

MANEJO DE MATRIZES, GENOTIPAGEM DOS ALELOS DE *MRJP3* E PRODUÇÃO DE RAINHAS EM *APIS MELLIFERA*

Geovana Iasmim Faustino Rodrigues (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Jean Samel Rocha (Doutorando PPZ/UEM - Coorientador), Janaina Parpineli Facina (Graduanda/UEM), Camila Fernanda dos Santos (Graduanda/UEM), Wendy Guadalin de Oliveira (Graduanda/UEM), Vagner de Alencar Arnaut de Toledo (DZO/UEM - Orientador), e-mail: vatoledo@uem.br

Universidade Estadual de Maringá – UEM / Campus Sede - Maringá, PR
Centro de Ciências Agrárias/Departamento de Zootecnia.

Zootecnia/ Genética e melhoramento dos animais domésticos.

Palavras-chave: abelha rainha, genotipagem, *Mrjp3*.

Resumo: As colônias de *Apis mellifera* africanizadas detêm características produtivas as quais são transmitidas em parte pela rainha. Objetivou-se produzir abelhas rainhas e avaliar as colônias matrizes selecionadas para produção de geleia real. Foram utilizadas para extração de DNA as seguintes colônias matrizes: M9, M11, M12, M14, M31, M35, M39 e M40. Crias pré-emergentes foram coletadas para análises em genotipagem dos Alelos de *Mrjp3*. A etapa de extração de DNA consistiu em três fases: quebra das membranas celulares, limpeza de possíveis contaminantes e precipitação do DNA. As colônias recrias foram manejadas e larvas foram transferidas para cúpulas de produção de rainhas. No entanto poucas rainhas emergiram, devido às dificuldades de visualização das larvas. Com a chegada do inverno, ocorreram dificuldades para a produção de rainhas durante os dias de estiagem e frio. As coletas destinadas a extração e genotipagem dos alelos de *Mrjp3* foram realizadas, as amostras foram armazenadas em freezer. Foram realizados os manejos e a extração do DNA, não sendo possível concluir as análises devido a pandemia, a disponibilidade do laboratório por fila de agendamento e limite de pessoas para uso, o que acarretou atrasos na conclusão.

Introdução

As colônias de *Apis mellifera* africanizada detêm características como a produção de mel, própolis e geleia real as quais são transmitidas em parte pela abelha rainha. O melhoramento genético se faz necessário a melhoria da produtividade e deve ser realizado por meio da produção de zangões e abelhas rainhas selecionadas (KERR, 1972). Entre as várias ferramentas de seleção, podem se destacar a seleção massal ou a que se utiliza meios genéticos, como marcadores moleculares.

Entre os vários marcadores utilizados para as abelhas *A. mellifera* utiliza-se os alelos da *Mrjp3*. Por meio da extração de DNA de amostras e, posteriormente, a genotipagem, pode-se avaliar a aptidão de cada colônia e, conseqüentemente, descobrir seus alelos (HOISINGTON; KHAIRALLAH e GONZALEZ-DE-LEON, 1994).

A determinação do genótipo de uma colônia, contribui para a classificação de sua aptidão. Direcionando assim a produção desejada conforme os alelos (PARPINELLI; RUVOLLO-TAKASUSUKI; TOLEDO, 2013). Objetivou-se no presente trabalho o manejo de manutenção das colônias matrizes, a extração de DNA de crias pupas de operárias pré-emergentes e a realização da genotipagem dos marcadores *Mrjp3* das amostras.

Material e métodos

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental de Iguatemi, no Laboratório de Apicultura e Meliponicultura. As análises foram realizadas no Laboratório de Genética Animal. Ambos da Universidade Estadual de Maringá.

