

SEQUENCIAMENTO GÊNICO: PRELÚDIO PARA O ENTENDIMENTO DA DIVERSIDADE DO GÊNERO *Tetragonisca* (HYMENOPTERA, APIDAE)

Gene sequencing: prelude to the understanding of diversity of the genus *Tetragonisca* (HYMENOPTERA, APIDAE)

Bárbara Silva Siqueira Maurício¹; Anderson Fernandes^{1,2}; Wagner Martins Santana Sampaio³; Denilce Meneses Lopes¹; Lucio Antônio de Oliveira Campos¹

1. Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG
2. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade do Estado de Mato Grosso, Tangará da Serra-MT;
3. Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG; diversidadegenetica@gmail.com

Resumo

As abelhas do gênero *Tetragonisca* (Hymenoptera, Apidae), conhecidas por “Jataís”, apresentam problemas no que diz respeito ao *status* taxonômico de suas espécies (*T. angustula* e *T. fiebrigi*) e ao caráter utilizado para tal classificação. Com o objetivo de estabelecer as relações filogenéticas das espécies envolvidas, o presente trabalho tem por objetivo padronizar o processo de amplificação de DNA (via PCR) para sequenciamento. Um teste de gradiente envolvendo os genes selecionados (COI, CytB e EF1a) foi realizado. Após a análise dos produtos de PCR nas 4 temperaturas testadas, foram escolhidas as temperaturas de 52°C para a amplificação de COI e 51°C para os genes CytB e EF1a. O fragmento CytB se mostrou mais variável e com mais autapomorfias quando comparado aos demais. O fragmento de EF1a mesmo sendo o maior fragmento sequenciado, apresentou-se menos variável.

Palavras-chave: Biologia Molecular, Abelhas, PCR.

Abstract

Bees of the genus *Tetragonisca* (Hymenoptera, Apidae), known as “Jataís”, have shown problems regarding the taxonomic status of its species (*T. angustula* and *T. fiebrigi*) and the character used for this classification. In order to establish the phylogenetic relationships of the species involved, this paper aims to standardize the process of DNA amplification (via PCR) for sequencing. A gradient test involving the selected genes (COI, CytB and EF1a) was performed. After the analysis of PCR products on four temperatures tested, two temperatures were chosen for amplification (52 °C for COI and 51°C for CytB and EF1a). The CytB fragment was more variable and showed more autapomorphies compared to the other two. The fragment of EF1a, despite being the largest fragment sequenced, possesses less variability.

Key words: Molecular Biology, Bee, PCR.

Introdução

As abelhas, assim como as formigas e vespas, compõem a ordem Hymenoptera, considerada uma das mais diversas ordens de insetos existentes. São de grande importância comercial devido à produção de mel, cera e própolis. Além disso, de modo geral, são também

indispensáveis para a manutenção dos ecossistemas, uma vez que são as principais polinizadoras de plantas. Acredita-se que esse grupo é responsável por 33 a 90% da polinização de plantas nativas e de várias espécies de plantas cultivadas (KERR et al., 2001).

As plantas também possuem importância para

as abelhas por garantirem recursos como néctar, pólen, resina, proteção aos ninhos, dentre outros, importantes para sua sobrevivência e para a manutenção da colônia. Em se tratando de uma relação recíproca e benéfica para ambas, os estudos envolvendo abelhas são de suma importância para conservação e manutenção do equilíbrio ecológico como um todo.

Dentre os principais grupos de abelhas encontra-se a subtribo Meliponini, formado pelas “abelhas indígenas sem ferrão”, assim denominadas por possuírem um ferrão atrofiado. Os meliponíneos estão distribuídos nas regiões tropicais de todo o globo, além de regiões subtropicais do Hemisfério Sul e, segundo Moure et al. (2007), são formados por 33 gêneros e mais de 300 espécies. São quatro as espécies pertencentes ao gênero *Tetragonisca* (conhecidas popularmente como jataí), sendo que apenas três destas são encontradas no Brasil (*T. weyrauchi*, *T. angustula* e *T. fiebrigi*). Estas duas últimas são identificadas através da diferenciação de uma estrutura no tórax, o mesepisterno, que apresenta cor preta em *T. angustula* e amarela em *T. fiebrigi*. Até pouco tempo, estas espécies eram consideradas por alguns autores como sendo duas subespécies (*T. angustula angustula* e *T. angustula fiebrigi*). Estudos citogenéticos envolvendo duas populações simpátricas de *T. angustula* e *T. fiebrigi* verificaram a presença de um cromossomo supra numerário apenas na população da espécie *T. fiebrigi*, sendo este fato assumido com indicativo de ausência de fluxo gênico entre estas populações.

