

## POLIMORFISMO DO 16S mtDNA POR LIS-SSCP EM *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI)

### POLYMORPHISM OF THE 16S mtDNA FOR LIS-SSCP IN *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI)

Ana Carolina Silva SIQUIEROLI<sup>1</sup>; Carlos Ueira VIEIRA<sup>2</sup>; Juliana Almeida CÔBO<sup>3</sup>; Flávia Assumpção SANTANA<sup>4</sup>; Jamil TANNÚS-NETO<sup>5</sup>; Ana Maria BONETTI<sup>6</sup>; Warwick Estevam KERR<sup>7</sup>

**RESUMO:** A técnica de *Low Ionic Strength Single-Strand Conformation Polymorphism* (LIS-SSCP) foi desenvolvida, como forma de detectar mutação em fita simples de DNA. Esta técnica consiste basicamente na separação de fragmentos de DNA de fita simples por desnaturação, por meio de uma solução de baixa força iônica (LIS) a base de sacarose. Utilizou-se a técnica de LIS-SSCP para estudar populações de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 quanto à presença de variações do 16S mtDNA. Estas populações foram introduzidas no Meliponário Uberlândia, Uberlândia-MG, em diferentes períodos de tempo, colônias K (introduzidas em 1987) e colônias AB e N (introduzidas em 1999 e 2000 respectivamente). Os resultados não mostraram variações no 16S mtDNA entre as colônias K e colônias AB e N, embora houvesse nítidas diferenças morfológicas e comportamentais entre elas.

**UNITERMOS:** *Melipona scutellaris*, 16S rRNA mtDNA, Polimorfismo, LIS-SSCP.

## INTRODUÇÃO

A família Apidae está subdividida em quatro subfamílias: Apinae, Meliponinae, Bombinae, Euglossinae, sendo os Meliponinae os polinizadores principais de 40 a 90% da flora nativa (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996) e, portanto, responsáveis, em parte, pela manutenção da biodiversidade. A subfamília Meliponinae dividiu-se em duas tribos Trigonini, com diversos gêneros e Meliponini, com apenas o gênero *Melipona* (KERR, 1948; KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996).

A *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 ('Uruçu do Nordeste' ou 'Uruçu do Campo') é encontrada da

Bahia até o Rio Grande do Norte, ocupando principalmente a Zona da Mata (CARVALHO, 1996).

A técnica de *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) foi desenvolvida por Orita et al. (1988), como forma de detectar mutação em fita simples de DNA. Maruya; Saji e Yokoyama (1996) otimizaram a técnica, propondo o uso de um tampão de desnaturação composto por uma solução de baixa força iônica (LIS), a base de sacarose. A partir disso, a técnica passou a ser denominada de *Low Ionic Strength Single-Strand Conformation Polymorphism* (LIS-SSCP). As fitas desnaturadas adquirem uma nova conformação e alcançam uma nova estabilidade de acordo com a sua seqüência específica e peso

<sup>1</sup> Aluna de Iniciação Científica-PIBIC - INGEB/Universidade Federal de Uberlândia - Laboratório de Genética, e-mail: carolsiquieroli@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Mestrando em Genética e Bioquímica - INGEB/Universidade Federal de Uberlândia - Laboratório de Genética, e-mail: ueira@hotmail.com

<sup>3</sup> Mestre em Genética e Bioquímica - INGEB/Universidade Federal de Uberlândia - Laboratório de Genética, e-mail: cbjuliana@hotmail.com

<sup>4</sup> Mestre em Genética e Bioquímica - INGEB/Universidade Federal de Uberlândia - Laboratório de Genética, e-mail: fassantana@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Doutorando em Biologia Tropical e Recursos Naturais/Entomologia - INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/GPA - Abelhas e-mail: jtannus@inpa.gov.br

<sup>6</sup> Professora Titular, Doutora, Pesquisadora do Instituto de Genética e Bioquímica - Universidade Federal de Uberlândia - Laboratório de Genética, e-mail: ambonetti@hotmail.com

<sup>7</sup> Doutor, Pesquisador do Instituto de Genética e Bioquímica - Universidade Federal de Uberlândia - Laboratório de Genética, e-mail: kerr@ufu.br

Received 27/02/04 Accept 25/11/04

molecular, o que confere uma migração diferencial em gel de poliacrilamida.

