

AMPLIFICAÇÃO POR PCR DA REGIÃO CONTROLE DO DNA MITOCONDRIAL DE RAÇAS DE *Bombyx mori*

Lis Ribeiro Magalhães de Carvalho¹
 Juliana Pereira Bravo²
 Juliana Silveira do Valle³
 Luciano Seraphim Gasques⁴
 Giani Andrea Linde⁵
 Maria Aparecida Fernandez⁶
 Nelson Barros Colauto⁷

CARVALHO¹, L. R. M.; BRAVO², J. P.; VALLE³, J. S.; GASQUES⁴, L. S.; LINDE⁵, G. A.; FERNANDEZ⁶, M. A.; COLAUTO⁷, N. B. Amplificação por PCR da Região Controle do DNA Mitocondrial de Raças de *Bombyx mori*. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar**, Umuarama, v. 11, n. 1, p. 15-19, jan./jun. 2008.

RESUMO: A sericultura é uma importante atividade agroindustrial no Brasil, sendo o Estado do Paraná responsável por aproximadamente 90% de toda a produção nacional. A localização de marcadores genéticos para o bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) é importante para a diferenciação intra e interespecífica e para o uso em melhoramento genético da espécie, sendo o DNA mitocondrial (DNAm) um dos marcadores genéticos mais utilizados no estudo de insetos. O objetivo deste trabalho foi amplificar a região controle do DNA mitocondrial de quatro raças de *Bombyx mori*, pela técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Obteve-se a amplificação de um fragmento de aproximadamente 750 pb referente à região controle, demonstrando a eficiência da metodologia empregada para a amplificação desta região específica do DNAm de *Bombyx mori*.

PALAVRAS-CHAVE: *Bombyx mori*. Bicho-da-Seda. Lepidoptera. Região Controle. DNA Mitocondrial.

Bombyx mori MITOCHONDRIAL DNA CONTROL REGION AMPLIFICATION BY PCR

ABSTRACT: Sericulture is an important agro industrial activity in Brazil, mainly in Paraná State, that is responsible for 90% of the national production. For the genetic improvement of silkworm (*Bombyx mori* L.), it is necessary to develop techniques to amplify molecular markers in order to use it on genetic analysis. Mitochondrial DNA (mtDNA) has been widely used as a molecular marker for insects and provides suitable markers for studies on genetic variability and molecular characterization. The control region is the major non-coding region of animal mtDNA and has been responsible for providing important evolutionary data about many insect groups. The aim of this paper was to amplify the mtDNA control region of four *Bombyx mori* strains by polymerase chain reaction (PCR). A 750 bp fragment including the control region was amplified showing the efficiency of the methodology to amplify specific regions of the *Bombyx mori* mtDNA.

KEYWORDS: *Bombyx mori*. Silkworm. Lepidoptera. Control Region. Mitochondrial DNA.

AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA REGIÓN CONTROL DEL DNA MITOCONDRIAL DE RAZAS DE *Bombyx mori*

RESUMEN: La sericultura es una importante actividad agroindustrial en Brasil, siendo el Estado del Paraná responsable por aproximadamente 90% de toda la producción nacional. La localización de marcadores genéticos para el gusano de seda (*Bombyx mori* L.) es importante para la diferenciación intra e interespecífica y para el uso en mejoramiento genético de la especie, siendo el DNA mitocondrial (DNAm) uno de los marcadores genéticos más utilizados en el estudio de insectos. El objetivo de esta investigación fue amplificar la región control del DNA mitocondrial de cuatro razas de *Bombyx mori*, por la técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Se obtuvo la amplificación de un fragmento de aproximadamente 750 pb referente a la región control, demostrando la eficiencia de la metodología empleada para la amplificación de esta región específica del DNAm de *Bombyx mori*.

PALABRAS CLAVE: *Bombyx mori*. Gusano de Seda. Lepidoptera. Región Control. DNA Mitocondrial.

¹Bióloga. Universidade Paranaense. E-mail: lileacea@yahoo.com.br

²Bióloga. Doutora em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá. E-mail: jupbravo@gmail.com.

³Profª. MSc. Adjunta do Curso de Farmácia da Universidade Paranaense, Laboratório de Biologia Molecular. Pça Mascarenhas de Moraes, 4282, Umuarama – PR, CEP 87.502-210. E-mail: jsvalle@unipar.br.

