



CARACTERIZAÇÃO DE LOCOS MICROSSATÉLITES DE *Tetragonisca sp* (HYMENOPTERA, APIDAE, TRIGONINI) DO ESTADO DE RONDÔNIA

Douglas Galhardo (PIBIC/CNPq-UEM), Ludimilla Ronqui, Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki, Vagner de Alencar Arnaut de Toledo (Orientador),
e-mail: vagner_abelha@yahoo.co.uk

Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Zootecnia /
Departamento de Biotecnologia, Biologia Celular e Genética

Área e subárea do conhecimento: Ecologia dos animais domésticos e etologia, nº: 5.04.01.00-9

Palavras-chave: Abelha sem ferrão, Amazônia, genética de populações

Resumo:

Este estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética de *T. angustula* e *T. weyrauchi* do estado de Rondônia por meio dos marcadores de microssatélites. Após o isolamento do DNA foram realizados testes com nove *primers* microssatélites. Os *primers*: (T3-32, Mbi33, Mbi254 e Tang 77) foram selecionados para análise das duas espécies, pois demonstraram qualidade na amplificação dos locos. Os valores de heterozigosidade esperada maiores que os de heterozigosidade observada e os valores positivos de F_{IS} indicaram que há excesso de homozigotos. As populações analisadas estão moderadamente diferenciadas, o valor estimado de F_{ST} foi de 0,1663. A análise de variância molecular indicou que 20% da variação ocorrem entre as populações e 80% dentro das populações. As populações apresentaram baixa diversidade genética e os marcadores microssatélites utilizados não foram eficientes em separar as duas espécies estudadas.

Introdução

Na Amazônia a presença de meliponídeos é evidenciada pela grande quantidade de artrópodes presentes direta ou indiretamente em cada árvore. Isto demonstra a importância destas espécies para a manutenção e construção dos ecossistemas, que influenciam na diversidade, na frequência relativa, na sobrevivência, nos limites de ocupação territorial. Nesse contexto, garantem a sobrevivência de muitas espécies que são inter-associadas. Portanto, é fundamental realizar pesquisas sobre comportamento e reprodução específica para cada espécie; adaptar técnicas de manejo e equipamentos; analisar e caracterizar os produtos fornecidos e estudar formas de conservação do mel.



Este estudo tem como objetivo avaliar o polimorfismo em populações de abelhas sem ferrão (*T. angustula* e *T. weyrauchi*) utilizando marcador microssatélite.

Materiais e métodos

As operárias de (*T. angustula* e *T. weyrauchi*) foram coletadas nos municípios de Cacoal, Ji-Paraná, Jaru, Ariquemes, Cacaulândia, Monte Negro, Alto Paraíso e Porto Velho, estado de Rondônia.

O método usado para extração do DNA total foi o de Yu et al. (1993) modificado. O tórax homogeneizado em tubos de 1,5mL, contendo 300µL do tampão de extração [200mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,5% SDS, 250mM NaCl, 50mM EDTA e 100mg/mL proteinase K]. Após uma hora de incubação a 65°C, foi centrifugado durante 10 min. (10.000xg) e o sobrenadante transferido para um novo tubo, adicionando-se igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguido por centrifugação a 10.000xg por 10 min. e transferência do sobrenadante para um novo tubo. Após homogeneização e centrifugação para separação das fases, a fase superior foi transferida para um novo tubo. O DNA precipitado por adição de 250µL de isopropanol gelado e incubado a -20°C *overnight*. O DNA precipitado foi separado por centrifugação a 10.000xg por 10 min. Após descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado com 1,0mL de etanol 70% gelado e deixado secar na temperatura ambiente. Depois de seco, o DNA foi ressuscitado por duas horas em 30µL de tampão TE (10mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA), tratado com RNase (10µg/mL) e mantido por duas horas em temperatura ambiente e armazenado a -20°C.

Amplificação dos locos microssatélites

Foram utilizadas cinco operárias de cada ninho e empregando nove pares de *primers* microssatélites. Os *primers* foram T7-5, T3-32, Mbi33, Mbi278, Mbi215, Mbi254, Mbi259, Tang77 e Tang 78. A reação foi preparada em 20µL de solução, contendo água, 1µL de enzima *taq dna polimerase (Platinum)*, 2,5mM cloreto de magnésio (MgCl₂), 2,0µL tampão da enzima *taq Platinum*, 0,4mM deoxinucleotídeos (dNTPs), 0,4µM *primers (Forward e Reverse)*, 2µL DNA - 10ng. As reações do PCR foram realizadas em termocicladores *Eppendorf, Applied Biosystems* e *Techne*, conforme o protocolo original descrito por Paxton et al. (1999), com modificações de temperatura na etapa de desnaturação de 92°C para 94°C e tempo de extensão final de 30s para 45s. O processo de amplificação foi iniciado por uma desnaturação inicial em 94°C por 3 minutos, seguida por 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a temperatura específica para cada *primer*, 45 segundos a 72°C e 5 minutos a 72°C para extensão final (Tabela 1).

