

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**LAYS SOARES GONÇALVES**

**UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE HIGH RESOLUTION MELTING (HRM) PARA  
IDENTIFICAÇÃO DE DIFERENTES HAPLÓTIPOS DE *Varroa destructor*.**

**São Gabriel  
2015**

**LAYS SOARES GONÇALVES**

**UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE HIGH RESOLUTION MELTING (HRM) PARA  
IDENTIFICAÇÃO DE DIFERENTES HAPLÓTIPOS DE *Varroa destructor*.**

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Pampa — UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo

**São Gabriel  
2015**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

G643u Gonçalves, Lays Soares  
Utilização da técnica de High Resolution Melting (HRM) para  
identificação de diferentes haplótipos de Varroa destructor. /  
Lays Soares Gonçalves.  
35 p.  
  
Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade  
Federal do Pampa, BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA, 2015.  
"Orientação: Juliano Tomazzoni Boldo".  
  
1. Varroa destructor. 2. Apis mellifera. 3. High Resolution  
Melting (HRM). I. Título.

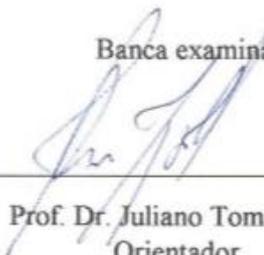
**LAYS SOARES GONÇALVES**

**UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE HIGH RESOLUTION MELTING (HRM) PARA IDENTIFICAÇÃO DE DIFERENTES HAPLÓTIPOS DE *Varroa destructor*.**

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Pampa — UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

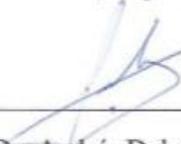
Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 22 de janeiro de 2015.

Banca examinadora:



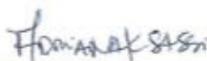
---

Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo  
Orientador  
(Unipampa)



---

Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo (Unipampa)



---

Dr.ª Adriana Sassi (Unipampa)

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Juliano Boldo, pela paciência, dedicação, disponibilidade, ensinamentos e, principalmente, pela amizade. É um sentimento singular ser guiada por alguém que me incentiva e me apoia.

Ao Prof. Dr. Andrés Cañedo, pelos ensinamentos, paciência e incentivo. Pela grande ajuda para a realização deste trabalho. Foi gratificante a oportunidade de aprendizado atual.

À minha Mãe Vidalina e Irmã Andréa, pelo apoio e amor incondicional. Pela compreensão em momentos difíceis e pelo suporte e animo que me foi dado em todos os momentos.

Às minhas amigas e companheiras Mariele, Camila, Jéssica e Darlene que caminharam ao meu lado, compartilharam comigo momentos de angústia e alegrias, compreenderam meus momentos difíceis e disponibilizaram um pouco do seu tempo para me incentivar e apoiar sempre.

Aos meus colegas de laboratório que estiveram sempre dispostos a ajudar.

Aos demais professores pelos ensinamentos aplicados em aula e pela dedicação.

À Deus pela coragem e força durante toda esta caminhada.

E a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

“Foi o tempo que você dedicou à sua rosa, que a fez tão importante.”

Antoine de Saint-Exupéry

## RESUMO

O ácaro *Varroa destructor* distribuiu-se pelo mundo parasitando abelhas da espécie *Apis mellífera*; e atualmente é considerado a principal ameaça para a apicultura. Ele é responsável pelos sintomas clínicos da varrose. Estudos sobre a variabilidade genética do ácaro *V. destructor*, demonstraram que a virulência da varrose também está relacionada a diferentes haplótipos do ectoparasito. Com base na sequência do gene da citocromo C oxidase (COI) presente no DNA mitocondrial, pesquisadores dividiram *Varroa jacobsoni* em duas espécies: *V. jacobsoni* e *V. destructor*. Mesmo dentro da espécie *V. destructor*, existem variações na sequência do gene supracitado, o que permite a diferenciação da espécie nos haplótipos Japonês (J) e Coreano (K). Esta diferenciação não é apenas genética, mas também em grau de virulência. O haplótipo K tende a ser mais virulento que o haplótipo J, fato importante para futuros programas de monitoramento e possível controle do ácaro. É possível observar a diferenciação dos haplótipos pela clivagem dos produtos de amplificação do gene COI. Ambos os haplótipos possuem sítio de clivagem para a enzima XhoI, mas apenas o haplótipo J possui sítio para a enzima SacI. Contudo, o tempo necessário para análise é alto, mostrando-se inapropriado quando analisamos várias amostras simultaneamente. Assim, propomos a utilização da técnica de High Resolution Melting (HRM), que visa distinguir estes polimorfismos observando-se a curva de desnaturação da dupla fita de DNA. Este trabalho tem como objetivo estabelecer a técnica de HRM para identificação dos dois haplótipos citados, comparando-a com a metodologia padrão utilizada. As sequências de DNA do gene COI de *V. destructor* foram selecionadas em função das regiões polimórficas dos haplótipos J e K; os fragmentos selecionados foram sintetizados artificialmente (gBlocks, Integrated DNA Technologies). A partir destas sequências foram desenhados *primers* para HRM e para reações de clivagem. Os fragmentos artificiais foram submetidos à reação de PCR para padronização das condições experimentais, utilizando *primers* para HRM e para posterior clivagem. Após a reação de PCR, os fragmentos amplificados foram submetidos a reação de clivagem com as enzimas de restrição SacI e XhoI. Após a padronização, procedemos para as reações de clivagem utilizando as enzimas de restrição SacI e XhoI tanto para os produtos de amplificação oriundos das amostras de DNA sintético quanto para de DNA de varroas amostradas em colmeias de *A. mellífera*. Os resultados obtidos foram observados por eletroforese em gel de agarose. Após, as amostras foram submetidas a reação de HRM. Observamos que houve a amplificação dos amplicons com o tamanho e com o padrão de clivagem esperados. Também foi identificado o haplótipo da amostra ambiental, que foi classificado como haplótipo K. Na análise de HRM, as duas amostras que compreendem a variante 2 (K) demonstram um comportamento padrão, com

curvas de desnaturação semelhantes, diferenciando-se apenas na intensidade. Concluímos que este método pode ser potencialmente utilizado para as análises de segregação dos haplótipos K e J. A partir do uso desta técnica a análise torna-se mais rápida e precisa, podendo ser utilizada em projetos de avaliação de distribuição de haplótipos, cujos resultados podem ser utilizados para o monitoramento de infestações e o controle deste parasito.

Palavras-chave: *Varroa destructor*, *Apis mellifera*, haplótipos, HRM, varrose.