⁴Prof. MSc. Adjunto do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Paranaense, Laboratório de Biologia Molecular. Pça Mascarenhas de Moraes, 4282, Umuarama – PR, CEP 87.502-210. E-mail: lsgasques@unipar.br.

⁵Prof. Dra. Adjunta do Curso de Farmácia da Universidade Paranaense, Laboratório de Biologia Molecular. Praça Mascarenhas de Moraes 4282, Umuarama – PR, CEP 87.502-210. E-mail: gianilinde@unipar.br

⁶Profª. Dra. Associada do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia Celular e Genética. Av. Colombo, 5790, Jd. Universitário, Maringá – PR, CEP 87.020-900. E-mail: mafernandez@uem.br

⁷Prof. Dr. Titular do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Paranaense, Laboratório de Biologia Molecular. Praça Mascarenhas de Moraes 4282, Umuarama – PR, CEP 87.502-210. E-mail: nbc@unipar.br

Introdução

A sericicultura é uma importante atividade agroindustrial no Brasil, sendo o Estado do Paraná responsável por aproximadamente 90% de toda a produção nacional (SEAB, 2008). *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae), popular bicho-da-seda, é um inseto que se alimenta exclusivamente das folhas da amoreira e tem como principal característica a capacidade de síntese da proteína da seda (BRANCALHÃO et al., 2002) e, por esse motivo, encontra-se domesticado há mais de cinco mil anos (NAGARAJU; GOLDSMITH, 2002).

O bicho-da-seda pode ser classificado, de acordo com sua origem geográfica, como Japonês, Chinês, Indiano ou Europeu. Esse inseto apresenta diferenças morfológicas e fisiológicas correlacionadas com a produção da seda em função de sua origem e, por isso, raças de procedências diferentes vêm sendo, utilizadas em cruzamentos, denominadas matrizes, como fonte para seleção de caracteres favoráveis à sericicultura (PORTO et al., 2004). No Brasil as raças de bicho-da-seda usadas como matrizes são geralmente de domínio exclusivo de empresas de fiação de seda que, através de institutos de sementagem, realizam a manutenção, melhoramento e hibridação para a produção de ovos, atendendo à demanda anual de lagartas adaptadas às diferentes regiões produtoras.

Atualmente, são necessários investimentos na pesquisa de processos que auxiliem o melhoramento genético do bicho-da-seda, visando principalmente o aumento da produtividade e da qualidade da seda nacional. Dessa forma, é necessário amplo conhecimento sobre as populações de *B. mori* utilizadas no Brasil.

Informações moleculares que podem caracterizar a ocorrência de alterações mutacionais, conhecidas como polimorfismos de DNA, são ferramentas fundamentais para o estudo desses insetos, já que podem fornecer importantes informações sobre processos evolutivos e diferenciação, intra e interespecífica, de características de interesse. Para utilização destas informações, torna-se essencial a identificação e interpretação de marcadores moleculares (VALLE, 1997; LOXDALE; LUSHAI, 1998).

Cerca de 70% dos estudos com marcadores de DNA fazem uso do DNA mitocondrial (DNAm) como ferramenta genética (ZHANG; HEWITT, 2003). Dentre as vantagens do DNAm como marcador molecular pode-se citar a sua transmissão clonal, predominantemente das fêmeas para a prole (AVISE, 1994); tamanho reduzido e simplicidade; reduzido número de mecanismos de variação genética (MORITZ et al., 1987; WOLSTENHOLME, 1992) e maior número de cópias (LOXDALE; LUSHAI, 1998; ROKAS et al., 2003) em relação ao DNA nuclear.

A única grande região não-codificadora do DNAm é denominada Região Controle. Também chamada de D-Loop em vertebrados, é uma região rica em A+T em invertebrados, responsável por fornecer importantes informações evolutivas sobre inúmeros grupos de insetos (TAYLOR et al., 1993; LEWIS et al., 1994; ZHANG; HEWITT, 1997; LESSINGER; AZEREDO-ESPIN, 2000). Por apresentar grande variabilidade genética em insetos, essa região tem sido fonte de marcadores moleculares eficazes no estudo de genética de populações e reconstrução filogenética (TAYLOR et al.,

1993).

O DNAm de alguns insetos já foi completamente seqüenciado, dentre eles o DNAm de quatro raças-matrizes de *Bombyx mori*: (1) Xiafang (LU et al., 2001); (2) Backokjam (LEE et al., 2002); (3) C108 (YUKUHIRO et al., 2002); (4) Aojuku (ITOH et al., 2002). Tais seqüências permitiram determinar o tamanho médio do DNAm de *B. mori* em 15.650 pb.

