

COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO NÃO LETAL DE DNA EM ABELHAS DO GÊNERO *Melipona*

AMORIM, Marineide Rodrigues ^{1,*}; LIMA, Teresa Cristina Alves ^{1,*}; SILVA, Geice Ribeiro ²; ALMEIDA, Glicia Maria ³; VIEIRA-NETO, José Maria ⁴; LIMA, Paulo Sarmanho da Costa ⁵; BRITTO, Fábio Barros ⁵; DINIZ, Fábio Mendonça ⁵

¹ Especialista em Genética e Evolução - Universidade Federal do Piauí

² Estagiário do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia da Embrapa Meio Norte

³ Mestranda em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí

⁴ Estagiário do Núcleo de Pesquisa com Abelhas da Embrapa Meio Norte

⁵ Pesquisador da Embrapa Meio Norte

* Autores tiveram igual participação na realização deste estudo.

Email: marineideamorim@yahoo.com.br, teresacristinalima@yahoo.com.br

RESUMO

Em insetos sociais, a sobrevivência dos indivíduos amostrados nem sempre é levado em consideração. No entanto, a amostragem letal pode ser problemática quando colônias pequenas são estudadas. O objetivo deste trabalho foi comparar seis protocolos de extração não letal de DNA em abelhas *Melipona* utilizando as extremidades da asa e do tarso para verificar a qualidade e quantidade de DNA extraído. Foram utilizados os protocolos (1) Tampão A; (2) Tampão B; (3) Tampão C; (4) Chelex; (5) Chelex + proteinase K; e (6) Kit de Extração de DNA Puregene (Gentra®). A amplificação do DNA extraído nos seis protocolos foi efetuada através da técnica de PCR onde se utilizou como primer a região *LSUrRNA* do DNA mitocondrial (*mtDNA*). Após a PCR, os protocolos 1, 2 e 3 não apresentaram nenhum resultado satisfatório. O material extraído pelos protocolos 4, 5 e 6 apresentaram bandas distintas sem a presença de amplificação não específica. Observando-se o custo e rapidez, o melhor protocolo foi o 4. Quanto ao melhor desempenho, o protocolo 5 mostrou um DNA de alto peso molecular e sem padrão de rastro (“smear”).

Palavras-chave: *Melipona*, DNA, diversidade genética.

INTRODUÇÃO

Entre as abelhas sociais, além da conhecida *Apis mellifera*, estão as da tribo Meliponini, que agrupam vários gêneros de abelhas sem ferrão também conhecidas como abelhas indígenas com grande heterogeneidade de cor, tamanho, forma, hábitos de nidificação e população dos ninhos (Pereira, 2005). Habitantes das regiões tropicais e subtropicais do mundo, estima-se que, só no Brasil, existam mais de 300 espécies de abelhas sem ferrão (Coletto-Silva, 2005). Neste grupo, as mais conhecidas são a jandaíra (*Melipona subnitida*), urucu-amarela (*Melipona rufiventris*), urucu (*Melipona flavolineata*), tiúba (*Melipona compressipes*), e manduri (*Melipona marginata*), sendo todas típicas da região nordeste.

Algumas espécies são pouco agressivas, adaptam-se bem a colméias racionais e ao manejo. Além de produzirem mel de excelente qualidade, que possui potencial terapêutico, essas abelhas podem fornecer pólen, cerume, geoprópolis e os próprios enxames para exploração comercial. A polinização é outro recurso importante fornecido pelos meliponídeos (Pereira, 2005).

Geralmente a amostragem de DNA de abelhas baseia-se em métodos letais ou invasivos (Châline et al., 2002). A amostragem não-letal para identificar o DNA está se tornando cada vez mais importante para estudos populacionais, de conservação e de comportamento (Gerken et al., 1998; Lushai et al., 2000; Starks e Peters, 2002).

Em insetos sociais, a sobrevivência dos indivíduos amostrados nem sempre é importante. Em espécies com um grande número de operárias como a do gênero *Apis*, os indivíduos podem ser sacrificados para fornecer as amostras necessárias para vários tipos de análises genéticas, tais como a determinação de parentesco (proximidade) e a relação entre a geração (prole) (Châline et al., 2002; Foster et al., 2001; Bourke et al., 1997). No entanto, a amostragem letal pode causar problemas quando colônias pequenas são estudadas, como é o caso das abelhas do gênero *Melipona*. Este tipo de análise também é inadequado para a genotipagem de rainhas destinadas a liderar colônias ou operárias cujo comportamento subsequente deve ser estudado (Starks e Peters, 2002). Além disso, a amostragem prolongada de uma população pode alterar a estrutura da população subsequente (Starks e Peters, 2002).