Estudos envolvendo técnicas citogenéticas sugeriram a elevação taxonômica das subespécies uma vez que não foram verificados indícios de fluxo gênico entre elas (BARTH et al., 2010).

Com o intuito de validar a classificação taxonômica e estabelecer as relações filogenéticas entre as espécies do gênero, foram padronizadas as condições ótimas de realização das amplificações de três genes para o sequenciamento e também a caracterização dos fragmentos sequenciados.

Materiais e Métodos

Amostras e extração de DNA

Foram coletados indivíduos adultos de duas colônias *Tetragonisca angustula* (oriundas de Viçosa-MG e Redenção-PA), uma de *Tetragonisca fiebrigi* (Tangará da Serra-MT) e uma de *Tetragonisca weyrauchi* (Rio Branco-AC). As amostras foram imersas em etanol absoluto e estocadas em freezer a -20°C. As espécies foram identificadas e amostras testemunhas se encontram depositados na coleção do Apiário da Universidade Federal de Viçosa (Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil) sob os seguintes números de tombo: TAMG52, TFMT52, TOPA20 e TWAC40.

A extração do DNA total das operárias foi realizada conforme o protocolo recomendado por Michalsky et al. (2002). A quantificação e verificação da integridade e pureza do DNA foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, contendo 0,2 µg/ml de GelRed™ (Biotium).

Reação em Cadeia da Polimerase e Sequenciamento

Para teste de gradiente de temperatura de anelamento dos primers para a amplificação dos fragmentos dos genes Citocromo c Oxidase subunidade 1 (COI, primers: 5'-TAACTTCWGGATGWCCAAAAATCA-3' e 5'-TATCWACHAATCATAAAAATMTTGG-3'), Citocromo B (CytB, primers: 5'-TCGTTAATTCAYATAAATGGAGC-3' e 5'-ATTACWCCTCCTAATTATTWGAAT-3', desenhados por Helder Canto Resende e Henrique Batalha-Filho baseados no genoma de *Melipona bicolor*) e Fator de Elongação da Tradução (EF1a, primers: 5'-ATTACWCCTCCTAATTATTWGAAT-3' e 5'-TTGCAAAGCTTCRTGRTGCATTT-3' desenvolvido por KAWAKITA et al., 2003), adotou-se as seguintes condições de reação: uma mistura de 50µL contendo MgCl₂ 2,0 mM; Tris/HCl 10 mM/50 mM; 2 mM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP); 4 mM de cada um dos primers (reverse e forward), 1 unidade de Taqpolimerase (Promega®) e 50ng de DNA genômico. A reação foi realizada por um termociclador Eppendorf® (Modelo Mastercycler Gradient) seguindo

as seguintes etapas: um passo inicial de 3 min. a 95°C, seguido de 35 ciclos de 1 min. a 95°C para desnaturação do DNA, 1 min. e 20 seg. a 49 ou 51 ou 52 ou 53°C para pareamento dos *primers* e 1 min e 20 seg. a 72°C para alongamento. Ao final dos 35 ciclos um passo extra de extensão (10 min. a 72°C) foi realizado. Uma alíquota de 5µL dos produtos PCR foi corados com GelRed™ (Biotium) e submetida à eletroforese em gel de agarose 1% para averiguar a qualidade e quantidade do produto de PCR. Posteriormente estes foram sequenciados em sequenciador automático (MegaBace™ 500, GE Healthcare).

Análise das sequências

A sequência consenso das fitas *forward* e *reverse* (*contigs*) foi obtida e editada para cada amostra pelo programa DNA Baser™ (versão 3.5.0). Apenas os segmentos de alta qualidade foram selecionados para a análise. Os *contigs* foram alinhados utilizando o programa Mega, versão 5.05 (TAMURA et al. 2011), por meio do algoritmo Clustal W (HIGGINS et al. 1994, THOMPSON et al., 1994) implementado ao Mega. Todas as sequências foram inspecionadas à procura de códons de parada prematuros.

