do bicho-da-seda, criação das lagartas até a produção dos casulos e, finalmente, fiação e confecção da seda por parte do setor industrial. No Brasil as condições climáticas são favoráveis ao cultivo tanto da amoreira quanto do inseto, fazendo com que a produção de casulos seja considerada uma boa alternativa para os produtores (Fernandez et al., 2005).

A China foi a primeira civilização a utilizar a seda, controlando o ciclo do bicho-da-seda, alimentando-o com folhas de amoreira e matando os adultos antes de nascerem, além de se conhecer as técnicas do bobinamento dos filamentos, tecendo-os em fios resistentes que, posteriormente, eram usados para a confecção de tecidos. A sericicultura tornou-se um importante fator para a globalização, por aproximadamente 2.000 anos, a chamada “Era da Rota da Seda” (Kurin, 2002). No século XVIII, o Imperador D. Pedro I, fundou a primeira indústria de tecelagem da seda no Brasil e em 1921 estabeleceu-se em Campinas no Estado de São Paulo a Indústria de Seda Nacional. Mas foi a segunda Guerra Mundial que favoreceu o desenvolvimento da sericicultura.

As indústrias de fiação do Brasil distribuem mudas de amoreiras e lagartas do bicho-da-seda no 3º estágio de desenvolvimento larval para os produtores que cultivam as lagartas até a fase de casulos, os quais são vendidos ao setor empresarial. Portanto, a atividade da sericicultura proporciona importantes aspectos sócio-econômicos: é uma cultura alternativa, gera produto de exportação, fixa o homem no campo, apresenta pouca dependência climática, tem pequeno custo de produção, além da racionalização da mão-de-obra. O Estado do Paraná, nos últimos 10 anos, destacou-se como o maior produtor nacional de casulos verdes.

1.3 *Bombyx mori* como modelo de estudo biológico

O bicho-da-seda tem sido muito utilizado como um sistema modelo para estudos devido ao grande tamanho de seu corpo, a facilidade de criação em laboratório e importância econômica na sericicultura. Esta espécie facilita os estudos de genômica comparativa levando a abordagens para controle de espécies de pragas (Mita et al., 2004).

1.3.1 Diversidade das Raças

São inúmeras as raças de bicho-da-seda com origem geográficas de domesticação diferentes, sendo as mais conhecidas e empregadas às raças japonesas, européias e chinesas. É geralmente aceito que *Bombyx mandarina* é o ancestral selvagem mais próximo de *B. mori* sendo ambos morfologicamente e fisiologicamente similares. *Bombyx mandarina*, de ocorrência no Japão e Coréia tem 27 cromossomos, enquanto que *B. mandarina*, da China apresenta 28 cromossomos, assim como o domesticado *B. mori*. Os dois tipos selvagens, *B. mandarina* da China e do Japão, possuem morfologia homogênea e número de cromossomos diferentes por genoma. Com o avanço do melhoramento genético, e com o emprego de seleções e cruzamentos conduzidos, através de muitos anos, várias outras raças apareceram, estimando-se que a espécie sofreu mais de quatrocentas mutações.

1.3.2 Melhoramento Genético

A importância de avaliar e escolher as raças bases “progenitores” ou “matrizes” nos programas de criação de híbridos, para se obter alguma melhoria na produção de seda. A exploração dos efeitos benéficos proporcionados pelo processo de hibridização, também conhecido como vigor híbrido, é bem conhecida na Sericultura. Quando se deseja realizar a hibridação, é importante que o acasalamento seja conduzido entre duas ou quatro raças puras, em híbridos simples ou duplos, respectivamente. Para garantia de tratar-se de raças puras, é necessário forçar o aumento de homozigose nas descendências transformando-as em linhagens endogâmicas. A endogamia permite expor nas progênes resultantes os genes deletérios ou letais escondidos na condição heterozigota. Desse modo pode-se fazer seleção contra eles.

A utilização da heterose é uma estratégia que gera variabilidade por hibridização de genótipos elites com outras variedades selecionadas ou variedades locais, direcionando para a seleção de recombinações genéticas desejáveis. Os atributos qualitativos e quantitativos intrínsecos de cada raça ou linhagens, são normalmente estudados, visando selecionar os melhores para programas de melhoramento e formação de híbridos (PORTO et al., 2004).

No Brasil, este trabalho tem sido realizado por meio de órgãos oficiais e de empresas particulares, nos quais grande número de estudos foram conduzidos, objetivando comparar as várias raças do bicho-da-seda, bem como seus híbridos, quando às suas características desejáveis. Atualmente a formação e distribuição dos híbridos comerciais do bicho-da-seda ficou restrita às empresas privadas que atuam

no setor, seguindo um modelo integrado de produção empresa/produtor (PORTO et al., 2004).