Este trabalho teve como objetivo analisar, por meio da técnica de LIS-SSCP, um fragmento de 580 pares de base (pb) da região 16S mtDNA, para comparar populações de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 introduzidas em 1999 e 2000, com populações mantidas no Meliponário Uberlândia desde 1987.

## MATERIAL E MÉTODOS

Abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 provenientes de Catu (litoral da Bahia – S 12° 21'; W-GR 38° 23'); Lençóis (Chapada Diamantina-BA – S 12° 34'; W-GR 41° 23'); Piatã- BA (S 13° 8'; W-GR 41° 46') e de Andaraí (Chapada Diamantina-BA – S 11° 41'; W-GR 40° 38') são mantidas no Meliponário Uberlândia (Uberlândia-MG – S 18° 55'; W-GR 48° 17').

As abelhas utilizadas nesse estudo foram divididas em três grupos, de acordo com o período em que foram introduzidas no Meliponário: colônias K que estão no Meliponário desde 1987, colônias AB, mantidas no Meliponário desde agosto de 1999 e colônias N, que passaram a integrar o Meliponário em Outubro de 2000.

Esse estudo originou-se da observação de diferenças morfológicas registradas por Tannús-Neto (2001) referentes à coloração das nervuras das asas, dos pêlos do tórax, do escutelo, do clipeo, dos olhos, da tibia e das corbículas, além de diferenças comportamentais, evidenciadas pela diferença de defensividade quando da revisão periódica das colméias, entre as colônias K e as mais recentes (AB e N), sendo que essas últimas apresentam uma maior defensividade.

Por meio da técnica de LIS-SSCP, analisou-se um fragmento de 580 pb da região 16S mtDNA, para comparar populações de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 introduzidas em diferentes períodos de tempo.

Foram feitos *bulks* com cinco indivíduos de cada colônia em estudo. As abelhas foram coletadas na entrada de cada colméia e conservadas em ultrafreezer a -80°C, até o momento da extração do DNA, que foi realizada segundo protocolo Sheppard; Steck e McPheron (1992).

O DNA foi quantificado por absorvância a 260nm em espectrofotômetro Hitachi U-2000 e sua qualidade avaliada submetendo-se 5 $\mu$ l (aproximadamente 500ng) do DNA à eletroforese em agarose 1% (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Constatada a qualidade do DNA, as reações de amplificação foram processadas com: 50ng de DNA, 6pmoles de cada *primer*, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 1U de *Taq* DNA polimerase, tampão 1X e 100iM de cada dNTPs. As condições de amplificação

foram: 94°C a 5min., seguido de 35 ciclos de 94°C por 30seg., 48°C por 30seg. e 72°C 1min., seguidos de 72°C por 10min. Os produtos das amplificações foram desnaturados em tampão LIS a 95°C por 5min., separados em gel de poliacrilamida 12% por 18h a 15mA e visualizados por coloração com nitrato de prata de acordo com Blum; Beir e Gross (1987), com modificações de Basam; Caetano-Anolees e Gresshoff (1991).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra o resultado da análise por LIS-SSCP do fragmento do 16S mtDNA entre as colônias K, AB e N de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, no qual não se verifica variações. Isso pode ser devido à baixa taxa de mutações nesse gene, que é considerado altamente conservado, já que codifica a subunidade maior do rRNA mitocondrial. Apesar disso, alguns trabalhos revelam que essa região tem apresentado polimorfismo suficiente para separar subespécies ou até mesmo populações, com auxílio da técnica de SSCP.