Resultados

Após a eletroforese dos produtos de PCR (Figura 1) usando quatro temperaturas de anelamento do primer, foram escolhidas as temperaturas de 52°C para a amplificação de COI, e 51°C tanto para o gene CytB quanto para EF1a. Os critérios de escolha foram, em primeiro lugar, ausência de bandas inespecíficas e

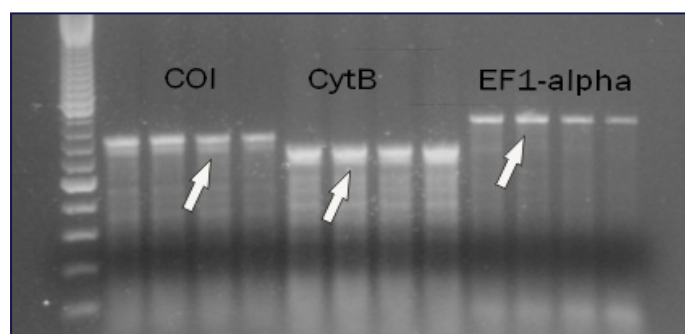


Fig.1- Eletroforese dos produtos de PCR dos genes COI, CytB e EF1a amplificados em diferentes temperaturas. Setas indicam a temperatura escolhida para cada gene.

em segundo, intensidade da banda.

A execução do algoritmo de busca BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL, et al. 1997) junto ao banco de dados do *National Center For Biotechnology Information* (NCBI) com as sequências dos três genes confirmou que se tratava de genes de abelhas, posto que todos obtiveram alta similaridade a fragmentos de outras espécies da mesma tribo. Os tamanhos médios dos fragmentos dos genes COI, CytB e EF1a sequenciados foram de 596, 600 e 783 pares de bases, respectivamente (Figura 2 e Tabela1). O fragmento CytB se mostrou mais variável e com mais autapomorfias quando comparado aos demais. O fragmento de EF1a, mesmo sendo o maior fragmento sequenciado, apresentou maior grau de conservação. Foi possível verificar uma predominância de bases AT (81,0% para COI, 79,1% para CytB e 60,3% para EF1a). Não foi verificada a presença de códons de terminação prematuros ou deleções envolvendo um ou dois pares de bases ao longo dos fragmentos.

Discussão e Conclusões

Os resultados obtidos pela execução do BLAST excluem a possibilidade de contaminação do material com DNA de outros organismos, o que implica em eficiência no protocolo de extração utilizado.

Quando o tamanho dos fragmentos utilizados no presente trabalho são comparados com os genes COI e CytB completos de *Melipona bicolor* (Silvestre et al., 2008; acesso pelo GenBank: AF466146.1), estes fragmentos abrangem 57% e 29,7% respectivos genes completos. Sendo que o fragmento de COI se posiciona na porção inicial do gene e o fragmento de CytB na porção mediana (Figura 1). A predominância de bases AT para ambos os genes mitocondriais já era esperada para abelhas (CROZIER & CROZIER, 1993; DICK et al., 2004, SILVESTRE et al, 2008; BATALHA-Filho et al, 2010, LOPES, 2008 e FERREIRA, 2011) e insetos de uma forma geral (SHIN et al,2006; NAKAMINE e Takeda, 2008).

O fato de não haver nenhum códon de

	Temp. ótima	Nº sítios	Sítios Conc.	Sítios Var.	PI	ST	%			
							T	C	A	G
COI	52°C	596	552	45	7	38	48,4	11,4	30,7	9,5
CytB	51°C	600	520	80	8	72	49,32	10,1	31,8	8,9
EF1-a	51°C	783	764	18	16	2	31,9	17,8	28,4	21,9

Tabela 1. Relação dos genes analisadas indicando, temperatura ótima de anelamento dos primers, número de sítios sequenciados, conservados, variados, parcimoniosamente informativos (PI), autoapomórficos (ST) e porcentagem de bases T, C, A e G.

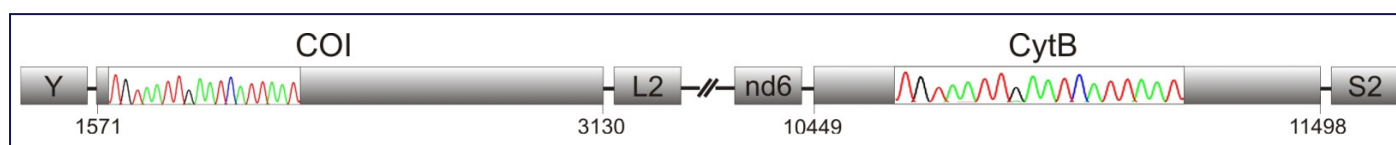


Fig.2- Esquema estrutural em escala dos genes COI e CytB posicionados no genoma mitocondrial. O comprimento totais em pares de base dos genes COI e CytB são de 1559 e 1049, respectivamente. O gene COI se encontra intercalado pelos RNAs transportadores de Leucina e Tirosina (tRNATYR tRNALEU, respectivamente), já o CytB intercalados pelos genes NADH desidrogenase subunidade 6 (nd6) e tRNASER (S2).