Por este fato é que se torna de fundamental importância a manutenção de estoques genéticos desta espécie em bancos de germoplasma localizados em institutos públicos e privados distribuídos pelo mundo. Além de fazer a conservação, os bancos também realizam a caracterização e avaliação dos genótipos.

Nos últimos anos, com os avanços na área da genética e biologia molecular, principalmente com o advento da tecnologia do DNA recombinante, da reação em cadeia da polimerase (PCR) e do sequenciamento automático do DNA, foram desenvolvidas poderosas técnicas para o desenvolvimento de diferentes tipos de marcadores genéticos moleculares.

O elevado número de artigos científicos que utilizam tais marcadores no estudo de várias espécies e com as mais variadas aplicações evidencia o impacto dessa tecnologia na pesquisa científica e tecnológica. Marcadores moleculares podem ser definidos como marcadores genéticos baseados na detecção de isoenzimas ou sequências de DNA. Neste mini-curso abordaremos o uso de marcadores baseados em sequências de DNA para o estudo de variabilidade genética em populações.

2. Variabilidade genética

A variabilidade genética mede a tendência dos diferentes alelos de um mesmo gene variarem entre si, numa dada população (Primack, 2006). Esta não deve ser confundida com diversidade genética, que é a quantidade total de variações genéticas observada tanto entre as populações de uma espécie, como entre os indivíduos de uma população.

A capacidade de uma população para se adaptar a um ambiente em mudança depende da variabilidade genética. Indivíduos com certos alelos ou combinações de alelos podem ter precisamente as características necessárias para sobreviverem e se reproduzirem sob novas condições. Dentro de uma população, a frequência de um dado alelo pode variar entre raro e muito raro. Estes novos alelos surgem na população tanto através de mutações aleatórias, como pela migração de indivíduos provenientes de outras populações.

A variabilidade genética de uma população é diferente da variação fenotípica deste. Entende-se como fenótipo, o resultado da interação do genótipo, isto é, da constituição genética, com o ambiente. Para o estudo da variabilidade genética de populações é desejável fazê-lo por meio de marcadores moleculares considerados

neutros em relação aos efeitos fenotípicos, com efeito epistático e pleiotrópico mínimo ou nulo.

2.1 Marcadores de DNA

O princípio da utilização dos marcadores de DNA é baseado no dogma central da biologia molecular e na pressuposição de que diferenças genéticas no DNA significam, na maioria das vezes, diferenças nas proteínas codificadas, as quais em conjunto levam a diferenças no fenótipo (Fig. 1).

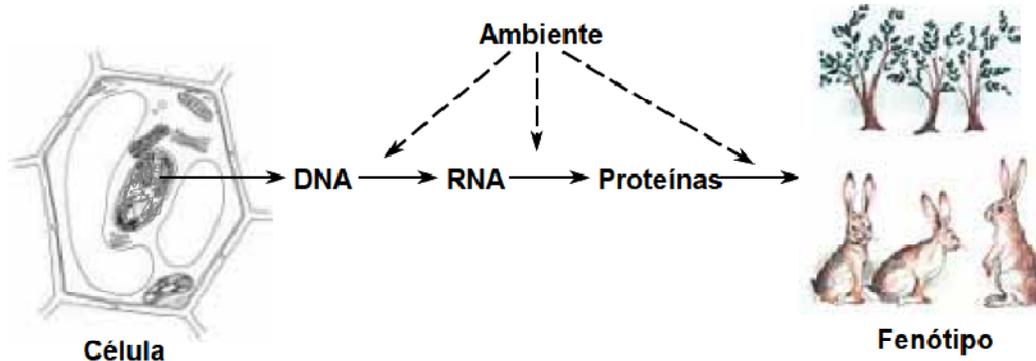


Fig. 1. Dogma Central da biologia molecular, evidenciando a influência direta do DNA no fenótipo.

A idéia de que os cromossomos contêm as unidades informacionais transferidas de uma geração para a outra foi proposta ainda no século XIX. Entretanto, a identificação e descrição do DNA como a molécula que contém esta informação só ocorreu na primeira metade do século XX. Cada cromossomo contém uma longa e única molécula de DNA, além de proteínas que atuam no empacotamento desta molécula. As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados “**marcadores moleculares**”.

Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondentemente a regiões expressas ou não do genoma). Marcadores isoenzimáticos são muitas vezes chamados de marcadores bioquímicos. A sequência de nucleotídeos e a função de um marcador molecular podem ou não ser conhecidas e, em geral, são desconhecidas. Ao se verificar o seu comportamento de acordo com as leis básicas de herança de Mendel, um marcador molecular é adicionalmente definido como marcador genético. Isto é feito, por exemplo, através do estudo do comportamento do marcador em uma população segregante. Portanto, é importante

ênfatizar que o simples fato do marcador ser DNA, ou produto da transcriçãõ e traduçãõ de uma sequênça de DNA, nãõ implica em que se constitua em um marcador “genético”, como frequentemente se supõe (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Um loco molecular que apresenta segregaçãõ mendeliana é considerado um marcador genético. Por isso, os marcadores de DNA se prestam para estudos de genética de populações, mapeamento e análises de similaridade e distância genética.

Diversas técnicas de biologia molecular estãõ hoje disponíveis para detecçãõ de variabilidade genética ao nível de sequênça de DNA, ou seja, para a detecçãõ de polimorfismo genético. Estas técnicas permitem a obtençãõ de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo. Tais marcadores podem ser utilizados para as mais diversas aplicações, tanto no estudo de variabilidade genética como na prática de melhoramento genético e diagnóstico molecular.

Polimorfismo genético é, por definiçãõ, uma variaçãõ genotípica que pode ser separada em classes distintas e bem definidas. O controle genético se dá por um ou poucos loci, sendo a característica pouco suscetível a fatores ambientais.

O desenvolvimento tecnológico na área de marcadores moleculares tem sido fascinante e extremamente rápido. A tecnologia de DNA recombinante e o desenvolvimento da amplificaçãõ de segmentos de DNA via PCR (“Polymerase Chain Reaction”, ou reaçãõ de polimerase em cadeia), abriram o caminho para uma mudançã no paradigma genético básico: da inferênça do genótipo a partir do fenótipo, onde Mendel foi pioneiro para a análise direta da variaçãõ na sequênça de DNA. Esta mudançã de enfoque foi denominada transiçãõ da “genética Mendeliana” para a “genética genômica” (Beckmann, 1988). Tecnologias de análise molecular mais acessíveis e eficientes estãõ constantemente sendo aprimoradas. Métodos estatísticos acompanham este desenvolvimento, e têm permitido a manipulaçãõ de enormes quantidades de dados.

Enfim, os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridizaçãõ ou amplificaçãõ de DNA. Entre os identificados por hibridizaçãõ estãõ os marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; Botstein *et al.*, 1980) e minissatélites ou locos VNTR (Variable Number of Tandem Repeats; Jeffreys *et al.*, 1985). Já aqueles revelados por amplificaçãõ incluem os marcadores do tipo: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; Williams *et al.*, 1990); SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions); STS (Sequence Tagged Sites) (Paran & Michelmore, 1993); Microsatélite (Litt & Luty, 1989); e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Vos *et al.*, 1995).

Podemos ainda classificar os marcadores moleculares de acordo com a sua base genética, sendo que o marcador é codominante quando os cromossomos homólogos podem revelar fragmentos de um mesmo tamanho (genótipo homozigótico) ou não (genótipo heterozigótico) devido a variações nos sítios de restrição. Já no caso de marcadores dominantes, não é possível saber se o loco amplificado está em homozigose ou heterozigose. Os indivíduos nos quais o alelo não é amplificado constituem a outra classe, considerada homozigótica para ausência da banda, qualquer que seja o motivo pelo qual o fragmento não foi amplificado.

Entre as vantagens dos marcadores moleculares, podemos citar a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos; a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente; a possibilidade de detecção de tais polimorfismos em qualquer estágio do desenvolvimento da planta ou do animal ou a partir de cultura de células ou tecidos e a possibilidade de gerar maior quantidade de informação genética por loco no caso de marcadores co-dominantes. Os diferentes tipos de marcadores moleculares têm permitido estudos de evolução, de diversidade genética inter e intraespecífica, de identidade, origem genética e identificação de novas variantes, gerando informações importantes para subsidiar diferentes ações de pesquisa, principalmente relacionadas a programas de conservação, caracterização e uso de recursos genéticos e programas de melhoramento animal e vegetal.