## ABSTRACT

The *Varroa destructor* mite has spread worldwide parasitizing bees of the species *Apis mellifera*, and is currently considered the major threat to beekeeping. It is responsible for the clinical symptoms of varrose. Studies on the genetic variability of *V. destructor* mite showed that the virulence of varrose is also related to different haplotypes of the ectoparasite. Based on the sequence of the cytochrome C oxidase gene (COI) present in the mitochondrial DNA, researchers divided *Varroa jacobsoni* into two species: *V. jacobsoni* and *V. destructor*. Even within the species *V. destructor*, there are variations in the sequence of the above-cited gene, which allows differentiation of the species Japanese haplotypes (J) and Korean (K) haplotypes. Such differentiation is more than a genetic trait. Both haplotypes differ in their virulence, as the K haplotype is more virulent than J haplotype. It is possible to identify the haplotypes with PCR reaction followed by cleavage reaction. Both COI gene amplicons have cleavage site for XhoI enzyme, but only the J haplotype has cleavage site for the SacI restriction enzyme site for the enzyme. However, the time required in this technique is high, and hampers high-throughput analysis. Therefore, we propose the use of High Resolution Melting technique (HRM), which aims to distinguish these polymorphisms observing the denaturation curve of double-stranded DNA, for fast and large-scale analysis. This study aims to establish the HRM technique in order to distinguish the K and J haplotypes, and compare the results with the standard method used. The DNA sequences of the *V. destructor* COI gene were selected based on haplotype of polymorphic regions J and K; the selected fragments were synthesized artificially (gBlocks, Integrated DNA Technologies). From these sequences, primers were designed for HRM and cleavage reactions. Artificial fragments were subjected to PCR for standardization of experimental conditions using primers for HRM and subsequent cleavage. After the PCR reaction, the amplified fragments were subjected to cleavage reaction with SacI and XhoI restriction enzymes. After standardization, cleavage reactions were conducted using the restriction enzymes SacI and XhoI for both amplification products from the synthetic DNA and environmental samples. The results obtained were observed by electrophoresis in agarose gel. After, the samples were subjected to HRM. The resulting amplicons presented the expected size and cleavage pattern. Was also identified the environmental sample haplotype, which has been identified as K haplotype. In HRM haplotype analysis, the two samples comprising the variant 2 (K) showed the same melting curve pattern, differing only in the intensity. We conclude that this method could potentially be used for *V. destructor* haplotypes J and K identification. This

technique improves the current method for J and K haplotypes identification, rendering a more fast and precise method, which can be used for *V. destructor* monitoring and control programs.

Keywords: *Varroa destructor*, *Apis mellifera*, haplotypes, HRM, varrose.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Padronização dos <i>primers</i> utilizados para análise de haplótipos por clivagem e HRM. .....	25
Figura 2 - Padronização dos <i>primers</i> utilizados para análise de haplótipos por HRM. ....	26
Figura 3 - Identificação dos haplótipos J e K de amostras de DNA sintéticas do gene COI. ..	27
Figura 4 - Identificação dos haplótipos J e K de amostra ambiental de <i>V. destructor</i> . ....	28
Figura 5 - Desenho esquemático dos primers utilizados na análise de HRM nos haplótipos J e K. ....	29
Figura 6 - Análise de dissociação de alta resolução (HRM) de amostras sintéticas e ambiental. .....	30

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR e clivagem. ....	22
--	----

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

°C – Graus Celsius

min – minutos

s – segundos

μL – micro litros

## LISTA DE SIGLAS

COI – Citocromo C Oxidase I

HRM – *High Resolution Melting*

J – Japonês

K – Coreano

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

mtDNA – DNA mitocondrial

SNPs – Polimorfismos de Base Única

T<sub>m</sub> – Temperatura de *Melting*

pb – pares de bases

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1. <i>Varroa destructor</i> .....	16
1.2. Haplótipos J e K.....	17
1.3. Análise de dissociação em alta resolução (HRM) .....	18
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	18
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	21
3.1. Objetivo Geral.....	21
3.2. Objetivos Específicos .....	21
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	22
4.1. Seleção das sequencias de DNA a serem utilizadas .....	22
4.2. Desenho de <i>primers</i> .....	22
4.3. Reação em Cadeia da polimerase (PCR) .....	23
4.4. Clivagem .....	23
4.5. <i>High Resolution Melting</i> (HRM) .....	23
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
5.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	25
5.2. Clivagem .....	26
5.3. <i>High Resolution Melting</i> (HRM).....	26
<b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	32
6.1. Conclusões .....	32
6.2. Perspectivas .....	32
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	33

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Varroa destructor*

*Varroa destructor* é um ácaro ectoparasita de abelhas, que originalmente tinha como hospedeiro abelhas da espécie *Apis cerana* e era restrito à região asiática. Devido à prática de apicultura migratória e trânsito de rainhas e/ou colmeias infestadas, o ácaro foi levado a outras regiões do globo durante a primeira metade do século passado e passou a ocupar um novo nicho, parasitando abelhas da espécie *Apis mellifera*. A partir deste contato, o parasita se dispersou por todo o mundo e é atualmente considerado a principal ameaça para a apicultura. Alguns fatores, como as mudanças climáticas e a presença de inseticidas, são capazes de interferir na atividade normal das abelhas, pois podem causar a diminuição do número de indivíduos nas colônias. Essas condições desfavoráveis geram estresse nos indivíduos, levando a um enfraquecimento no seu sistema imunológico e permitindo condições favoráveis ao desenvolvimento de patógenos e parasitos nas abelhas que podem causar sérios problemas (ROSENKRANZ, AUMEIER & ZIEGELMANN, 2010).

O ácaro é considerado um fator crucial para os números decrescentes de polinizadores naturais, fato que pode trazer problemas futuros para a polinização de diversos cultivares. Uma das principais razões para assegurar a manutenção de populações viáveis de abelhas é a sua importância como agentes polinizadores de muitas espécies de plantas cultivadas e silvestres. O ácaro *V. destructor* é responsável pelos sintomas clínicos da varrose em *A. mellifera*. Danos causados pela varrose são um dos principais motivos para as perdas periódicas de colônias. Em países da Europa e nos Estados Unidos tratamentos regulares para *V. destructor* são essenciais para evitar uma perda de um número ainda maior de colônias. Os problemas com este ácaro são mais graves em regiões de clima temperado, que têm abelhas de origem europeia (DE JONG & GONÇALVES, 1998). Uma alta mortalidade devido a este ácaro tem sido relatada em colônias de abelhas europeias em muitos países da Europa, Ásia e América do Norte (BAILEY AND BALL, 1991). No entanto, em regiões tropicais do Brasil, onde há as abelhas africanizadas, o efeito do ácaro sobre as colônias de ácaros parece ser reduzida ao ponto em que não são necessárias medidas de controle e não há perdas de colônias em números tão elevados quanto na Europa (DE JONG & GONÇALVES, 1998; MORETTO, GONÇALVES & DE JONG, 1991). Diferentes fatores contribuem para o crescimento da população de ácaros, o que eventualmente pode levar ao colapso da colônia (BOOTA, CARMENATE & DE LA TORRES, 2004).