O Programa *Touchdown-PCR* com temperatura variando de 65°C a 55°C. Desnaturação inicial 94°C por 1min; desnaturação 94°C por 1min; anelamento 65°C (-1°C/ciclo) por 1min; extensão 72°C por 2min;



desnaturação 94°C por 1min; anelamento 65°C (-1°C/ciclo) por 1min; extensão 72°C por 2min; volta ao passo 2 por 9 vezes; desnaturação 94°C por 1min; anelamento 55°C por 1 min; extensão 72°C por 2min; volta ao passo 9 – 17vezes; extensão final 72°C por 2 min e imersão a 15°C (Don et al., 1991).

Tabela 1 – Temperaturas de anelamento específicas (E), conforme recomendações dos autores, e temperaturas usada (T), para adaptação dos primers na amplificação de DNA de *T. angustula* e *T. weyrauchi*

Primers	Temperaturas de anelamento	
	E	T
T7-5	60°C ¹	Touchdown*
T3-32	60°C ¹	Touchdown
Mbi 33	60°C ²	Touchdown
Mbi 215	57.5°C ²	64°C
Mbi 254	55°C ²	55°C
Mbi 259	57.5°C ²	57.5°C
Mbi 278	60°C ²	Touchdown
Tang 77	55°C ³	55°C ³
Tang 78	55°C ³	55°C ³

¹ Paxton et al. (1999); ² Peters et al. (1998); ³ Brito et al. (2009), Touchdown*- PCR (Don et al., 1991).

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 4%, a 60v, utilizando o volume total da reação (20µL) adicionado a 2µL de *load* (azul de bromofenol [0,25%] + glicerol [30%]). O tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular Ladder 100Kb *Invitrogen*[®].

As medidas da variabilidade genética, foram calculadas empregando o programa Popgene 1.32 e o programa GeneaLex 6.5. As análises foram realizadas considerando três populações, a pop. 1 (indivíduos de *T. angustula* das cidades de Cacoal, Ji-Paraná, Jaru, Cacaúlândia). Pop. 2 os indivíduos de *T. angustula* das cidades de Monte Negro, Ariquemes, Alto Paraíso e Porto Velho e a pop. 3 os indivíduos de *T. weyrauchi* de todas as localidades.

Resultados e Discussão

Os quatro primers (T3-32, Mbi33, Mbi254 e Tang77) foram selecionados para análise das duas espécies, pois demonstraram qualidade na amplificação dos locos microssatélites. Os quatro locos microssatélites analisados, apresentaram número de alelos que variaram entre três e cinco.



O alelo que apresentou a maior frequência foi o T3-32-A em *T. angustula* (população 1), e em *T. weyrauchi* (população 3)

Os maiores valores de heterozigosidade observados foram estimados para o loco *Tang77* de *T. angustula* (0,20) na população 2. Os valores de heterozigosidade esperada maiores que os de heterozigosidade observada indicaram que há excesso de homozigotos

Os valores positivos de F_{IS} indicaram que há excesso de homozigotos nas populações analisadas de acordo com os valores F_{ST} apresentados na Tabela 4. Wright (1984) encontrou valores F_{ST} entre 0,15 e 0,25 que indicaram populações moderadamente diferenciadas. A análise de variância molecular (AMOVA) indicou que 20% da variação ocorrem entre as populações e 80% dentro das populações.

Conclusões

As populações apresentaram baixa diversidade genética e os marcadores microssatélites não foram eficientes em separar as espécies estudadas.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), número 482947/2013-6.

Referências

BRITO, R. M.; FRANCISCO, F. O.; DOMINGUES-YAMADA, A. M. T.; GONÇALVES, P. H. P.; PIOKER, F. C.; SOARES, A. E. E.; ARIAS, M. C. Characterization of microsatellite loci of *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Conservation Genetic Resource**, v. 1, p. 183–187, 2009.

DON, R.H.; COX, P.T.; WAINWRIGHT, B.J.; BAKER, K.; MATTICK, J.S. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research**, 19:4008-4008, 1991.

PAXTON, R. J.; WEIBSCHUH, N.; QUEZADA-EUAN, J. J. G. Characterization of dinucleotide microsatellite loci for stingless bees. **Molecular Ecology**, v. 8, n. 4, p. 690-692, 1999.

PETERS, J. M.; QUELLER, D. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; STRASSMANN, J. E. Microsatellite loci for stingless bees. **Molecular Ecology**, v.7, n. 6, p. 84-787, 1998.

YU, K. F.; DEYNZE A. V.; PAULUS, K. P. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In BR Glick (ed.), **Methods in plant molecular biology and biotechnology**. USA. 1993. p.287-301.