2.2 PCR - Polymerase Chain Reaction ou Reação da Polimerase em Cadeia

A tecnologia da PCR foi concebida em meados da década de 80 (Mullis e Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1985). Desde então esta tecnologia causou uma revolução na biologia, na pesquisa visando o entendimento de processos biológicos fundamentais como nas áreas de melhoramento genético de plantas e animais domésticos, uma vez que esta técnica possibilitou a geração de grandes quantidades de DNA de segmentos específicos, podendo ser facilmente detectado a olho nu em gel de eletroforese através de corantes específicos.

PCR é uma técnica poderosa, que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Sua reação baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como indicadores (*primers*) que delimitam a sequência de DNA de fita dupla alvo da amplificação, que acontece num Termociclador em microtubos (Fig. 2).



Fig. 2. Termociclador.

Um ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA alvo é desnaturada através da elevação da temperatura para 92°C a 95°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35°C a 60°C, dependendo do tamanho e sequência do *primer* utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada *primer* com as sequências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos *primers*. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a sequência-alvo, de maneira que uma cópia desta sequência é feita no processo. Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes (Fig. 3). Uma vez que a quantidade de DNA da sequência alvo dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de apenas 20 ciclos, é produzido mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de sequência alvo (Fig. 4). Esta escala de amplificação permite iniciar com quantidades mínimas de DNA (da ordem de picogramas ou nanogramas) e terminar a reação com grandes quantidades de DNA de uma sequência específica de interesse.

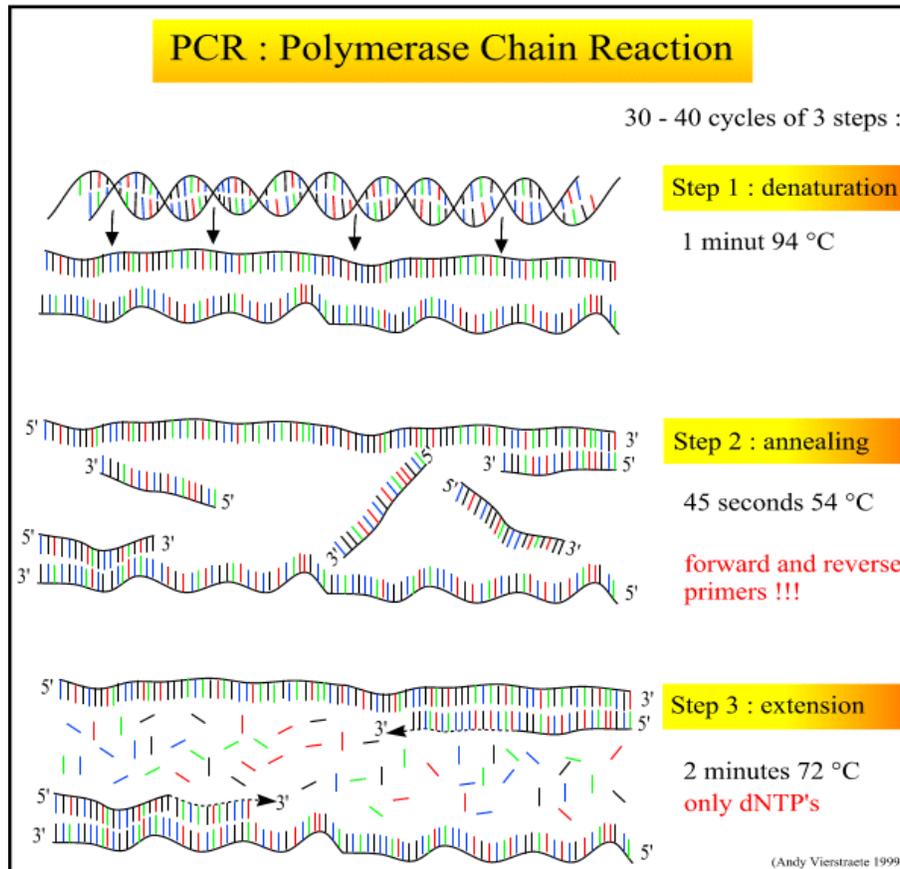


Fig. 3. Diferentes passos de uma reação de polimerase em cadeia (PCR).