Os efeitos causados dependem do grau de infestação alcançado pelo ácaro e compreendem desde o enfraquecimento até a morte das colônias de abelhas (MORETTO, GONÇALVES & DE JONG, 1991). Entre os principais sintomas está a redução do peso e da longevidade das operárias e zangões, comprometendo a população do enxame (DE JONG & GONÇALVES, 1998; DUAY, DE JONG & ENGELS, 2003). Existem, ainda, casos em que a infestação acarreta má formação em diversos órgãos, como asas, pernas, abdome e tórax e redução da viabilidade de cria (AKRATANAKUL & BURGETT, 1975). Segundo Ball e Allen (1988), o ácaro também pode servir como vetor ao transmitir bactérias e vírus pela sucção da hemolinfa e ocasionar várias doenças. Considerando que o ácaro *V. destructor* (ANDERSON & TRUEMAN, 2000) recentemente iniciou o parasitismo nas abelhas da espécie *Apis mellifera*, considerando o tempo de coevolução destas espécies, a praga varrose tornou-se um dos principais problemas da apicultura em todo o mundo, uma vez que a nova espécie parasitada não possui comportamento higiênico adequado para defender-se do parasita (BOOTA, CARMENATE & DE LA TORRES, 2004).

## 1.2. Haplótipos J e K

Estudos sobre a variabilidade genética do ácaro *V. destructor* demonstraram que a virulência da varrose também está relacionada a diferentes haplótipos de *Varroa* (KRAUS & HUNT, 1995; ANDERSON & FUCHS, 1998; DE GUZMAN & RINDERER, 1999; WARRIT et al., 2004; SOLIGNAC et al., 2003, 2005). Segundo Anderson e Trueman (2000), pelo menos nove haplótipos estão descritos, todos parasitando *A. cerana*. Com base nas sequências do gene da Citocromo C Oxidase (COI) analisados no DNA mitocondrial (mtDNA), Anderson e Trueman (2000) dividiram *Varroa jacobsoni* em duas espécies: *Varroa jacobsoni* e *Varroa destructor*. A variação no Citocromo C Oxidase existe mesmo dentro da espécie *V. destructor*; e com base nesta variação foram descritos dois haplótipos: o haplótipo Coreano (K) e Japonês (J), que tornaram-se amplamente distribuídos em *A. mellifera*. A diferenciação de haplótipos é importante para futuros programas de controle do ácaro, uma vez que tais haplótipos possuem graus de virulência diferentes, sendo o haplótipo K mais agressivo que J.

A identificação dos haplótipos Japonês e Coreano do ácaro *V. destructor* foi realizado com base em produtos de digestão com enzimas de restrição XhoI e SacI. Ambos os haplótipos têm o local de clivagem para a enzima XhoI, mas apenas o haplótipo Japonês mostra clivagem pela enzima SacI (ANDERSON & FUCHS, 1998).

É interessante observarmos as diferenças entre esses dois haplótipos através de análises que identifiquem diferenças em polimorfismos de base única (SNPs), que são uma variação na sequência de DNA que afeta somente uma base. Devido à ampla utilização de SNPs como marcadores de mutação, a técnica de High Resolution Melting (HRM), que visa distinguir estes SNPs, tem sido desenvolvida e disponibilizada (SOUZA & FALCÃO, 2012).

### **1.3. Análise de dissociação em alta resolução (HRM)**

A análise de dissociação em alta resolução (*High Resolution Melting* - HRM) é um método utilizado para detectar alterações na sequência do DNA. Esse método foi introduzido em 2002 através da colaboração entre a academia (Universidade de Utah, UT, EUA) e a indústria (Idaho Technology, UT, EUA) (REED, KENT & WITTWER, 2007).

O HRM é um método simples, rápido e de baixo custo para identificar mutações. Sua vantagem é o fato de que a amplificação de PCR e a análise de curva de dissociação são realizadas dentro do mesmo tubo, sem qualquer processamento pós-PCR, o que resulta em menor risco de contaminação das amostras. Essa técnica é baseada na análise computacional de DNA, através do controle da mudança da fluorescência que resulta de uma liberação progressiva de um corante de ligação ao DNA em função da temperatura a medida que a dupla fita for sendo desnaturada (NORAMBUENA et al., 2009).

Após a amplificação do DNA, uma curva de dissociação é gerada e, para isso, a amostra é aquecida ao longo de um gradiente de temperatura, enquanto a fluorescência é continuamente coletada. Conforme a temperatura é elevada, a fluorescência decresce, refletindo a desnaturação do DNA em fitas simples. A partir da curva de dissociação, a temperatura de dissociação ( $T_m$ ) da amostra pode ser obtida, a qual é definida como a temperatura em que 50% de cada molécula de DNA está desnaturada (REED, KENT & WITTWER, 2007).

Os marcadores têm sido desenvolvidos com a propriedade de uma maior fluorescência quando ligados ao DNA fita dupla do que na forma de fita simples. A temperatura na qual os fragmentos de DNA fita dupla se separam em componentes individuais de fita simples é extremamente sensível à sequência dos nucleotídeos constituintes. Isto é referido em como a temperatura de fusão se comporta e pode ser usada para identificar a presença de uma mutação em um fragmento amplificado de DNA (CUI et al., 2013).

Em resumo, esta técnica, utilizando um corante fluorescente de ligação ao DNA, permite

a genotipagem, sem a necessidade de sondas marcadas, dependendo da capacidade de gravar e avaliar intensidades de fluorescência. A obtenção de curvas de dissociação com alta resolução é possível devido à utilização de fluoróforos intercalantes saturantes, que não inibem a PCR mesmo presentes em altas concentrações, e de instrumentos com altas taxas de aquisição de dados (REED, KENT & WITWER, 2007).

O perfil de dissociação de um produto de PCR depende de seu conteúdo GC, do comprimento do fragmento, da sequência de nucleotídeos e da heteroziguidade. A análise HRM é baseada na diferença entre a forma das curvas de dissociação e na diferença entre valores de  $T_m$  das amostras. A  $T_m$  de um produto de PCR é uma medida conveniente, porém é apenas um ponto da curva de dissociação (GRAHAM et al., 2005).