Carvalho (2000) estudou 29 populações de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, provenientes de quatro Estados brasileiros, onde essa espécie é nativa: Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, analisando a presença de polimorfismos do 16S mtDNA por meio da técnica de SSCP. Os resultados obtidos estão de acordo com os encontrados nesse estudo, já que não houve variações entre as 29 populações analisadas.

No entanto, Oliveira et al. (1999) utilizando a técnica de SSCP, mostraram polimorfismos no mtDNA em 30 amostras de *Tetragonisca angustula* ao longo da América Latina. Foram obtidos quatro haplótipos diferentes para um fragmento da subunidade 16S mtDNA. Os autores concluem que a técnica de SSCP foi eficiente na detecção de polimorfismos.

Vasconcelos et al. (1998) também utilizando essa técnica, analisaram a ocorrência de polimorfismos no 16S mtDNA em populações de *Melipona rufiventris*, conseguindo a diferenciação entre haplótipos. O mesmo foi obtido por Côbo et al. (1999) em *Frieseomelitta varia*.

Nascimento; Vasconcelos e Kerr (1999) analisando seis espécies de *Melipona* (*M. scutellaris*, *M. capixaba*, *M. compressipes*, *M. quadrifasciata*, *M. bicolor* e *M. rufiventris*) para a região 16S mtDNA e gene COI-COII do mtDNA, usando a técnica SSCP, encontraram polimorfismos variáveis entre as espécies.

Com a mesma técnica Vasconcelos; Nascimento e Kerr (1999) conseguiram diferenciar as subespécies *M. quadrifasciata quadrifasciata* e *M. quadrifasciata anthidioides*.

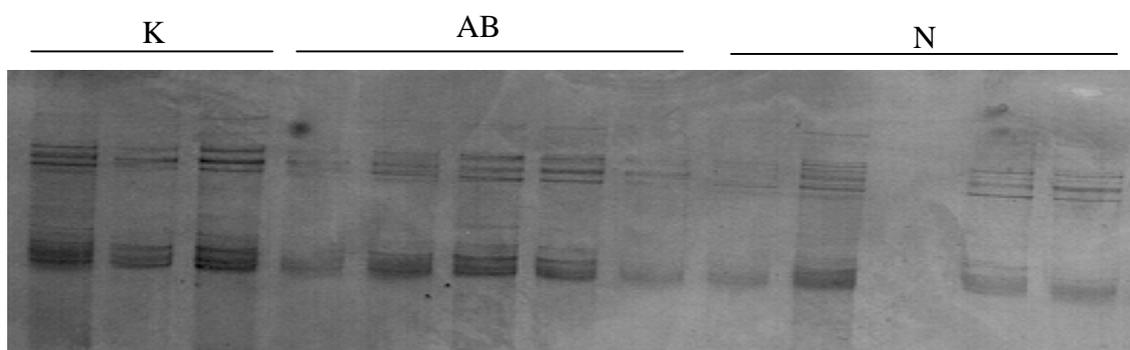
O aparecimento de mais bandas que as duas esperadas pela técnica (Figura 1) mesmo não sendo vistas bandas inespecíficas no gel de agarose, pode ser explicado pelo uso de *primers* heterólogos. Apesar das bandas inespecíficas, verifica-se um padrão que se conserva, demonstrando a ausência de variações entre os grupos analisados, para essa região do mtDNA em *Melipona scutellaris* Latreille, 1811.

## CONCLUSÃO

Os resultados mostram que não houve variação no 16S mtDNA, pela técnica de LIS-SSCP, entre os grupos K, AB e N, o que confirma o grau de conservação do gene 16S mtDNA que, freqüentemente, é utilizado para estudos filogenéticos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG o apoio financeiro ao trabalho.



**Figura 1.** Perfil eletroforético de LIS-SSCP da região 16SmtDNA de *Melipona scutellaris* em gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata. COLÔNIAS K: introduzidas no Meliponário em 1987; COLÔNIAS AB e N: introduzidas no Meliponário em 1999 e 2000 respectivamente.