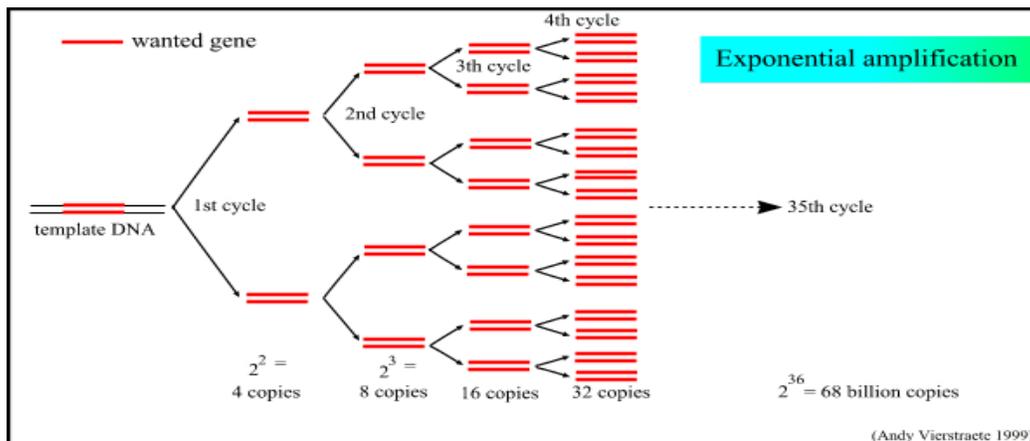


Fig. 4. Amplificação exponencial de um gene numa reação de polimerase em cadeia (PCR).

Porém, a construção de *primers* para amplificação via PCR depende do conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que flanqueiam a seqüência de DNA de interesse. Para conhecer estas seqüências é necessária a clonagem e

sequenciamento da região. Em vista disso, com exceção de alguns genes de sequência conhecida, a PCR apresentou de início, um uso limitado como técnica para a obtenção de marcadores moleculares.

2.3 DNA barcode

O DNA *barcode* é uma sequência curta de DNA, facilmente identificada, e característica de cada espécie. A região do gene que está sendo usada por quase todos os grupos de animais é de 648 pb do **gene mitocondrial citocromo c oxidase I, COI** (Figura 2), e está se mostrando altamente eficaz na identificação de aves, insetos, peixes, e outros grupos de animais. A vantagem de usar COI é que a região é curta o suficiente para ser sequenciada de forma rápida e barata e ainda longa o suficiente para identificar variações entre as espécies.

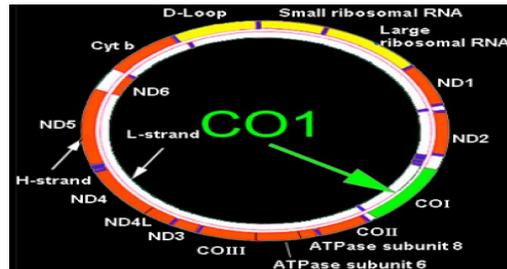


Figura 5. DNA mitocondrial, evidenciando a região do gene citocromo c oxidase I, COI

3. Banco de Germoplasma

O banco de germoplasma de *B. mori* consiste de raças isoladas, estoques genéticos, raças derivadas de espécies selvagens e de híbridos exóticos. Também inclui raças melhoradas de diferentes origens geográficas, tais como Índia, China, Japão, Rússia, Coreia do Sul e França. Também são conhecidos e mantidos mais de 300 mutantes criados graças ao avanço da tecnologia. Estas mutações são relacionadas a características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e de comportamento.

O progresso da sericicultura depende da variabilidade genética contida nas raças mantidas nos bancos de germoplasma, pois muitas raças foram e serão usadas para a formação de híbridos comerciais que unem as características desejadas. Dependendo do alvo fenotípico do experimento, raças do bicho-da-seda podem ser selecionadas a partir do banco de germoplasma, que deve ser capaz de fornecer os materiais de reprodução desejados para os criadores. A coleta, caracterização, avaliação, conservação e manutenção sistemática dos estoques do bicho-da-seda

sem perder suas características qualitativas e quantitativas originais são de extrema importância. Esta preservação é importante também para que cruzamentos e retrocruzamentos com espécies selvagens que possam ser exploradas visando transferir alguns bons caracteres para *Bombyx mori*, tais como adaptabilidades para variadas condições climáticas, hábito alimentar, alta resistência para doenças, incremento na qualidade do fio da seda

Mais de 320 características hereditárias de *B. mori* têm sido relacionadas para avaliação e caracterização das raças de bicho-da-seda, e existem diferentes raças de bicho-da-seda que podem ser classificadas de diversas maneiras, como, por exemplo, de acordo com a sua origem geográfica, voltinismo, número de ecdises ou até mesmo cor do casulo. No entanto, algumas características são muito semelhantes entre si e a avaliação morfológica pode ser muito morosa e ainda assim não ser discriminatória. Neste sentido, marcadores genéticos e bioquímicos são extremamente úteis nessa classificação.