Finalmente, os produtos de PCR amplificados que diferem no único nucleotídeo para cada resultado de SNP em diferentes curvas de fusão podem ser identificados. Diferentes genótipos são identificados pelo  $T_m$  (LIEW et al., 2004; PALAIS, LIEW & WITTER, 2005) ou pelas diferenças na curva de fusão (GRAHAM et al., 2005). Uma vez que esta técnica tem se mostrado bastante sensível e eficiente, a análise com HRM é altamente adequada para a detecção de variações de uma única base e pequenas inserções ou deleções.

Tendo em vista as implicações causadas por *Varroa destructor* e o fato de seus haplótipos já serem conhecidos, o uso da técnica de HRM para uma comparação de sequências se torna importante, podendo abrir novos conhecimentos tanto sobre a funcionalidade da técnica quanto aos haplótipos da espécie. Até então, não se tem conhecimento da utilização desta técnica para a identificação destes diferentes haplótipos. Assim, propomos a utilização da técnica de HRM no estudo em questão, pois esta técnica é um método adequado para a detecção de alterações na sequência de DNA e apresenta vantagens, como facilidade de execução e rapidez na obtenção dos resultados através de uma análise rápida, precisa e com grande número de amostras em paralelo.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Tendo em vista a importância da apicultura como atividade econômica que vem ocupando espaço no mercado, tanto com a comercialização do mel quanto de outros produtos da colmeia, e também a importância das abelhas não apenas para determinada atividade, o desenvolvimento deste estudo pode ser de grande relevância para a área, considerando-se que poderá diminuir o tempo de processo do desenvolvimento da análise, mantendo a confiabilidade dos resultados. Esta técnica poderá ser utilizada em projetos de avaliação de distribuição de haplótipos, cujos resultados podem ser de grande importância visando o monitoramento e o controle deste parasito. A distinção destes dois haplótipos é fundamental na verificação do estado sanitário dos apiários e no controle do parasito, resultando em colônias mais saudáveis, que possam desenvolver suas atividades de polinização, produção de mel, entre outros, de maneira que não sejam prejudicadas e ainda assim, satisfazendo os apicultores e também consumidores.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral:**

Estabelecimento da técnica de dissociação de alta resolução (HRM) para identificação dos haplótipos J e K de *Varroa destructor*.

#### **3.2. Objetivos Específicos:**

- Implementar e validar a técnica de dissociação de alta resolução para a detecção dos haplótipos J e K de *Varroa destructor*.
- Comparar os resultados da técnica de HRM com os resultados obtidos pela técnica padrão.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Seleção das sequências de DNA a serem utilizadas:

As sequências de DNA do gene COI de espécimes de *V. destructor* dos haplótipos J e K coletadas no Brasil foram gentilmente cedidas pela Dr. Érica Weinstein Teixeira (Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – SP) e a partir destas, sequências de DNA foram sintetizadas artificialmente (gBlocks, Integrated DNA Technologies).

### 4.2. Desenho de primers:

A partir das sequências, foram desenhados 3 pares de primers para HRM (cox\_HRM\_1; cox\_HRM\_2; cox\_HRM\_3) e 1 par de primer para reações de clivagem (V\_dest\_BR). Os primers de HRM foram desenhados para ancorar em uma distância próxima que seja capaz de amplificar a sequência de DNA contendo os SNPs. Já o primer V\_dest\_BR foi desenhado baseado em sequências de DNA de *V. destructor* brasileira, que amplifica uma sequência de DNA mais extensa, mas que contém os sítios de clivagem.

**Tabela 1.** Primers utilizados nas reações de PCR e clivagem.

Primer <sup>1</sup>	Sequência (5'- 3')	Tamanho (pb)	Tamanho do amplicon (pb)
V_dest_BR.D	GATTACAAAGAGGGAAGAAG	20	380
V_dest_BR.R	ACCCATTTTCACTATGTATTAAG	23	
Cox_HRM_1.D	TCTTGATTAGCAACAATTCATGG	23	124
Cox_HRM_1.R	AATTAGCTAAAATTACACCAGTAATAC	27	
Cox_HRM_2.D	CTAGAGGTGGTGGTGATCC	19	105
Cox_HRM_2.R	GTTATTATAGCGTAAATTATCCC	23	
Cox_HRM_3.D	GGGATAATTTACGCTATAATAAC	23	175
Cox_HRM_3.R	GAACCATGAATTGTTGCTAATC	22	

<sup>1</sup>D, direto; R, reverso.

#### 4.3. Reação em Cadeia da polimerase (PCR):

Os fragmentos artificiais foram submetidos à reação de PCR para padronização das condições experimentais, utilizando *primers* para HRM e para posterior clivagem (Tabela 1). Cada reação teve um volume final de 20µL contendo 1U de enzima Taq- DNA polimerase e a concentração dos demais componentes segundo instruções do fabricante (Invitrogen).

Foram utilizadas as seguintes condições de ciclagem para a PCR: desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min; 30 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 45 seg, hibridização a 48 °C durante 45 seg e extensão a 72 °C por 45 seg. Após a ciclagem, a reação foi concluída por uma fase de extensão final durante 5 min a uma temperatura de 72 °C. O resultado obtido a partir das reações de PCR foi observado em gel de agarose 0,8% utilizando como corante GelRed (Biotium).

#### 4.4. Clivagem:

Após a reação de PCR (*primers* V\_dest\_BR), os fragmentos amplificados foram submetidos a reação de clivagem com as enzimas de restrição SacI e XhoI separadamente. A sequência de nucleotídeos que determina o sítio de clivagem para a enzima de restrição SacI é 5' – GAGCTC – 3'; já a sequência que determina o sítio de clivagem para a enzima de restrição XhoI é 5' - CTCGAG – 3'.

Cada reação teve um volume final de 20µL contendo 15,5 µL de água ultrapura; 2 µL de tampão concentrado 10 x; 2 µL de DNA amplificado a partir da reação de PCR e 0,5 µL da enzima de restrição. A reação foi incubada a 37°C durante 3 horas. O resultado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2 % utilizando GelRed (Biotium) como corante. Os fragmentos obtidos com os demais *primers* foram armazenados em ultrafreezer a -80 °C.