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é uma ferramenta muito utilizada para amplificar seletivamente regiões específicas da molécula de DNA (INNIS et al., 1995; BROWN, 2003), representando uma ferramenta indispensável para experimentos com marcadores moleculares, por disponibilizar grande quantidade de material genético.

O objetivo deste trabalho foi amplificar a região controle do DNA mitocondrial de quatro raças de *Bombyx mori*, pela técnica de PCR, visando obter material em quantidade e qualidade suficientes para futuros estudos de caracterização e melhoramento genético.

Material e Métodos

Raças de *Bombyx mori*

Neste trabalho foram utilizadas quatro raças de *B. mori*, duas chinesas (C121A e C122B) e duas japonesas (HAA e HAB), usadas como matrizes pela Cooperativa Agroindustrial de Maringá – COCAMAR e cedida à Universidade Estadual de Maringá – UEM. O cruzamento de raças entre si originam as raças puras, conforme Fernandez et al. (2005).

Extração de DNA total

Para cada raça (matriz) foram retirados três pares de glândulas sericígenas, de lagartas de quinto ínstar, para a extração de DNA total. O protocolo utilizado para a obtenção do DNA de glândulas sericígenas foi o descrito por Monesi et al. (1998), com algumas modificações. As glândulas sericígenas de lagartas no terceiro dia do quinto ínstar, previamente armazenadas em isopropanol (-20 °C), foram centrifugadas por aproximadamente 15 s a 14000 rpm, sendo o isopropanol descartado e as glândulas lavadas com solução salina (NaCl 0,7%). Em seguida, descartou-se a solução salina, acrescentando-se 4 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM de NaCl; 1,5% Sacarose; 1 mg/mL de proteinase K) e incubou-se a 50 °C por 3 h. O lisado foi submetido à extração com igual volume de fenol, sendo homogeneizado e centrifugado por 10 min a 14000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, acrescentando-se o mesmo volume de fenol (pH 8,0) e clorofórmio, na proporção de 1:1, repetindo-se o processo de centrifugação e transferência do sobrenadante, acrescentando-se, na segunda vez, igual volume de clorofórmio.

Para a precipitação do DNA, mediu-se o volume do último sobrenadante, acrescentando-se 0,2 M de NaCl. Em seguida, foram acrescentados 0,7% de isopropanol ao volume final. Esta solução foi imersa em nitrogênio líquido e centrifugada a 14000 rpm, a 4 °C por 30 min. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco à temperatura ambiente e ressuspendido em TE (10 mM TRIS-Cl, 1 mM EDTA) pH

8,0. Em seguida procedeu-se digestão com RNase (100 µg/mL) a 37 °C por 30 min e extração com fenol/clorofórmio e clorofórmio, conforme descrito anteriormente. Repetiu-se o processo de precipitação, ressuspensão do DNA em 1,5 mL de TE pH 8,0 e armazenando-o a -20 °C. A concentração aproximada de DNA em cada amostra, bem como o grau de pureza do DNA obtido, foi determinada por espectrofotometria.

Amplificação da região controle mitocondrial

Foram desenvolvidos iniciadores específicos para a amplificação da região controle. Os iniciadores foram sense 5'-ATAACCGCAACTGCTGGCAC-3' e antisense 5'-GCTTTTGGGCTCATACCTC-3', com base na seqüência completa do DNA mitocondrial de *B. mori* (LEE, et al. 2002). Utilizou-se, para ancoragem dos iniciadores, os genes 12S rDNA e tRNA-Metionina, flanqueadores da região controle.

A reação de amplificação foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,5 mM de iniciador sense, 0,5 mM de iniciador antisense, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®) e 25 ng de DNA molde. Os ciclos de amplificação foram executados em termociclador (Eppendorf®) segundo Lessinger; Azeredo-Espin (2000), que correspondem a 30 s a 94 °C, 1 minuto a 58 °C e 2 min a 60 °C, por um total de 30 ciclos, seguidos por um ciclo final a 60 °C cuja elongação foi estendida por 10 min.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,6%, corado com brometo de etídio. Como marcador de tamanho molecular, utilizou-se o padrão 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®).