Identificar e catalogar espécies e raças são fatores de suma importância para auxiliar na preservação das mesmas. Porém identificar e monitorar a biodiversidade de uma região de forma mais eficiente e compreensível ainda é um grande desafio para a ciência e a idéia de um sistema de identificação molecular padronizada começou com a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Metodologia experimental

1. Extração de DNA de mariposas de bicho-da-seda
2. Amplificação da região *barcodes* do gene mitocondrial COI, por meio de PCR
3. Eletroforese em gel de agarose
4. Avaliação dos resultados do gel

1. Extração de DNA de mariposas (*Bombyx mori*)

1. Identificar no tubo a espécie/raça e sua numeração.
2. Macerar a mariposa em nitrogênio líquido (marca de 250 µL – tubos de 2 mL);
3. Adicionar de 500 µL a 750 µL de **tampão de extração**;
4. Centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C;
5. Transferir o sobrenadante (~ 750 µL) para novos tubos;
6. Adicionar ao sobrenadante 750 µL de **tampão para proteinase K** e 1,5 µL de **proteinase K**;
7. Incubar as amostras a 37°C por 3 horas ou a 60°C por 1 hora (com agitação);
8. Separar as amostras em dois tubos;
9. Acrescentar a cada tubo 750 µL de **clorofórmio** (ou o mesmo volume);
10. Centrifugar por 30 minutos a 14.000 rpm a 4°C;
11. Transferir o sobrenadante para novo tubo e adicionar 350 µL de **fenol** e 350µL de **clorofórmio** (1 fenol:1 clorofórmio);
12. Centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm a 4°C;
13. Transferir o sobrenadante para novo tubo (1,5 mL) para precipitação;
14. Para precipitar: usar NaCl 5 M ([final] = 0,2 M) e **etanol** 100% (2x volume) ou **isopropanol** (0,7x volume).
Obs: Nesta fase, se tiver pouco sobrenadante, usar etanol no dobro do volume. Se tiver mais que 500 µL de sobrenadante, usar isopropanol
15. Fechar os tubos presos em um barbante e mergulhá-los em nitrogênio líquido durante 30 segundos;
16. Centrifugar por 30 minutos a 14.000 rpm a 4°C;
17. Descartar o sobrenadante;
18. Lavar o pellet com **etanol** 70% ou 80% (≈ 70 a 100 µL);
19. Colocar os tubos para secar;
20. Ressuspender o pellet em TE 1X + RNAse;

Purificação do DNA

Obs: completar o volume com TE para 200 µL antes de iniciar a purificação.

21. Adicionar 1 fenol :1 clorofórmio: 100 µL de **fenol** e 100 µL de **clorofórmio**;
22. Centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm a 4°C;
23. Transferir o sobrenadante para novo tubo e adicionar **clorofórmio** no mesmo volume (200 µL);
24. Centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm a 4°C;
25. Transferir o sobrenadante para novo tubo e precipitar com NaCl 5 M (14 µL) e **etanol** 100% (2x volume) ou ISOPROPANOL (0,7x volume);
26. Mergulhar as amostras em nitrogênio líquido durante 30 segundos;
27. Centrifugar por 30 minutos a 14.000 rpm a 4°C;
28. Descartar o sobrenadante;
29. Lavar com etanol 70% e deixar secar;
30. Ressuspender o pellet com TE 1X (autoclavado 2x de 45' e filtrado);
31. Manter as amostras em freezer.

A. Tampão de extração

Soluções	[inicial]	[final]
200 µL de Tris-HCl pH 7,5	1 M	10 mM
240 µL de NaCl	5 M	60mM
400 µL de EDTA pH 8,0	0,5 M	10 mM
6.250 µL de sacarose	16%	5%
24 µL de espermidina	125mM	0,15mM
60 µL de espermina	50mM	0,15mM
Completar volume com água mili-Q para 20 mL		

B. Tampão para proteinase K

Soluções	[inicial]	[final]
4.000 µL de Tris-HCl pH 9,0	1 M	0,2 M
1.200 µL de EDTA pH 8,0	0,5 M	30 mM
2.000 µL de SDS	20%	2%
6.250 µL de sacarose	16%	5%
Completar volume com água mili-Q para 20 mL		

2. Amplificação do DNA genômico por PCR (Reação em cadeia da polimerase)

Material:

- Oligonucleotídeos (*primers*) específicos (5 mM)
- DNA-molde (DNA de *Bombyx mori*) contendo o alvo
- dNTPs (desoxirribonucleotídeos): dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (1 mM)
- Tampão para *Taq* DNA-polimerase (10X)
- *Taq* DNA-polimerase (1 U/μl)
- MgCl₂ (50 mM)

Os iniciadores ou *primers* são oligonucleotídeos complementares a seqüências do DNA. Nesse caso, serão utilizados *primers* descritos por Hebert et al. (2004) que flanqueiam uma região padrão do *barcodes* como marcador molecular. O segmento de DNA amplificado inclui a seqüência nucleotídica situada entre dois *primers* de aproximadamente 650 pb.