#### 4.5. High Resolution Melting (HRM):

Para a reação de HRM, foram utilizadas as amostras dos *primers* *cox\_HRM\_1*; *cox\_HRM\_2*; *cox\_HRM\_3*. Cada reação teve um volume final de 20µL. Todas as reações contendo 19 µL foram completadas com 1 µL de EvaGreen 20x. Os reagentes foram colocados em tubos fechados, e a partir de então foram submetidas a análise de HRM, utilizando 7500 fast

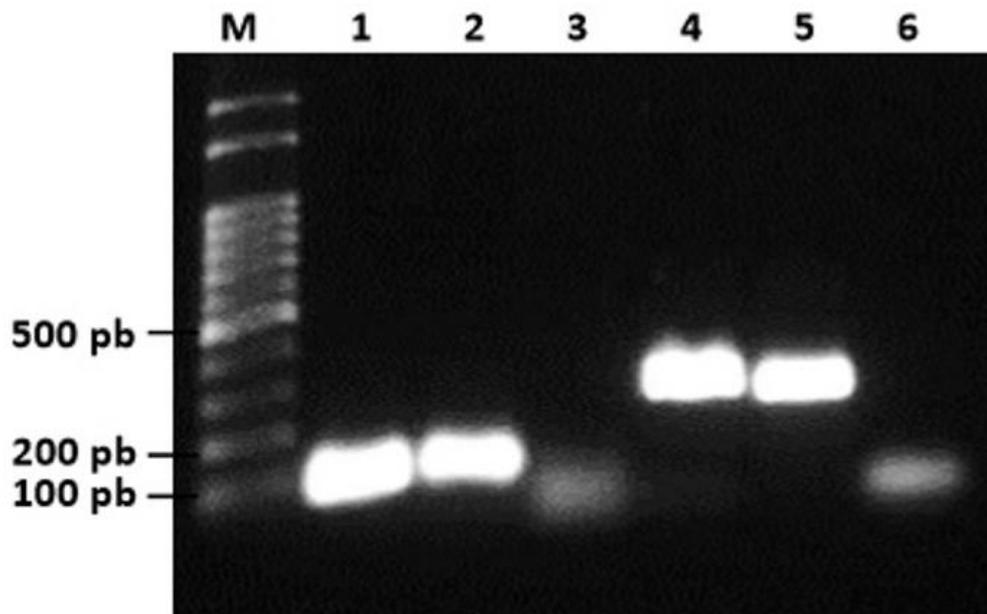
Real-Time PCR System (Applied Biosystem), nas condições *default* do equipamento. Os resultados obtidos foram analisados através do software 7500 software V2.0.6.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

Para análise dos haplótipos, tanto por clivagens onde foram utilizadas as enzimas de restrição *SacI* e *XhoI*, quanto por HRM, foi necessário padronizar as reações de PCR com todos os pares de *primers* utilizados (Figura 1). Nesta primeira reação de PCR, foram utilizados os *primers* V\_dest\_BR e *cox\_HRM\_1*, onde observamos que ocorre a amplificação em ambas as reações de PCR, utilizando os moldes referentes aos dois haplótipos analisados. Como descrito anteriormente, os produtos de amplificação possuem um número de pares de base diferentes devido às regiões nas quais eles ancoram na sequência do DNA (Figura 1).

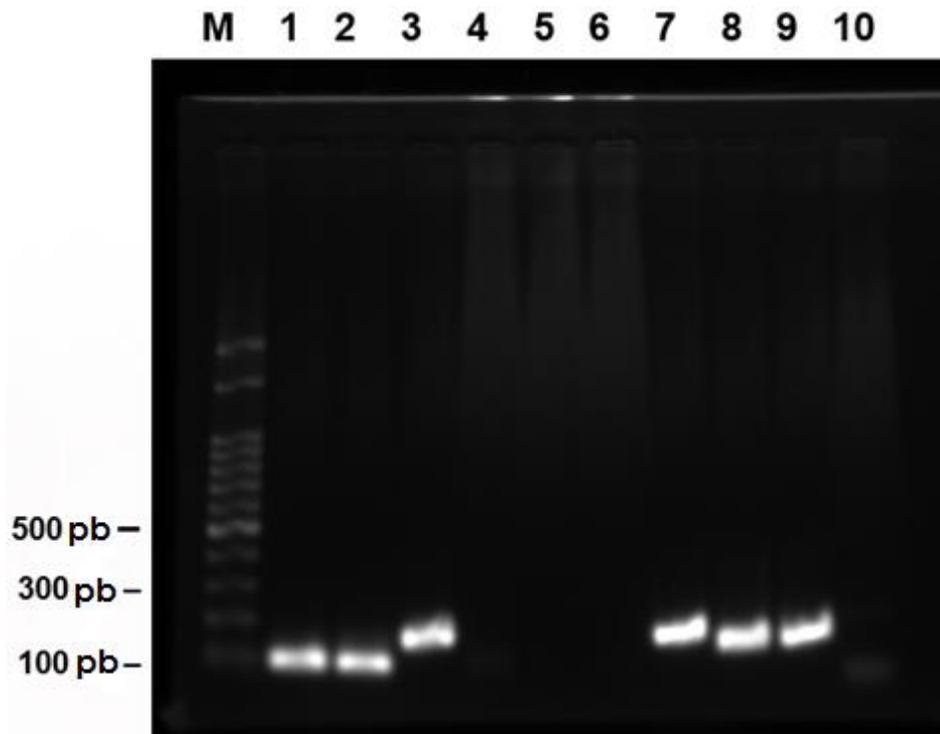
**Figura 1.** Padronização dos *primers* utilizados para análise de haplótipos por clivagem e HRM. M – marcador Ladder 100 pb; 1 – haplótipo K *primers* *cox\_HRM\_1*; 2 – haplótipo J *primers* *cox\_HRM\_1*; 3 – controle sem DNA molde *primers* *cox\_HRM\_1*; 4 – haplótipo K *primers* V\_dest\_BR; 5 – haplótipo J *primers* V\_dest\_BR; 6 – controle sem DNA molde *primers* V\_dest\_BR. Gel de agarose 0,8 %.



Após, foi feita uma segunda padronização utilizando somente os pares de *primers* *cox\_HRM\_1*, *cox\_HRM\_2* e *cox\_HRM\_3* (Figura 2). Foram analisados todos os *primers* para HRM com os haplótipos J e K, um controle negativo e uma amostra de DNA não sintético. Podemos observar através desta análise que os *primers* *cox\_HRM\_1* e *cox\_HRM\_3* tiveram todas as suas amostras amplificadas como o esperado. Porém, quando utilizamos os *primers* de

cox\_HRM\_2, este somente amplificou a amostra de DNA de Varroa, uma vez que estes *primers* não ancoravam nas sequências sintéticas.