Para animais pequenos como insetos, um desafio metodológico é o desenvolvimento de métodos de amostragem de tecidos que não afetem a sobrevivência dos indivíduos enquanto ainda fornecem DNA de qualidade adequada para análise genética (Gerken et al., 1998). Os protocolos tradicionais de extração de DNA para o estudo de diversidade genética de *Melipona* comprometem o desempenho da colméia. No entanto, estudos revelam que a utilização das extremidades das asas e da porção terminal da perna (tarso) não afeta a performance dessas abelhas.

OBJETIVOS

O propósito deste trabalho foi identificar a viabilidade de protocolos de extração não letal de DNA em abelhas *Melipona* utilizando o tarso e a extremidade da asa, e verificar a qualidade do material extraído para reações de polimerase em cadeia (PCR), especificamente uma região do DNA mitocondrial constantemente utilizada em estudos de evolução molecular.

METODOLOGIA

Foram coletadas espécimens de abelhas jandaíra (*Melipona subnitida*), uruçú-amarela (*Melipona rufiventris*), uruçú (*Melipona flavolineata*), tiúba (*Melipona compressipes*), e manduri (*Melipona marginata*) na **Embrapa Meio-Norte**. As amostras foram armazenadas em álcool absoluto à temperatura ambiente e processadas no Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia em Teresina (PI), onde protocolos de extração de DNA foram testados. Os protocolos utilizados são descritos no item “Desenvolvimento”. O DNA extraído foi utilizado como molde para amplificação da região LSUrRNA do DNA mitocondrial para verificação da viabilidade do material extraído.

DESENVOLVIMENTO

Para todos os protocolos de extração, foram retiradas uma porção de 10% da asa do indivíduo (**Figura 1**) e o tarso das espécies de abelha mencionadas acima. O material foi macerado em nitrogênio líquido com auxílio de pestilo tendo em vista o rompimento da camada de quitina e a exposição das células para melhor atuação dos reagentes, especificamente a protease. A asa inteira e o tórax foram usados como padrão de comparação.

Os protocolos 1, 2 e 3, descritos por Waldschmidt et al. (1997), diferiram entre si apenas pelo tampão utilizado nos primeiros passos da extração:

- **Protocolo 1:** tampão A (2% CTAB, 100mM tris-pH 8, 20mM de EDTA, 1,4 M de NaCl, proteinase K);
- **Protocolo 2:** tampão B (1% CTAB, 50mM tris-pH 8, 10mM de EDTA, 0,75 M de NaCl, proteinase K);
- **Protocolo 3:** tampão C (2% SDS, 50mM tris-pH 8, 10mM de EDTA, 0,75 M de NaCl, proteinase K).

Em cada amostra macerada em nitrogênio foram adicionados 300 µL do tampão de extração (A, B ou C). O material foi homogeneizado em *vortex* por alguns minutos e, em seguida, adicionou-se 20 µL de proteinase K incubando a 55°C, por 3 horas, para a digestão completa das proteínas. Em seguida adicionou-se 300 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e 300 µL de fenol (Sambrook et al. 1989). Cada tubo foi homogeneizado em *vortex* por 10s e, em seguida, misturado por 30 min em agitador. Centrifugou-se a 18600 × g, por 15 min, transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo e adicionou-se 300 µL de clorofórmio-álcool isoamílico. As amostras foram novamente homogeneizadas em *vortex* por 10s, misturadas em agitador por 15 min e centrifugadas a 18600 g por 10 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde se adicionou 1 mL de isopropanol e 3 µL de acetato de sódio 3M.

O tubo foi invertido 10 vezes e então colocado no freezer por 30 min. Centrifugou-se a 7 700 × g por 20 min. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o pellet com 1ml de etanol 70%. Após centrifugar a velocidade máxima por 15 min, descartou-se o etanol e secou-se o pellet à temperatura ambiente por 30 min. Em seguida adicionou-se 100 µL de tampão de eluição (Invitrogen®).