terminação ou deleção (envolvendo um ou dois pares de bases) depois de alinhados, afasta a possibilidade de os fragmentos serem pseudo-genes mitocondriais localizados no genoma nuclear (*Numts*), segundo proposta de análise de Cristiano, et al (2012). Foi possível verificar para o fragmento de Ef1- α uma alta taxa de sítios conservados, o que possivelmente se constituirá um problema para a reconstrução da filogenia do grupo, uma vez que não proporcionará diferenças suficientes para separação do mesmo. De resto, a alta conservação de genes nucleares, quando comparados aos mitocondriais, já era esperada. Avise (2009) ressalta este aspecto e o atribui ao fato de o DNA nuclear ser monitorado por um mecanismo mais eficiente de reparo, estar em um ambiente menos rico em agentes oxidantes e se encontrar em íntima associação com histonas, o que restringiria as taxas de mutação, quando comparado com o DNA mitocondrial.

Em suma, o estabelecimento das temperaturas ótimas de anelamento dos primers otimizou o processo de sequenciamento e os genes COI e CytB se mostraram bons candidatos para serem utilizados nas reconstruções filogenéticas do grupo *Tetragonisca*. O mesmo não se aplica para o gene nuclear EF1a que, por se apresentar muito conservado, provavelmente não fornecerá variação suficiente entre as amostras para o estabelecimento de suas relações filogenéticas.

Agradecimentos: Somos gratos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e as Fundações de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Mato Grosso (FAPEMAT) pelo suporte financeiro.

Bibliografia

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**(17): 3389-3402.
- Avise JC. (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal Biogeography*, **36**: 3-15.
- Barth A, Fernandes A, Pompolo S, Costa M. (2010) Occurrence of B-chromosomes in *Tetragonisca* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponini): a new contribution to the cytotaxonomy of the genus. *Genetics and Molecular Biology*, **34**(1): 77-79.
- Batalha-Filho H, Melo GAR, Waldschmidt AM, Campos LAO, Fernandes-Salomão TM. (2009) Geographic distribution stripes of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae). *Zoologia*, **26**(2): 213-219.
- Cristiano MP, Fernandes-Salomão TM, Yotoko KSC. (2012) Nuclear mitochondrial DNA: na Achille's

heel of molecular systematics, phylogenetics, and phylogeographic studies of stingless bees. *Apidologie*, **40**(5): 515-594.

Crozier RH, Crozier YC. (1993) The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and the genome organization. *Genetics*, **133**: 97-117.

Dick CW, Roubik DW, Gruber KF, Bermingham E. (2004) Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. *Molecular Ecology*, **13**: 3775-3785.

Ferreira KM. (2011) A colonização de uma área por espécies de abelhas sem ferrão. Um estudo de caso: *Partamona helleri* (Friese, 1990) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Dissertação de Mestrado* - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP.

Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**: 4673-4680.

Kawakita A, Sota T, Ascher JS, Ito M, Tanaka H, Kato M. (2003) Evolution and phylogenetic utility of alignment gaps within intron sequences of three nuclear genes in bumble bees (*Bombus*). *Molecular Biology and Evolution*, **20**: 7-92.

Kerr WE, Carvalho GA, Silva AC, Assis MGP. (2001) Aspectos poucos mencionados da biodiversidade amazônica. *Biodiversidade, pesquisa e desenvolvimento*

da Amazônia. Parcerias Estratégicas, **12**: 21-41.

Lopes DM. (2008) Análise moleculares em *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae). *Tese de Doutorado* - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias ES. (2002) Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Plebotominae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **44**: 255-259.

Moure JS, Urban D, Melo GAR (Orgs). (2007) *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) na Região Neotropical*. Curitiba, Brasil: Sociedade Brasileira de Entomologia, 1054 pp.

Silvestre D, Downton M, Arias MC. (2008) The mitochondrial genome of the stingless bee *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Sequence, gene organization and a unique tRNA translocation event conserved across the tribe Meliponini. *Genetics and Molecular Biology*, **31**(2): 451-460.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 1596-1599.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**: 4673-4680.