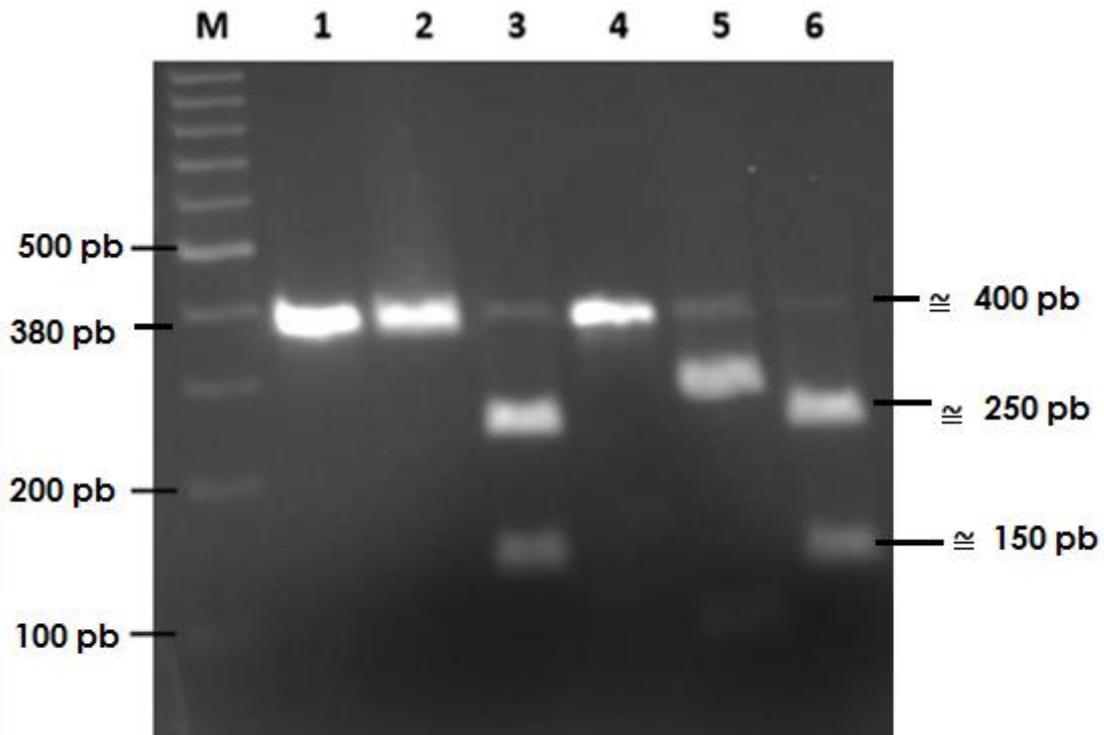
**Figura 2.** Padronização dos *primers* utilizados para análise de haplótipos por HRM. M – marcador Ladder 100 pb; 1 – haplótipo K *primers* cox\_HRM\_1; 2 – haplótipo J *primers* cox\_HRM\_1; 3 – DNA *V. destructor primers* cox\_HRM\_2; 4 – haplótipo J *primers* cox\_HRM\_2; 5 – haplótipo K *primers* cox\_HRM\_2; 6 – controle sem DNA molde *primers* cox\_HRM\_2; 7 – DNA *V. destructor primers* cox\_HRM\_3; 8 - haplótipo J *primers* cox\_HRM\_3 ;9 - haplótipo K *primers* cox\_HRM\_3 ;10 – Controle sem DNA molde *primers* cox\_HRM\_3. Gel de agarose 0,8%.



## 5.2. Clivagem:

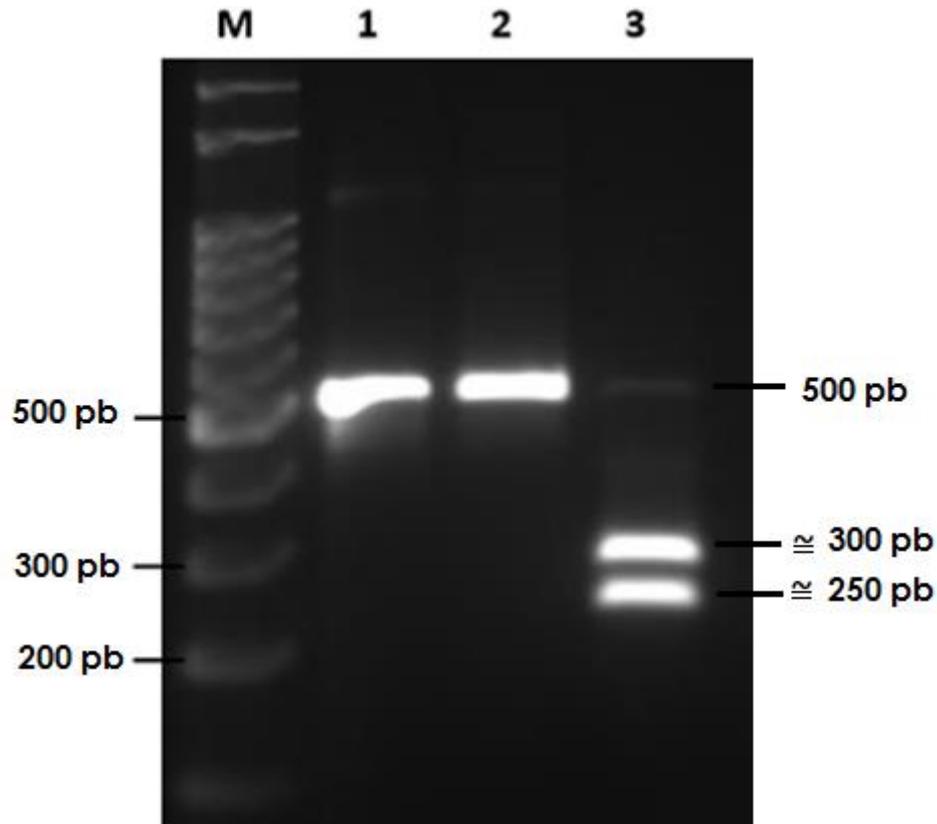
Após a padronização da reação de PCR, procedemos as reações de clivagem utilizando as enzimas de restrição SacI e XhoI tanto para os produtos de amplificação oriundos das amostras de DNA sintético (Figura 3) como também para amostras de DNA de Varroa (Figura 4).

**Figura 3.** Identificação dos haplótipos J e K de amostras de DNA sintéticas do gene COI. M – marcador Ladder 100 pb; 1 – haplótipo K não clivado; 2 – haplótipo K clivado com SacI; 3 – haplótipo K clivado com XhoI; 4 – haplótipo J não clivado; 5 – haplótipo J clivado com SacI; 6 – haplótipo J clivado com XhoI. Gel de agarose 2,0%.