Resultado e Discussão

A metodologia de amplificação empregada mostrou-se adequada, produzindo quantidade e qualidade de DNA. Os iniciadores desenvolvidos mostraram-se eficientes em produzir um amplicon referente à região controle do DNAm das diferentes raças de *B. mori* analisadas. Por comparação com o padrão de tamanho molecular 1Kb Plus DNA Ladder, estimou-se o tamanho da região amplificada em aproximadamente 750 pb (Figura 1).

Dados de sequenciamento do DNA mitocondrial de raças de *B. mori*, encontrados na literatura, demonstram que o tamanho da região controle variou de 494 pb a 499 pb (LU et al., 2001; ITOH et al., 2002; LEE et al., 2002; YUKUHIRO et al., 2002; PAN et al., 2008), diferindo do fragmento amplificado neste estudo, cujo tamanho foi estimado em cerca de 750 pb (banda entre 650 pb e 850 pb) (Figura 1). Arunkumar et al. (2006) amplificaram a região controle de duas raças indianas de *B. mori* e obtiveram um fragmento de 689 pb.

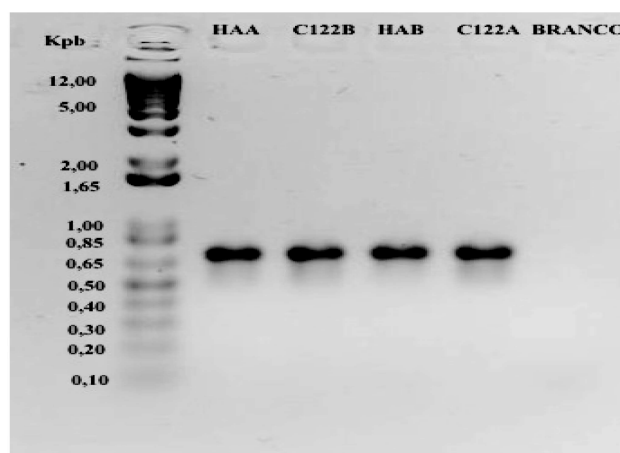


Figura 1. Gel de agarose (1,6%) da região amplificada do DNA mitocondrial da glândula sericígena de lagartas das raças (matrizes) de *Bombyx mori* HAA, C122B, HAB e C122A. A coluna sem indicação representa o DNA Ladder (1Kb Plus) e a coluna “BRANCO” representa o controle negativo.

Sabe-se que o tamanho da região controle de insetos varia consideravelmente entre diferentes taxas e, algumas vezes, dentro da mesma espécie. Diferenças de tamanho entre taxas próximas ocorrem principalmente pela presença de elementos repetitivos na região controle mitocondrial, enquanto pequenas inserções/deleções têm papel menor na variação de tamanho intraespecífica (ZHANG et al., 1997). Pela Figura 1 observa-se que não houve diferença no tamanho do segmento amplificado entre as raças analisadas de *B. mori*, sugerindo que a região controle dessas raças não apresenta variações extensas. Isto é um indicativo de que as raças utilizadas como matrizes no Brasil têm pouca variação de tamanho da região controle mitocondrial, apesar de apresentarem origens geográficas distintas, o que dificulta sua distinção apenas pelo tamanho da região controle. Segundo Arunkumar et al. (2006) a amplificação da região controle de raças indianas de *B. mori* e de outras espécies da superfamília Bombycidae gerou polimorfismo de tamanho, quando comparada a diferentes espécies e gêneros. Contudo não se observou diferença entre raças da mesma espécie. Outros estudos com análises moleculares, como sequenciamento de DNA ou PCR-RFLP, são necessários para proporcionar mais informações sobre o nível de conservação da seqüência nucleotídica da região controle do DNAm de *B. mori*.

Diferenças de tamanho também podem ocorrer devido à ancoragem diferencial dos iniciadores de amplificação empregados nos genes 12S rDNA e tRNA-Metionina, flanqueadores da região controle, que foram parcialmente amplificados, juntamente com a região controle.

As seqüências desses genes podem ser removidas do tamanho molecular total, ao empregar-se a técnica de sequenciamento do DNA, definindo com maior exatidão o número de pares de base na seqüência da região controle das raças de *B. mori* analisadas.

Conclusão

A metodologia e os iniciadores adotados são eficientes para amplificar em quantidade e qualidade a região controle do DNAm de raças de *Bombyx mori*.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Paranaense – Unipar -, à Universidade Estadual de Maringá – UEM, ao CNPq e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro; e à Cooperativa Agroindustrial de Maringá – COCAMAR pelas raças (matrizes) de *Bombyx mori* utilizadas neste experimento.