○ **Protocolo 4:** Chelex®100 (Walsh et al., 1991)

Quantidades diferentes de solução chelex ® 100 10 ou 20% foram adicionadas de acordo com a natureza da amostra: 100 µL foram adicionados às amostras do tarso e 50 µL foram adicionados às amostras da ponta da asa. As amostras foram então encubadas a 55°C por 3 horas com constante agitação, passadas através do *vortex* por 20 s, aquecidas de 95 a 100°C, por 30 min, e passadas novamente pelo *vortex*, por 20 s. Após 2 min de centrifugação à velocidade máxima, transferiu-se 20 µl do sobrenadante para um tubo de 200 µL.

○ **Protocolo 5:** Chelex®100 com adição de proteinase K (Walsh et al., 1991)

Antes de seguir com o protocolo original, acrescentou-se proteinase K nas amostras. Quantidades diferentes de solução chelex ® 100 10 ou 20% foram adicionadas de acordo com a natureza da amostra: 100 µL foram adicionados às amostras do tarso e 50 µL foram adicionados às amostras da ponta da asa. As amostras foram então encubadas a 55°C *overnight* e misturadas através do *vortex* por 20 s. Em seguida as mesmas foram fervidas a 95 - 100°C por 15 min e misturadas novamente em *vortex* por 10 s. Após 3 min de centrifugação a 7 700 × g, transferiu-se 20 µL do sobrenadante para um tubo de 200 µL.

○ **Protocolo 6:** Kit de Extração de DNA Puregene (Gentra®)

Os procedimentos de extração do kit encontram-se descritos em detalhes pelo fabricante em manual próprio. Resumidamente, adicionou-se 300 µL de solução de lise celular e 20 µL de proteinase K, incubou-se por 3 horas a 55°C. Acrescentou-se 100 µL de solução de precipitação de proteínas seguido de *vortex* e centrifugação por 16000 × g, por 3 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 300 µL de isopropanol. O material foi novamente lavado com etanol a 70% e centrifugado. Descartou-se o sobrenadante e 50 µL de TRIS foi adicionado ao *pellet*.

Após a extração, a quantidade e qualidade do DNA obtido foi visualizada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. A viabilidade do DNA extraído como molde para reações de PCR foi verificada através da amplificação da região LSUrRNA do DNA mitocondrial, para todas as abelhas amostradas, com os seguintes iniciadores (*primers*): 16S-ar (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') e 16S-br (5'-CCGGTCTGAAGTCAAGTACAGT-3'), previamente descritos por Palumbi (1996). Em um volume de reação de 20 µL usou-se 2,0 µL de DNA extraído, tampão para PCR 1x, 1,75 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada primer, 800 mM de cada dNTP e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Thermoprime plus, Advanced Biotechnologies). Todas as reações foram imediatamente desnaturadas a 94°C, por 4 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação de 94°C por 1'; 50°C de anelamento por 1' e alongação de 72 °C por 1', e por último a alongação final durante 7 min a 72°C.

Após PCR, o DNA amplificado, obtido a partir de cada protocolo, foi visualizado em eletroforese em gel de agarose a 1% onde o DNA foi corado com 3 µL de brometo de etídio (Sambrook et al. 1989). Utilizou-se 10 µL de cada amostra para a realização da eletroforese.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de DNA a partir da extremidade da asa e do tarso de abelhas do gênero *Melipona* mostrou-se eficaz para alguns protocolos utilizados (Tabela 1). Dos protocolos testados somente os que utilizaram o polímero Chelex® 100 (Walsh et al., 1991) mostraram resultados satisfatórios. A digestão com proteinase K mostrou ser um passo eficiente no processo de extração. A extração de DNA através dos protocolos utilizando soluções tampões (A, B e C) não apresentou resultados positivos, provavelmente em razão da degradação do material genômico ou da sua perda durante o processo de extração.

O resultado das ampliações da região LSURNA do *mtDNA* tendo como molde o DNA genômico extraído a partir de 10% da asa pelos protocolos Chelex® 100 e Chelex® 100 + proteinase K em concentrações de 10 e 20 %, tendo como controle o DNA extraído a partir da asa inteira mostrou-se satisfatório. Observou-se que o DNA obtido com este método permitiu a visualização de material de boa qualidade onde houve a formação de bandas sem padrão de “smear”. Entretanto nas amostras 5A e 5B observou-se a presença de algumas bandas que podem ter sido ocasionadas por um anelamento parcial dos primers em decorrência da diminuição da temperatura durante a PCR (Figura 2).