Na Figura 3 é analisada a clivagem dos haplótipos J e K sintéticos com as enzimas de restrição. O haplótipo K sintético segue o padrão esperado, não sendo clivado com a enzima SacI e sendo clivado com a enzima XhoI. Já o haplótipo J mostra uma diferença no número de pb quando clivado com a enzima SacI, já que este haplótipo possui o sítio de clivagem para tal enzima de restrição. Segundo Anderson e Fuchs (1998), ambos os haplótipos possuem sítio de clivagem pra enzima de restrição XhoI e apenas o haplótipo J possui sítio de clivagem pra enzima de restrição SacI. Com base nestes achados, conclui-se que os resultados encontrados nas reações de clivagem com tais enzimas confirmam as informações relacionadas à clivagem dos haplótipos encontradas na literatura.

**Figura 4.** Identificação dos haplótipos J e K de amostra ambiental de *V. destructor*. A amostra foi identificada como haplótipo K. M – marcador Ladder 100 pb; 1 – amostra não clivada; 2 – amostra clivada com SacI; 3 – amostra clivada com XhoI. Gel de agarose 2%.



Na Figura 4, observa-se a análise de uma amostra ambiental de *V. destructor*, onde a amostra não clivada e a amostra clivada com SacI mantêm o mesmo número de pb, demonstrando que não houve clivagem da sequência de DNA por esta enzima de restrição. Observa-se também que esta amostra mantém o padrão de clivagem para a enzima de restrição XhoI. Este padrão de clivagem classifica determinada amostra como haplótipo K. Foi observado, nestes resultados, que houve a amplificação somente dos amplicons com o tamanho e com o padrão de clivagem esperados.

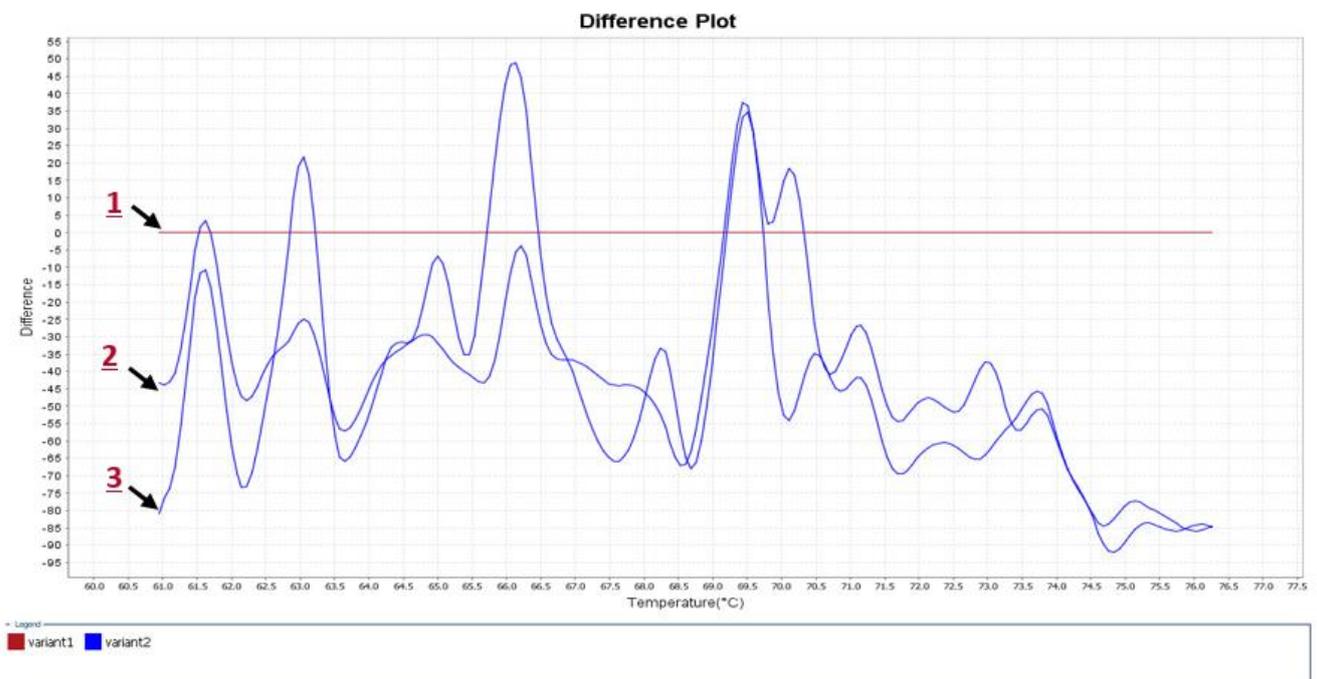
### **5.3. High Resolution Melting (HRM):**

De alguns anos pra cá, houve um aumento no número de artigos que tem sido publicados com a utilização do HRM para a identificação de SNPs em estudos de larga escala. Apenas em 2014, foram 263 artigos publicados (PUBMED, 2015). Devido a sua eficiência, rapidez e baixo custo, esta técnica se tornou uma importante ferramenta (SOUZA & FALCÃO, 2012). Neste



A Figura 6 demonstra o resultado obtido com esta análise, onde pode-se observar o comportamento das amostras das sequências de DNA com o par de *primers* *cox\_HRM\_1* durante as variações de temperatura para HRM. Foram utilizadas como padrão a “variante 1”, que é referente ao haplótipo J, e a “variante 2” referente ao haplótipo K. Como teste, utilizou-se o DNA de *V. destructor* não sintético.

**Figura 6.** Análise de dissociação de alta resolução (HRM) de amostras sintéticas e ambiental com o *primer* *cox\_HRM\_1*. A curva de amostra é subtraída a partir de uma curva de referência, este ponto de vista acentua diferenças entre as curvas de fusão semelhantes. *Variant 1* – haplótipo J; *Variant 2* – haplótipo K; 1 – haplótipo J (DNA sintético), padrão; 2 – haplótipo K (DNA sintético), padrão; 3 – haplótipo K (DNA ambiental), amostra.



Podemos observar nesta análise que as sequências que fazem parte da variante 2 possuem um comportamento similar. As duas amostras demonstraram um comportamento padrão, com picos semelhantes entre si, diferenciando-se apenas na sua intensidade. É interessante ressaltarmos que o pico de maior similaridade é encontrado em 69,5 °C. E podemos observar também que elas demonstram exatamente o mesmo comportamento entre as temperaturas 74,0°C e 74,5°C, e entre 76.0 e 76,5°C.