Referências

ARUNKUMAR, K. P. et al. Molecular phylogeny of silkworms reveals the origin of domesticated silkworm, *Bombyx mori* from Chinese *Bombyx mandarina* and paternal inheritance of *Antheraea proylei* mitochondrial DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 40, p. 419-427, 2006.

AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. Nova Iorque: Chapman & Hall, 1994. 510 p.

BRANCALHÃO, R. M. C.; TORQUATO, E. F. B.; CASTRO, M. E. B. Identificação de um isolado de *Bombyx mori* multiple nucleopolyhedrovirus no Estado do Paraná, Brasil. **Embrapa Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Brasília, v. 33, n. 1340, p. 5-12, 2002.

BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 365 p.

FERNANDEZ, M. A. et al. A utilização da biotecnologia na sericultura brasileira. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 35, p. 52-57, 2005.

INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J. **PCR strategies**. San Diego: Academic Press, 1995. 550 p.

ITOH, M. et al. ***Bombyx mori* mitochondrial DNA, complete genome, strain**: Aojuku. 2002. GenBank, nº de acesso: AB083339. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=20126707>>. Acesso em: 20 Nov. 2005.

LEE, J. S. et al. ***Bombyx mori* mitochondrion, complete genome**. 2002. GenBank, nº de acesso: AF149768. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=8163611>>. Acesso em: 20 Nov. 2005.

LESSINGER, A. C.; AZEREDO-ESPIN, M. L. Evolution and structural of mitochondrial DNA control region of myiasis-causing flies. **Medical Veterinary Entomology**, v. 14, p. 71-80, 2000.

LEWIS, D. L. et al. Sequence, organization and evolution of the A+T region of *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA. **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, n. 3, p. 523-538, 1994.

LOXDALE, H. D.; LUSHAI, G. Molecular markers in entomology. **Bulletin of Entomological Research**, v. 88, p. 577-600, 1998.

LU, C. et al. ***Bombyx mori* strain Xiafang mitochondrion, complete genome**. 2001. GenBank, nº de acesso: AY048187. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=15213107>>. Acesso em: 20 Nov. 2005.

MONESI, N.; JACOBS-LORENA, M.; PACO-LARSON, M. L. The DNA puff gene BhC4-1 of *Bradysia hygida* is specifically transcribed in early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. **Chromosoma**, v. 107, n. 8, p. 559-569, 1998.

MORITZ, C.; DOWLINGS, E.; BROWN, W. M. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 269-292, 1987.

NAGARAJU, J.; GOLDSMITH, M. R. Silkworm genomics: progress and prospects. **Current Science**, v. 38, n. 2, 2002.

PAN, M. et al. Characterization of mitochondrial genome of Chinese wild mulberry silkworm, *Bombyx mandarina* (Lepidoptera: Bombycidae). **Science in China Series C: Life Sciences**, v. 51, n. 8, p. 693-701, 2008.

PORTO, A. J. et al. Caracterização de oito raças de bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p.259-264, 2004.

ROKAS, A.; LADOUKAKIS, E.; ZOUROS, E. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, n. 8, 2003.

SEAB - SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO DO PARANÁ: Governo libera R\$ 2,7 milhões para melhorar produção de bicho-da-seda. Disponível em: (<<http://www.seab.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=3834>>). Acesso em: 24 ago. 2008.

TAYLOR, M. F. J. et al. The lepidopteran mitochondrial control region: structure and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, n. 6, p. 1259-1272, 1993.

VALLE, J. S. **Análise da variabilidade genética de *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): avaliação através do DNA mitocondrial e análise cariotípica**. 1997. 90 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

WOLSTENHOLME, D. R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. **International Review of Cytology**, v. 141, p. 173-216, 1992.

YUKUHIRO, K. et al. Significant levels of sequence divergence and gene rearrangements have occurred between the mitochondrial genomes of the wild mulberry silkworm, *Bombyx mandarina*, and its close relative, the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 8, p. 1385-1389, 2002.

ZHANG, D. X.; HEWITT, G. M. Insect mitochondrial control

region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, n. 2, p. 99-120, 1997.

ZHANG, D. X.; HEWITT, G. M. Nuclear DNA analyses in genetic studies of population: practice, problems and prospects. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 563-568, 2003.

Recebido em: 02/04/2008

Aceito em: 26/09/2008