

CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE UM FRAGMENTO GÊNICO, OBTIDO POR AFLP, DE UMA PROVÁVEL CICLINA DE *Boophilus microplus* RESISTENTES A CARRAPATICIDAS

CLONING AND SEQUENCING OF A PUTATIVE CYCLIN FRAGMENT GENE FROM Boophilus microplus RESISTANT TO ACARICIDES

Guilherme Rocha LINO¹; Luiz Ricardo GOULART²

RESUMO: O controle do carrapato bovino é um dos principais problemas enfrentados pela pecuária e pela Indústria Química de produtos veterinários devido a crescente resistência, observada no campo, dos carrapatos aos carrapaticidas, gerando um grande impacto econômico na indústria brasileira de carne e leite. A técnica do AFLP para identificar regiões genômicas polimórficas candidatas a marcadores genéticos relacionados a resistência de carrapatos a carrapaticidas, foi utilizada para demonstrar perfis eletroforéticos de DNA únicos nos indivíduos resistentes. As bandas polimórficas foram purificadas e os fragmentos foram clonados e seqüenciados. As seqüências foram anotadas e demonstraram um alto grau de homologia com o gene de uma ciclina encontrado na soja (*G. max*), sugerindo que este gene poderia estar relacionado ao processo de ciclo celular da larva do carrapato, visto que os testes de resistência e a seleção de indivíduos resistentes e sensíveis foram feitos na fase larval deste parasita.

UNITERMOS: *Boophilus microplus*, Resistência, Ciclina.

Em um programa de controle de carrapato é desejado detectar precocemente genótipos resistentes a determinada droga carrapaticida, permitindo tomar medidas mais corretas no controle deste parasita. Alguns mecanismos de resistência já são conhecidos como resistência a piretróides, atuando na membrana das células nervosas, mudando sua permeabilidade aos íons Sódio e Potássio (SPINOSA et al., 1999). O conhecimento de novos genes e a determinação de marcadores moleculares relacionados à resistência de carrapatos a carrapaticidas permite uma rápida identificação destes genótipos, comparada aos tradicionais métodos utilizados, auxiliando na tomada de decisão para um melhor e mais eficaz método de controle. Neste experimento, foi utilizada a técnica AFLP descrita por Vos et al. (1995) que permite determinar diferenças genéticas entre os indivíduos. Esta técnica baseia-se no polimorfismo resultante de mutações de ponto, inversões, deleções e inserções, que levam à perda ou ganho de sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas utilizadas ou na alteração da seqüência reconhecida pelos nucleotídeos arbitrários nas extremidades 3' dos primers

seletivos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Esta técnica foi utilizada neste trabalho com o objetivo de identificar, clonar e sequenciar possíveis marcadores genéticos relacionados com a resistência de carrapatos a carrapaticidas piretróides, com a finalidade de utilizar estes marcadores em possíveis programas de identificação e controle do carrapato bovino. **Material biológico utilizado:** Larvas de carrapato foram coletadas e submetidas ao teste padrão de resistência (Larval Packet Test), recomendado pela FAO (KEMP et al., 1998), com duas bases químicas: Deltametrina e Cipermetrina. Aproximadamente 100mg de larvas resistentes e sensíveis aos piretróides testados foram utilizadas para extração de DNA. O DNA genômico foi obtido por extração com fenol-clorofórmio, descrito por Sambrook et al. (1989). As larvas foram pulverizadas com nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão de lise, o DNA foi extraído com fenol, tratado com clorofórmio e precipitado com isopropanol absoluto. **Reação de AFLP:** Foi realizada segundo Lino (2001), para a seleção dos marcadores a serem utilizados nas reações de clonagem e sequenciamento. **Clonagem:** As bandas polimórficas,

¹ Engenheiro Agrônomo, M.Sc. Universidade Federal de Uberlândia

² Professor titular, Pós-Doutorado, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia

Received: 18/09/02

Accept: 29/01/03

únicas nos indivíduos resistentes foram recortadas e purificadas do gel. O fragmento foi ligado ao vetor de clonagem utilizando o Kit SureClone Ligation (Pharmacia). A cepa de *E. coli* utilizada para a transformação foi a DH5á competente e o método utilizado para a transformação foi choque térmico (SAMBROOK et al., 1989). As células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (70µg/ml), X-Gal (20mg/ml), IPTG (200mg/ml) e incubadas a 37°C por 20h. Transformantes brancos foram identificados e utilizados para a extração de plasmídeos, a qual foi realizada pelo método de lise das células por fervura em água (SAMBROOK et al., 1989). **Reação de sequenciamento em microtubos:** Plasmídeos recombinantes foram seqüenciados utilizando o kit Thermo Sequenase Cy5.5 Dye Terminator Cycle Sequencing (Pharmacia) e o primer M13 Forward 5'-GTTTCCAGTCACGACGTTGTA-3'. Um pré-aquecimento de 90°C do termociclador foi feito antes de colocar as amostras para o sequenciamento, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30s; 60°C por 30s e 72°C por 1 min. A leitura foi feita no seqüenciador Automated Laser Fluorescent EXPRESS (Pharmacia) com o Software

apropriado para análise dos dados. Foram utilizados para a análise da identidade dos fragmentos seqüenciados, bancos de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) e European Molecular Biology Laboratory (EMBL) (<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/>). O programa BLASTn foi usado para o alinhamento das seqüências do carrapato com outras já depositadas nestes bancos de dados. Um fragmento de 333 pb foi seqüenciado e foi observado, dentro das seqüências analisadas, uma identidade superior a 80% com uma ciclina descrita na soja (*G. max*), quando comparado no GenBank e EMBL (Figura 1). Este gene, talvez esteja relacionado com a intensa divisão e diferenciação celular, características da fase larval do carrapato. Faz-se necessário então, experimentos que confirmem esta hipótese e uma investigação de possíveis mutações neste gene, diferenciando-o dos indivíduos sensíveis, pois este fragmento só foi observado em indivíduos resistentes a piretróides. Estas informações sugerem a existência de um novo candidato a marcador genético relacionado com a resistência e poderão auxiliar possíveis trabalhos na tentativa de desenvolver drogas para o controle do carrapato bovino *Boophilus microplus*.