A extração de DNA do tarso usando o protocolo Chelex® 100 + proteinase K (Figura 2). Apresentou DNA de boa qualidade, no entanto a amplificação só ocorreu em uma espécie, isso pode ter ocorrido devido ao processo de maceração do material, que pode não ter sido suficientemente eficaz, ou à quantidade de DNA extraído não ter sido suficiente para a amplificação nas outras espécies.

Na extração pelo Kit Puregene obteve-se amplificação de apenas duas das amostras testadas, onde na 1ª observou-se a presença de bandas não específicas que também podem ter sido amplificadas em decorrência da baixa temperatura de anelamento durante a PCR. A não amplificação das demais amostras pode ter ocorrido pela perda de DNA durante os procedimentos de extração, onde houve constante troca de tubos. (Figura 3).

Os métodos de amostragem não letal de DNA de indivíduos de abelhas do gênero *Melipona* são requeridos tanto por estudos de conservação genética como de comportamento. Verificou-se que a região LSURNA do DNA mitocondrial poderia ser amplificado confiavelmente da ponta da perna (tarso) e da asa de abelhas *Melipona*.



Figura 1. Vista inferior da asa de um espécime de abelha sem-ferrão demonstrando o corte do material utilizada para a extração de DNA.

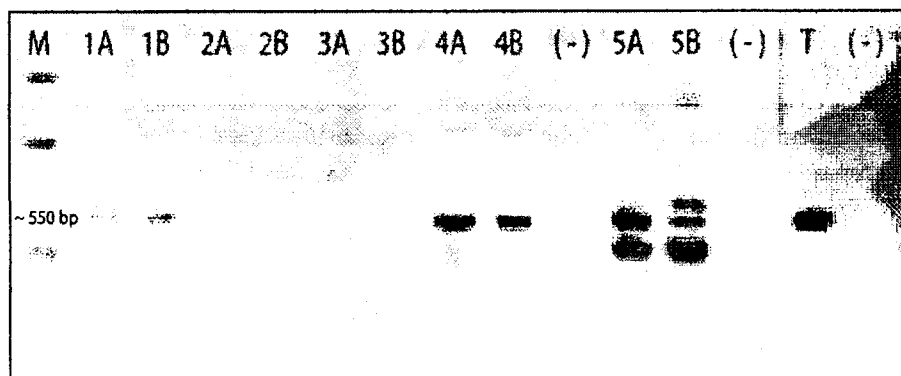


Figura 2. Amplificação do DNA mitocondrial (região LSUrRNA) tendo como molde DNA extraído a partir dos protocolos Chelex® 100 e Chelex® 100 + proteinase K em concentração de 10 e 20%. Os números 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem, respectivamente, à Uruçu-amarela, Tiúba, Mandurí, Jandaíra, e Uruçu. A e B correspondem à porção de 10% da asa e asa inteira, respectivamente, de cada espécie citada acima. T, corresponde ao tarso de Jandaíra. 1 e 2 utilizou Chelex® 100. 3, 4, 5 e T utilizou Chelex® 100 + proteinase K.

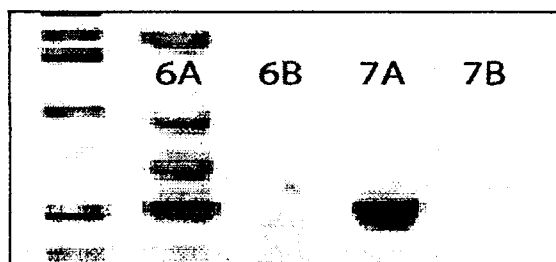


Figura 3. Amplificação do DNA mitocondrial (região LSUrRNA) tendo como molde DNA extraído a partir do *Kit Puregene*. Os números 6 e 7 correspondem às espécies, Uruçu e Mandurí, respectivamente. A corresponde ao tórax e B à porção de 10% da asa das espécies citadas acima.

Tabela 1. Comparação dos protocolos utilizados. O sinal positivo (+) indica a ocorrência de amplificação de DNA. O sinal de negativo (-) indica a ausência de amplificação.