**ABSTRACT:** The *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) is a technique that was developed to detect mutations in single strand DNAs. This technique consists in separating the single strand DNA fragments by their desnaturation using a low ionic strength (LIS) solution which is composed of sucrose. We use the LIS-SSCP technique with the purpose to study populations of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, about the presence of 16S mtDNA variations. The populations were introduced in the Uberlândia Meliponary (Uberlândia-MG, Brazil) in different periods of time, colonies K (introduced in 1987) and colonies AB and N (introduced in 1999 and 2000 respectively). The results had not shown variations between the colonies K, AB and N, although it had clear morphologic and behavioral differences between these colonies.

**UNITERMS:** *Melipona scutellaris*, *16SrRNAmDNA*, *Polimorphism*, *LIS-SSCP*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASAN, B. J.; CAETANO-ANOLEES, G.; GRESSHOFF, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytic Biochemical*, New York, v. 196, n. 1, p. 80-83, Jul. 1991.

BLUM, H.; BEIR, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gel. *Electrophoresis*, p. 93-99, 1987.

CARVALHO, G. A. **Monitoramento dos alelos Sexuais XO em uma população Finita de *Melipona scutellaris* (APIDADE, MELIPONINI)**. 1996. 51 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1996.

CARVALHO, G. A. **Contribuição à reprodução da *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) e suas conseqüências**. 2000. 109 f. Tese (Doutorado em Genética) – Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2000.

CÔBO, J. A.; MUNIZ, C. F.; OLIVEIRA, R. C.; KERR, W. E. LIS-SSCP da região 16S RNAr mitocondrial de *Friseomelitta varia* (Apidae, Meliponinae). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45., 1999, Gramado, RS. **Anais..**, Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1999. p. 379.

KERR, W. E. Estudos sobre o gênero *Melipona*. In ANAIS DA ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”, 5., 1948, Piracicaba, SP. **Anais..**, Piracicaba: Universidade de São Paulo, 1948. p. 182-276.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. (org.) **Abelha Uruçu: biologia, manejo e conservação**. Belo Horizonte: Fundação Acangaú, 1996. 144 p.

MARUYA, E.; SAJI, H.; YOKOYAMA, S. **PCR-LIS-SSCP (Low Ionic Strength Single-Stranded Conformation Polymorphism): a simple method for high-resolution allele typing of HLA- DRB1, -DQB1, and -DPB1**. [S.l.: s.n.], 1996.

NASCIMENTO, V. A.; VASCONCELOS, S. M.; KERR, W. E. Variação mitocondrial em espécies de *Melipona* (Hymenoptera, Apidae) por SSCP. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45., 1999, Gramado, RS. **Anais..**, Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1999. p. 377.

OLIVEIRA, R. C.; VASCONCELOS, S. M.; BRANDÃO, V. S.; GOULART, L. R. KERR, W. E. LIS-SSCP do 16S RNAr mitocondrial em *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Apidae, Meliponinae). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45., 1999, Gramado, RS. **Anais..**, Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1999. p. 367.

ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKEYA, T. **Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms**. [S.l.: s.n.], 1988.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SHEPPARD, W. S.; STECK, G. J.; MCPHERON, B. A. **Experimentia**, v. 48, p. 1010-1013, 1992.

TANNÚS-NETO, J. **Mofologia comparada de operárias, machos e rainhas de abelha uruçu *Melipona scutellaris* Latreille 1811**. 2001. 156f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2001.

VASCONCELOS, S. M.; OLIVEIRA, R.C.; CAMPOS, A. P. S.; NASCIMENTO, V. A.; CARVALHO, G. A.; KERR, W. E.; GOULART, L. R. Caracterização de divergência mitocondrial em populações de *Melipona rufiventris* por SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 44., 1998, Águas de Lindóia, SP. **Anais..**, Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1998. p. 367.

VASCONCELOS, S. M.; NASCIMENTO, V. A.; KERR, W. E. determinação de polimorfismo no gene mitocondrial 16S RNAr em *Melipona quadrifasciata* Lep., por SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45., 1999, Gramado, RS. **Anais..**, Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1999. p. 378.