LepF1: 5'-ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3'

LepR1: 5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3'

A temperatura de anelamento dos iniciadores ao DNA-molde na PCR é definida com base na T_m. Geralmente, ela deve ser de cerca de 20 a 25°C abaixo da T_m dos iniciadores.

Estimativa da T_m de iniciadores

A seguinte fórmula pode ser utilizada para estimar a temperatura média de fusão (T_m) de um iniciador: $T_m (^{\circ}\text{C}) = 4 \times (\text{G} + \text{C}) + 2 \times (\text{A} + \text{T})$

Procedimentos:

1. Pipetar as seguintes soluções em um tubo de centrifuga de 0,5 mL:

Quantidades para uma reação:

Água miliQ	8,25 μL
Tampão (10X)*	1,5 μL
dNTPs (1 mM)	0,5 μL
Primer LepF1 (5 mM)	0,5 μL
Primer LepR1 (5 mM)	0,5 μL
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 μL
<i>Taq</i> DNA-polimerase (1 U/μl)	1,5 μL
<u>DNA molde (60 ng/μl)</u>	<u>1,5 μL</u>
Volume final	15 μL

* 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol, estabilizantes, da marca Invitrogen.

Nota: Uma unidade enzimática da DNA-polimerase é definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a incorporação de 10 nmol de dNTP durante 30 min à 74°C.

2. Colocar a reação em um termociclador com a seguinte programação de ciclos de temperatura:

Passo	Temperatura	Tempo	
1	94°C	1 min	Temperatura Inicial/Denaturação do DNA
2	94°C	40 seg	Denaturação
3	60°C	40 seg	Temperatura de Anelamento dos <i>primers</i>
4	72°C	1 min	Extensão ou Amplificação do DNA
5	Voltar para o passo 2 - 35 X		
6	72°C	30 min	Extensão Final
7	4°C	indefinidamente	Armazenamento

3. Preparar 5 µL do produto da reação de PCR para eletroforese em gel de agarose.

4. Submeter as amostra a eletroforese em gel de agarose 1,5% .

3. Eletroforese em gel de agarose

Objetivo: preparar gel de agarose para análise de ácidos nucléicos previamente amplificados por PCR.

Materiais:

- TBE 5X (Composição para 1 litro)

54 g de tris-HCl

27,5 g de ácido bórico

20 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0

- Gel de agarose 1,5%, 100 mL

100 mL de TBE 1X

1,5 g agarose

- Brometo de etídeo (1 mg/ml)

Usar 1µL para cada 10 mL de gel.

Cuidado! O brometo de etídeo é mutagênico e cancerígeno. Não tocar nos géis corados com brometo de etídeo sem a devida proteção. Use sempre luvas para manusear o frasco e o gel com brometo de etídeo.

- *Transiluminador ultravioleta e máscaras de proteção*

Procedimentos

- Preparação do gel:

Preparar a solução de agarose em frasco de Erlenmeyer e aquecê-la (até a fervura) em forno de microondas até a sua completa solubilização. O frasco deve ser agitado freqüentemente para homogeneização e para evitar transbordamento.