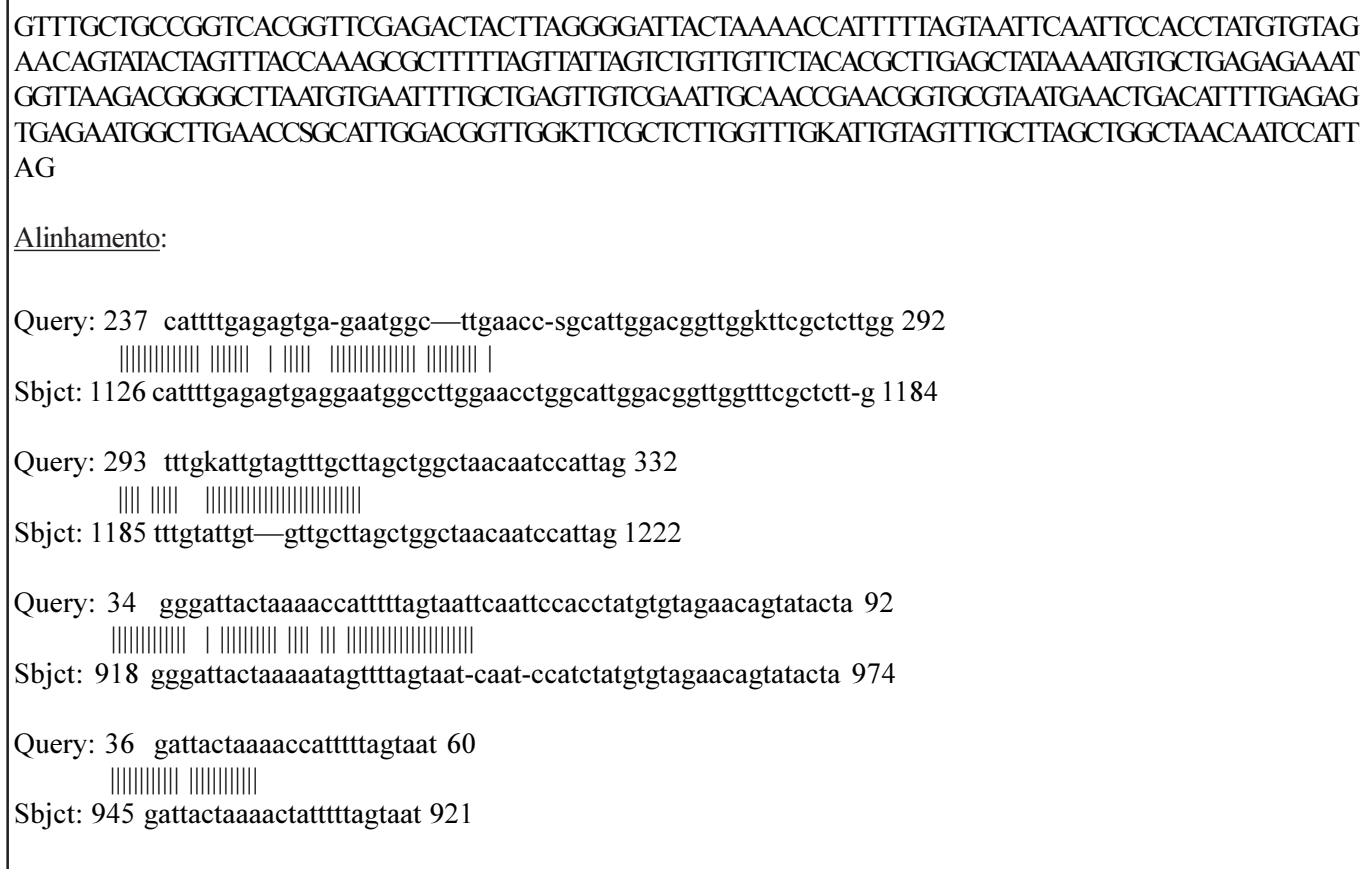


Figura 1. Seqüência obtida de um fragmento AFLP polimórfico de 333 pb único nos indivíduos resistentes a Cipermetrina e Deltametrina e alinhamento em Banco de dados

ABSTRACT: Tick control is one the most important problems for cattle farmers and also for chemical industries, due to the increased acaricide field resistance of ticks, a parasite that has great economic impact on Brazilian meat and dairy industry. An AFLP technique, to identify candidate polymorphic genomic regions for genetic markers related to acaricide resistance, was used to demonstrate DNA electrophoretic profiles that were unique in resistant individuals. The polymorphic bands were purified, cloned and sequenced. The sequence was annotated and had a high degree of homology to a cyclin gene found in *Glycine max*, suggesting that this gene could be involved in cellular cycle processes in the larvae phase, since the resistant test was performed on larvae samples.

UNITERMS: *Boophilus microplus*, Acaricide resistance, Cyclin

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: Embrapa/Cenargem, 1998. 220 p.

KEMP, D. H.; THULLNER, R.; GALE, K. R.; SABATINI, G. A. Acaricide Resistance in Cattle –tick *Boophilus microplus* and *B. decoloratus*: Review of resistance data; Standartisation of Resistance Tests and Recommendations for integrated parasite control to delay resistance. In: REPORT to the animal health services. Indooroopilly: AGAH/FAO, 1998. p. 13-14.

LINO, G. R. **Variabilidade genética de marcadores AFLP em populações de carrapato (*Boophilus microplus*) induzida por carrapaticidas**. 2001. 65 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2001.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SPINOSA, H. S; GORNIK, S. L.; BERNADI, M. M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 360p.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.