Este método tem sido bastante desenvolvido na identificação de mutações, com custos menores. Considerando economia de tempo e recursos, a vantagem do HRM vem da simplicidade, sensibilidade e especificidade (NORAMBUENA et al., 2009). Neste trabalho,

pudemos identificar os haplótipos por reação de PCR seguida de reação de clivagem. Contudo, o tempo necessário é alto, mostrando-se inapropriado quando um grande número de amostras é analisado. Além disso, custos com insumos como agarose e enzimas de restrição podem encarecer o processo caso o número de amostras seja elevado. A partir do uso da técnica de HRM, a análise tornou-se mais direta e rápida, mantendo-se, ainda, a confiabilidade, desde que haja padronização dos experimentos. Após feito o PCR, pode se proceder a análise de HRM imediatamente, no mesmo tubo fechado, evitando até mesmo algum tipo de contaminação, já que não requer nenhum manejo das amostras. Posto isso, neste trabalho foi possível padronizar a técnica de HRM para identificação dos haplótipos J e K de *V. destructor* utilizando como padrões DNA sintético e como teste uma amostra ambiental. Os resultados do HRM padronizado foram comparáveis aos da metodologia padrão (PCR aliada à clivagem), o que demonstra a confiabilidade da metodologia desenvolvida.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

### 6.1. Conclusões:

Com este trabalho confirmamos que, ainda que nem todos os pares de *primers* tenham obtido o resultado esperado, a técnica se mostra adequada após padronização, tendo em vista o objetivo do estudo em questão. O HRM é uma ferramenta que vem cada vez mais ganhando espaço pelas suas vantagens e simplicidade. Esta técnica faz uma análise precisa e confiável, especialmente quando a sequência de DNA analisada contém somente um SNP, o que aumenta a precisão da técnica.

Concluimos que este método pode ser potencialmente utilizado para análises de mutação e também ser utilizada na identificação dos haplótipos J e K, como os utilizados neste estudo. A partir do uso da técnica de HRM, a análise se torna mais simplificada e rápida, mantendo a precisão. Esta técnica poderá ser utilizada em projetos de avaliação de distribuição de haplótipos, cujos resultados podem ser de grande importância visando o controle deste parasito.

### 6.2. Perspectivas:

- Coletar amostras ambientais do haplótipo J, para subsequente teste com os *primers* *cox\_HRM\_2*.
- Repetir o experimento de HRM com amostras dos haplótipos J e K ambientais, utilizando os pares de *primers* *cox\_HRM\_1*, *cox\_HRM\_2* e *cox\_HRM\_3* com o objetivo de comparar os resultados obtidos com estes três pares de *primers*.
- Coletar amostras representativas do estado do Rio Grande do Sul e fazer um levantamento do haplótipo com maior abundância utilizando a técnica desenvolvida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKRATANAKUL, P.; Burgett, M., ***Varroa jacobsoni*: a prospective pest of honeybee in many parts of the world.** Bee World. 56. 119-121, 1975.

ANDERSON, D.L., Trueman, J.W.H., ***Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species.** Experimental and Applied Acarology. 24, 165–189, 2000.

ANDERSON, D.L., Fuchs, S., **Two genetically distinct populations of *Varroa jacobsoni* with contrasting reproductive abilities on *Apis mellifera*.** Journal of Apicultural Research. 37. 69-78, 1998.

BAILEY, L.; Ball, B.V.; **Honey bee Pathology.** Academic Press. 2. 193 p., 1991.

BALL, B.V.; Allen, M.F., **The prevalence of pathogen in honeybee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*.** Annals of Applied Biology. 2. 237-244, 1988.

BOTTA, E., Carmenate, H., de la Torres, P.E., **Varroasis, peligrosa enfermedad de la abeja melífera.** Fitosanidad. 8. 73-79, 2004.

CUI, G., Ding, H., Xu, Y., Li, B., Wang, D.W., **Applications of the method of high resolution melting analysis for diagnosis of Leber's disease and the three primary mutation spectrum of LHON in the Han Chinese population.** Gene. 512. 108-112, 2013.

DE GUZMAN, L.I., Rinderer, T.E., **Identification and comparison of *Varroa* species infesting honey bees.** Apidologie. 30. 85-95,

DE JONG, D.; Gonçalves, L.S., **The Africanized bees of Brazil have become tolerant to varroa.** Apiacta. 33. 65-70, 1998.

DE JONG, D.; Morse, R.A.; Eickwort, G.C., **Mite pests of honey bees.** Annual

Review of Entomology. 27. 229-252, 1982.

DUAY, P.; De Jong, D.; Engels, W., **Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites.** Apidologie. 34 . 61-65, 2003.

GRAHAM, R., Liew, M., Meadows, C., Lyon, E., Wittwer, C.T., **Distinguishing different DNA heterozygotes by high-resolution melting.** Clinical Chemistry. 51. 1295–1298, 2005.

KRAUS, B., Hunt, G., **Differentiation of *Varroa jacobsoni* Oud populations by random amplification of polymorphic DNA (RAPD).** Apidologie. 26. 283-290, 1995.

LIEW, M., Pryor, M., Palais, R., Meadows, C., Erali, M., Lyon, E., Wittwer, C., **Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons.** Clinical Chemistry. 50. 1156–1164, 2004.

MORETTO, G.; Gonçalves, L.S.; De Jong, D., **The effects of climate and bee race on *Varroa jacobsoni* oud. Infestation in Brasil.** Apidologie. 22. 197-203, 1991.

NORAMBUENA, P.A., Joshua, A.C., Krenková, P., Stambergová, A., Macek, M. JR., **Diagnostic method validation: High resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the MTHFR gene.** Clinical Biochemistry. 42. 1308-1316, 2009.

PALAIS, R.A., Liew, M.A., Wittwer, C.T., **Quantitative heteroduplex analysis for single nucleotide polymorphism genotyping.** Analytical Biochemistry. 346. 167–175, 2005.

PUBMED., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, acessado em 16/01/2015.

REED, G.H., Kent, J.O., Wittwer, C.T., **High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics.** Pharmacogenomics. 8(6):597-608, 2007.

ROSENKRANZ, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B., **Biology and control of *Varroa destructor*.** Journal of Invertebrate Pathology. 103. S96-S119, 2010.

SOLIGNAC, M., Cornuet, J.M., Vautrin, D., Le Conte, Y., **The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honeybee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones.** Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 272. 411-419, 2005.

SOLIGNAC, M., Vautrin, D., Pizzo, A., Navajas, M., **Characterization of microsatellite markers for the apicultural pest *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and its relatives.** Molecular Ecology. 3. 556-559, 2003.

SOUZA, A.R., Falcão, J.P., **A novel high-resolution melting analysis-based method for *Yersinia pseudotuberculosis* genotyping.** Journal of Microbiological Methods. 91. 329-335, 2012.

WARRIT, N., Hage, T.A.R., Smith, S.R., Çakmak, I., **A survey of *Varroa destructor* strains on *Apis mellifera* in Turkey.** Journal of Apicultural Research. 43. 190-191, 2004.