Para a produção de rainhas, utilizou-se quatro colônias recrias, com sobreninhos, cada colônia contendo dois quadros porta-cúpulas compostos por dois sarrafos, contendo 28 cúpulas cada um. A produção de rainhas foi de acordo com o método Doolittle (1889). O procedimento para a transferência das larvas ocorreu no laboratório o qual teve a temperatura controlada de 34°C a 36°C e umidade entre 60% e 70%. Para as coletas destinadas a extração de DNA e genotipagem, estas foram realizadas em matrizes identificadas com um código interno M9, M11, M12, M14, M26, M31, M32, M35, M39 e M40, coletando abelhas operárias em período de crias pupas pré-emergência. As amostras foram obtidas em triplicatas contendo 10 indivíduos em cada tubo Falcon, com álcool 70°.

Foram utilizadas as seguintes soluções tampão para extração de DNA: hidroximetilaminometano – ácido clorídrico (TrisHCl); ácido etilenodiaminotetracético (EDTA); Cloreto de Sódio (NaCl) e Dodecil sulfato de sódio (SDS). A extração do DNA consistiu na quebra das membranas celulares das amostras, em cada micro tubo identificado foi adicionado o tórax da abelha juntamente com 400 µL de Tampão de Extração (Tris HCl, EDTA, NaCl e SDS). As amostras foram maceradas e, após, adicionados 8 µL de proteína K, para digerir as proteínas existentes. As amostras foram incubadas em banho maria a 55°C por 60 minutos sendo agitadas a cada 15 minutos e, posteriormente, centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm.

A segunda etapa ocorreu com a limpeza de possíveis contaminantes (proteínas e outras moléculas) foi realizada a pesagem dos micro tubos e a centrifugação das amostras a 12.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionado 1 mL de Etanol 70% gelado e feito a pesagem dos micro tubos. Após o período, ocorreu a novamente a purificação do material com Clorofórmio: Álcool Isoamílico (24:1) e Isopropanol gelado, as amostras permaneceram em overnight no freezer (-20°C). Seguiu-se os mesmos passos anteriores, ao final as amostras foram armazenadas a 4°C durante 3 dias para ocorrer a precipitação do DNA.

O DNA extraído estocado a -80°C até ser utilizado para amplificação na Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR). Por meio de espectrofotômetro Nanodrop® e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e eletroforese em gel de agarose.

A reação de PCR a fim de determinar o tamanho da região *Mrjp3* amplificada com os primers forward (ATG TAA TTT TGA AGA ATG AAC TTG) e reverse (TGT AGA TGA CTT AAT GAG AAA CAC). A reação de amplificação de cada amostra consiste de 20 µL de uma solução com água Milli-Q, tampão de reação 1x Ludwig, 1,75 mM de MgCl₂, 0,5 mM de uma mistura de dNTPs, 0,5 µM de cada primer, 1 U de Taq

polymerase (Promega) e 20 ng de DNA. O protocolo de amplificação é uma desnaturação inicial de 2 minutos a 94 °C, seguidos por 30 ciclos de 30s a 94 °C, 30s a 54 °C e 1 min. a 72 °C. Assim a reação finalizada após 10 minutos a 72 °C. Para determinar o tamanho da região amplificada, 10 µL da alíquota do produto da PCR foram utilizadas na eletroforese em gel de agarose 1,7%.

Resultados e Discussão

Durante as revisões das matrizes foram observados favos com presença de alimento e crias. Ao longo do experimento as quatro colônias recrias receberam suplementação energética (água + açúcar) para simular a entrada de néctar, para manter e aumentar a população. Após o período de adaptação e alimentação, um favo vazio foi inserido no centro de cada colônia matriz, para que a rainha realizasse a postura, assim tornando-se possível encontrar larvas entre zero e 24h.

Realizou-se a diluição de geleia real em água destilada (1:1), depositada uma gota em cada cúpula com uma pipeta Pasteur e uma lanterna, foram selecionadas larvas de até 24h e por fim a transferência das larvas do favo para as cúpulas com ajuda de um transferidor chinês. Após todas as cúpulas preenchidas o quadro porta-cúpulas foi devolvido para a colônia recria envolto em um pano para evitar choque térmico das larvas com o ambiente externo e os quadros porta-cúpulas permaneceram 10 dias dentro da colmeia de produção de rainhas.