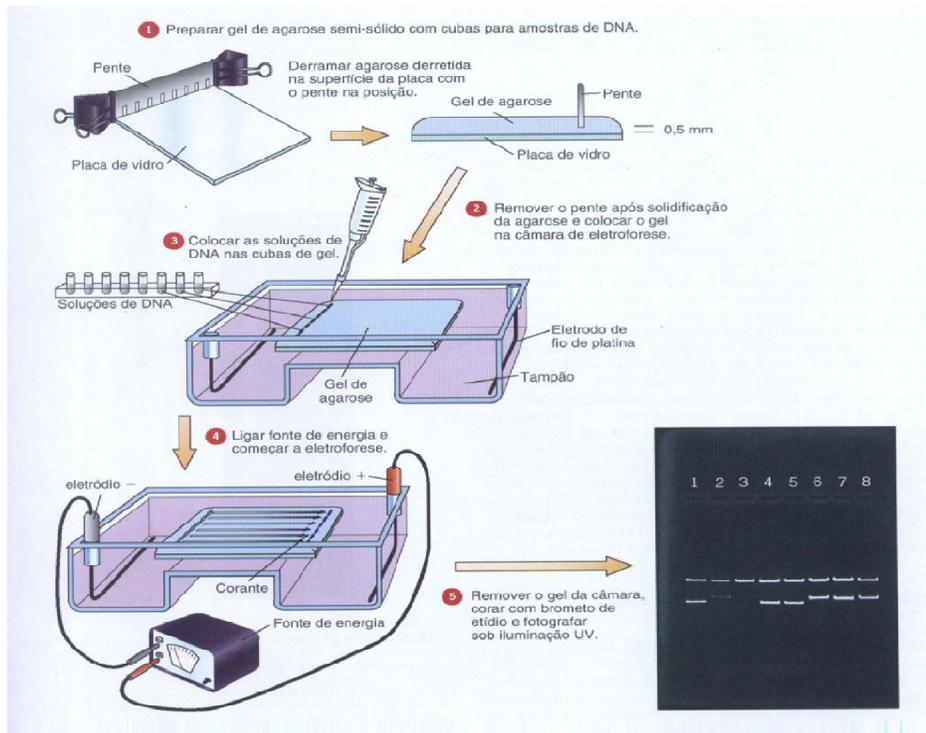
Após a solubilização, a solução de agarose deve ser resfriada por alguns minutos e a ela devem ser adicionados solução de brometo de etídio (1 mg/ml). Depois disso, agitar a solução e vertê-la sobre uma placa-molde de gel com o pente já montado. Aguardar a polimerização a temperatura ambiente.

- Preparação das amostras:

Em parafilme misturar 5 µl de cada amostra amplificada de DNA mais 3 µl de loading buffer 6X.

- Eletroforese:

1. Colocar o gel de agarose na cuba de eletroforese e submergi-lo em TBE 1X.
2. Aplicar as amostras no gel com uma micropipeta
4. Submeter as amostras a eletroforese a uma voltagem de 100V, por aproximadamente 60 min.
5. Visualizar as amostras de DNA resolvidas eletroforéticamente colocando o gel sobre transluminador com iluminação ultravioleta (Cuidado! O ultravioleta pode causar queimaduras e é mutagênico. Não visualizar os géis sem as devidas precauções de segurança).



Leituras sugeridas

FERNANDEZ, M.A.; CIFERRI, R.R.; PATUSSI, E.V.; PEREIRA, M.P.; FELIPES, J.; BRAVO, J.P.; ZANATTA, D.B.; GOUVEIA, F.S.; BALANI, V.A. (2005). A Utilização da Biotecnologia na Sericultura Brasileira. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 35:56-61.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. (1995) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. BRASÍLIA: EMBRAPA-CENARGEN, 220P.

HEBERT P.D.N., PENTON E.H., BURNS J.M., JANZEN D.H., HALLWACHS W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(41):14812-7.

KIMURA, M.A. (1980). Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.

KUMAR, S.; GADAGKAR, S.R. (2000). Efficiency of the neighbor-joining method in reconstructing deep and shallow evolutionary relationships in large phylogenies. *Journal of Molecular Evolution*, 51: 544-553.

KURIN, R. (2002) The Silk Road: Connecting Cultures, Creating Trust. Talk Story. Fall. Smithsonian Center for Folklife and Cultural Heritage, 21:1–11.

MITA, K.; KASAHARA, M.; SASAKI, S.; NAGAYASU, Y.; YAMADA, T.; KANAMORI, H.; NAMIKI, N.; KITAGAWA, M.; YAMASHITA, H.; YASUKOCHI, Y.; ODUKA, K.K.; YAMAMOTO, K.; AJIMURA, M.; RAVIKUMAR, G.; SHIMOMURA, M.; NAGAMURA, Y.; SHIN-I, T.; ABE, H.; SHIMADA, T.; MORISHITA, S.; SASAKI, T. (2004) The Genome Sequence of Silkworm, *Bombyxmori*. DNA Research, 11:27-35.

MUNHOZ, R.E.F. (2010). Variabilidade genética em raças e híbridos simples de *Bombyx mori* L. do banco de germoplasma da Universidade Estadual de Maringá. Maringá: Universidade Estadual de Maringá. 32p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento).

PORTO, A.J.; OKAMOTO, F.; CUNHA, E.A.; OTSUK, I.P (2004). Caracterização de oito raças de bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). Ciência Rural, Santa Maria, 34(1):259-264.