Espécie	Parte do corpo	Protocolos					
		1	2	3	4	5	6
Jandaíra	Ponta Asa	-	-	-	-	+	-
	Asa inteira	-	-	-	-	+	-
	Tarso	-	-	-	-	+	-
Uruçu-amarela	Ponta Asa	-	-	-	+	-	-
	Asa inteira	-	-	-	+	-	-
	Tarso	-	-	-	-	-	-
Uruçu	Ponta Asa	-	-	-	-	+	+
	Asa inteira	-	-	-	-	+	-
	Tarso	-	-	-	-	-	-
Tiúba	Ponta Asa	-	-	-	-	-	-
	Asa inteira	-	-	-	+	-	-
	Tarso	-	-	-	-	-	-
Manduri	Ponta Asa	-	-	-	-	-	+
	Asa inteira	-	-	-	-	-	-
	Tarso	-	-	-	-	-	-

CONCLUSÃO

Os protocolos Chelex® 100 e Chelex® 100 + proteinase K extraíram DNA de qualidade e em quantidade suficiente para a utilização do material como molde para reações de PCR. O protocolo Chelex® 100 apresenta grande vantagem uma vez que o tempo de extração é extremamente curto em relação aos demais, além de baixo custo. No entanto a amplificação não ocorreu com todas as espécies de abelhas citadas, o que nos leva a continuar o estudo na busca pela otimização desse protocolo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a EMBRAPA Meio Norte pela utilização da infra-estrutura do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia, e a Profa. Sandra Dantas, da Universidade Federal do Piauí, Departamento de Biologia, Especialização Genética e Evolução pelo apoio e direcionamento durante o curso de Especialização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bourke A.F.G., Green H.A.A., Bruford M.W. (1997) Parentage, reproductive skew and queen turnover in a multiple-queen ant analysed with microsatellites, *Proc. R. Soc. London B* 264, 277-283.
- Châline N., Ratnieks F.L.W., Burke T. (2002) Anarchy in the UK: Detailed genetic analysis of worker reproduction in a naturally occurring British anarchistic honeybee, *Apis mellifera*, colony using DNA microsatellites, *Mol. Ecol.* 11, 1795-1803.
- Châline N., Ratnieks F.L.W., Raine N.E., Badcock N.S., Burke T. (2003) Non-lethal sampling of honey bee, *Apis mellifera*, DNA using wing tips, *Apidologie* 35, 311-318.
- Coletto-Silva, A. (2005). Captura de Enxames de Abelhas Sem Ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) sem Destruição de Árvores. *Acta Amazonica*, 35(3): 383 – 388.
- Foster K.R., ratnieks F.L.W., Gyllenstrand ., Thoren P.A. (2001) Colony kin structure and male production in *Dolichovespula wasps*, *Mol. Ecol.* 10, 1003-1010.
- Gerken T. Kurtz J., Sauer K.P., Lubjuhn T. (1998) DNA preparation and efficient microsatellite analysis from insect haemolymph, *Electrophoresis* 19, 3069-3070.
- Lushai G., Fjellsted W., Marcovitch O., Aagaard K., Sherrant T.N., Allen J.A., Maclean N. (2000) application of molecular techniques to non-lethal tissue samples of endangered butterfly population (*Parnassius apollo L.*) in Norway for conservation management, *Biol. Conserv.* 94, 43-50.
- Palumbi, S.R. (1996). Nucleic Acids, II: the polymerase chain reaction. In: *Molecular Systematics*, Hillis, D.M., Moritz, C. and Mable, B.K. (eds.). Sunderland Mass.: Sinauer Associates, Inc., 205-247.
- Pereira F.M. (2005) Abelhas sem ferrão, a importância da preservação. Embrapa Meio-Norte. *Gazeta do Oeste*, 19.02.2006
- Sambrook J., Fritsch E.F.E, Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York.
- Starks P.T., Peters J.M. (2002) Semi- nondestructive genetic sampling from live eusocial wasps, *Polistes dominulus* and *Polistes fuscatus*, *Insectes Soc.* 49, 20-22.
- Waldschmidt A.M., Salomão T.M.F., Barros E.G., and Campos L.A.O., 1997. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Braz J Genet* 20:421-423.
- Walsh P. S., Metzger D.A., Higuchi R. (1991) Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, *BioTechniques* 10, 506-513.