Poucas rainhas emergiram, devido a dificuldades de visualização das larvas. Foram comprados óculos apropriados que funcionam como lupa. Com a chegada do inverno, ocorreram dificuldades para a produção de rainhas durante os dias de estiagem e frio.

As coletas realizadas e armazenadas, a extração e genotipagem dos alelos de *Mrjp3* foram realizadas, em cada colônia e foram armazenados em freezer. O protocolo de extração de DNA foi realizado e obteve-se material para realização do PCR (Figura 1).



Figura 1 – a. Identificação de crias pré-emergente. b. Amostras coletadas. c. Micro tubos contendo amostras e uma solução tampão para extração de DNA. d. Amostras na centrífuga.

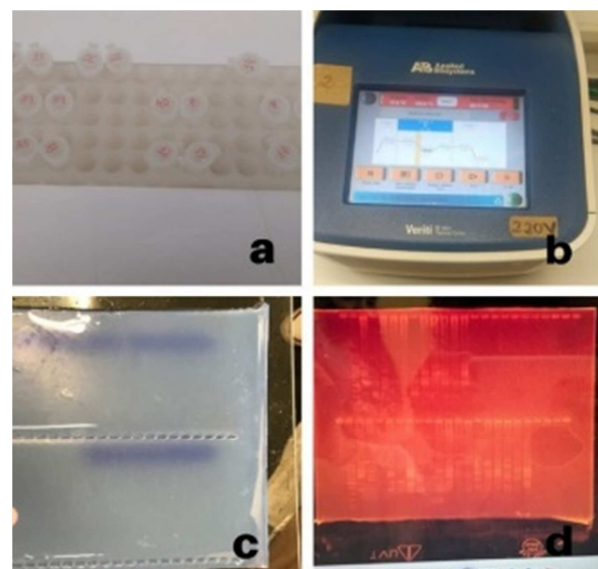


Figura 2 – a. Micro tubos identificados contendo as amostras de DNA; b. Equipamento de realização de PCR; c. Gel de agarose com as amostras de DNA; d. Gel com as bandas dos alelos em etapa final da eletroforese.

O treinamento da realização do PCR e da eletroforese foram concluídas por meio do acompanhamento de análises similares a deste trabalho, conforme Figura 2.

Conclusões

Foram realizados os manejos e a extração do DNA, não sendo possível concluir as análises devido a pandemia, a disponibilidade do laboratório, por fila de agendamento e limite de pessoas para uso, o que acarretou atrasos na conclusão das análises.

Agradecimentos

A Universidade Estadual de Maringá por toda a estrutura fornecida para realização desse projeto e a Fundação Araucária pelo financiamento da pesquisa e a concessão da bolsa. Aos integrantes do grupo de pesquisa com abelhas (GPBee), por todo apoio e ajuda na execução da pesquisa ao longo do período vigente.

Referências

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZALEZ-DE-LEON, D. Laboratory protocols: **CIMMYT applied biotechnology center**. 2nd ed. CIMMYT, México, D.F, 1994.

KERR, W. E. Melhoramento em abelhas. In: CAMARGO, J. M. F. Manual de Apicultura. São Paulo: **Agronômica Ceres**. p. 97-115, 1972.

WIDDICOMBE, J. 2015. **The principles of bee improvement**. Northern Bee Books. p. 86.

PARPINELLI, R.S.; RUVOLO-TAKASUKI, M.C.C.; TOLEDO, V.A.A. MRJP microsatellite markers in Africanized *Apis mellifera* colonies selected on the basis of royal jelly production. **Genetics and Molecular Research**, v.13, n. 3, p. 6724-6733, 2014.