



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CAMPUS DE PATOS – PB  
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.**

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE  
ABELHAS SEM FERRÃO (*Frieseomelittadoederleini*)**

**DANIELLE CRISTINA DE LUNA**

Patos–PB

2011

**DANIELLE CRISTINA DE LUNA**

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE  
ABELHAS SEM FERRÃO (*Frieseomelittadoederleini*).**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos/PB, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia Almeida de Melo**

Patos – PB

2011

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO CSTR  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CAMPUS DE PATOS - PB

L961a

2011

Luna, Danielle Cristina

Avaliação de técnicas de extração de DNA de abelhas  
sem ferrão(*friseomelittadoederleini*) / Danielle Cristina

Luna. - Patos - PB: UFCG/CSTR/UACB, 2011.

32f. : il. Color.

Inclui Bibliografia.

Orientador (a): Márcia Almeida de Melo

(Graduação em Licenciatura em Ciências  
Biológicas), Centro de Saúde e Tecnologia Rural,  
Universidade Federal de Campina Grande.

1- Biologia molecular 2 - Abelha. 3 - Extração de DNA.

CDU: 577.2

**DANIELLE CRISTINA DE LUNA**

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE  
ABELHAS SEM FERRÃO (*Frieseomelittadoederlein*).**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos/PB, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

**APROVADA em: 17 de junho de 2011**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Márcia Almeida de Melo**  
**UFCG – Orientadora**

---

**Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. Carlos Eduardo Alves Soares**  
**UFCG - 1<sup>º</sup> Examinador**

---

**Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. Paulo Paes de Andrade**  
**UFPE -2<sup>º</sup> Examinador**

**Patos – PB**  
**2011**

## **DEDICO**

Ao meu Deus,

A minha mãe, Maria Cáscia de Luna,

Ao meu noivo, DaercioAdam de Araújo Lucena,

Aos meus tios, Elinete Luna Andrade e Roberto Andrade,

A minha orientadora, Marcia Almeida de Melo.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu Deus, por sua presença em minha vida, por todo amor e cuidado que tens demonstrado a mim.

A minha orientadora, Marcia Almeida de Melo, sem a qual nada teria sido feito. Obrigada por todas as vezes que com paciência me tranquilizou dizendo que tudo ia dar certo, obrigada também por todo seu carinho e sua amizade.

A minha mãe, Cáscia Luna minha joia rara, que foi um suporte para que eu concluísse mais essa etapa em minha vida.

A Daercio Adam de Araújo Lucena, por suas palavras de incentivo e suas incansáveis viagens a Santana do Seridó para fazer minhas coletas.

Ao professor Fernando César Vieira Zanella, que foi um grande incentivador desse projeto.

Ao professor Paulo Paes, por todas as sugestões valiosas dadas ao trabalho.

A Tereza, por sua ajuda e preocupação com o projeto.

A Aline, Espedito, Vanessa e toda equipe do laboratório que são pessoas maravilhosas.

Ao professor Vicente Queiroga, por sua colaboração no início desse trabalho.

Ao Sr. Cristóvão por permitir que algumas coletas fossem realizadas em seu Sítio.

Ao Sr. Ezequiel por permitir que algumas coletas fossem realizadas em sua propriedade.

Agradeço Universidade Federal de Campina Grande.

Ao Cnpq, pela bolsa de estudo concedida.

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO I</b>	<b>PÁGINAS</b>
Figura 1- Mapa da região nordeste com a distribuição da espécie <i>Frieseomellitadoederleine</i> , segundo (OLIVEIRA, 2003).	7
Figura 2- Tamanho corporal da abelha <i>Frieseomellitadoederleine</i> .	7
Figura 3-Abelha guarda na entrada do ninho.	8
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>PÁGINAS</b>
Figura 4-Imagem de satélite da Fazenda Morada da Jandaíra, com a área em estudo destacada no retângulo. Os pontos em vermelho georreferenciam os ninhos onde foram coletadas as abelhas (Fonte: Google Earth.com).	21
Figura 5- Coleta das amostras de <i>Frieseomelittadoederleine</i> com rede entomológica na entrada do ninho.	21
Figura 6 - Tórax das abelhas sendo separado para extração do DNA.	22
Figura 7-Imagens mostrando a separação da amostra em fases aquosa (transparente, contendo o DNA) e a orgânica (azul, contendo proteínas e lipídios) após extração com Brazol®.	23
Figura 8-Resultados das médias diárias da quantidade de DNA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) extraídas com Brazol® nos Grupos 1, 2, 3, 4.	27
Figura 9- Resultados das médias diárias do grau de pureza de DNA(A260/A280) extraídas com Brazol®, nos Grupos 1, 2, 3, 4.	28
Figura 10-Resultados das médias diárias da quantidade de DNA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) extraídas com sílica nos Grupos 5, 6, 7, 8.	28
Figura 11- Resultados das médias diárias do grau de pureza de DNA(A260/A280) extraídas com sílica nos Grupos 5, 6, 7, 8.	29
Figura 12- Visualização em gel de agarose 1,5% do DNA de <i>F. doederleine</i> extraído com Brazol® (G1-G4) e sílica fracionada (G5-G6), UFCG (2011).	30

## LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINAS
Tabela 1. Média do resultado da extração de DNA ( $\mu\text{g/mL}$ ) de abelhas congeladas e desidratadas através do Brazol® e da sílica fracionada, com mercaptoetanol apenas no tampão de lise ou adicionado no momento da extração.	
Tabela 2. Média do grau de pureza do DNA de abelhas congeladas e desidratadas extraído com Brazol® e sílica fracionada, com mercaptoetanol apenas no tampão de lise ou adicionado no momento da extração.	26
Tabela 3. Comparação dos resultados da quantidade de DNA ( $\mu\text{g/mL}$ ) e do grau de pureza do Grupo 1 (Brazol®) e do Grupo 8 (sílica fracionada), UFCG (2011).	27
	29

## SUMÁRIO

Capítulo I	1
1 Introdução Geral	2
2 Referencial Teórico	3
A Caatinga	3
Os impactos ambientais sobre a fauna de abelhas da Caatinga	4
Estudos sobre a fauna de abelhas da Caatinga	5
O gênero <i>Friseomelitta</i>	6
Técnicas moleculares	8
Marcadores moleculares	8
DNA mitocondrial (DNAMt)	9
Os microssatélites	10
Estudos moleculares em abelhas	10
3 Referências	12
Capítulo II	16
Resumo	17
Abstract	18
1 Introdução	19
2 Objetivos	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 Material e métodos	20
3.1 Local de coleta das abelhas	20
3.2 Material biológico	21
3.3 Extração de DNA	22
3.3.1 Extração com Brazol®	22
3.3.1.1 Protocolo 1	22
3.3.1.2 Protocolo 2	23
3.3.2 Extração com sílica	24
3.3.2.1 Protocolo 3	24
3.3.2.2 Protocolo 4	24

3.4 Análise estatística	25
4 Resultados e discussão	26
5 Conclusão	30
6 Referências	31

# CAPITULO I

## 1 INTRODUÇÃO

O atual estado de degradação dos ambientes naturais e os níveis de desmatamentos ainda crescentes em diversas regiões têm sido alguns dos fatores que preocupam ambientalistas quando o assunto é diminuição da biodiversidade. Dada a falta de conhecimento de grande parte desta abundância de espécies tanto vegetal como animal, esforços para catalogar e explicar essa biodiversidade devem ser priorizados (BICKFORD et al., 2006).

O bioma caatinga é o mais negligenciado dos biomas brasileiros, em diversos aspectos; Embora sempre tenha sido um dos mais ameaçados, devido ao uso inadequado e insustentável do solo e dos recursos naturais, apenas recentemente houve um despertar de diversos setores governamentais e não - governamentais para a grave situação em que se encontra esse bioma. Além da grande necessidade de conservação de seus sistemas naturais, ainda existe uma séria insuficiência de conhecimento científico. (VELOSSO et al., 2002).

Entre tantos grupos de animais importantes para o equilíbrio dos ecossistemas naturais considerando tanto os patamares locais, regionais ou globais, as abelhas requerem especial atenção pela sua enorme diversidade e principalmente por serem importantes polinizadores de ecossistemas naturais e agroecossistemas (KLEIN et al., 2003).

As abelhas nativas conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão estão inseridas na família Apidae, subfamília Meliponinae, tribo Meliponini e subtribo Meliponina (SILVEIRA et al., 2002). O Gênero *Frieseomelitta* possui, distribuição exclusivamente neotropical, com ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o sudoeste do México (Sinaloa) até a Região Sudoeste do Brasil (OLIVEIRA, 2003). A espécie *F.doederleini* está inserida no gênero.

Dentre as ferramentas moleculares mais utilizadas em estudos populacionais, estão o RFLP ( *RestrictionFragmentLengthPolymorphism*), sequenciamento do DNA mitocondrial ( DNAm) e os microssatélites. A maioria dos estudos populacionais realizados em abelhas ainda se restringe a gênero *Apis*. Dentro da ordem Hymenoptera *Apis melífera* foi a primeira e única espécie a ter o genoma mitocondrial e nuclear, totalmente sequenciados. (CROZIER E CROZYER 2003). No entanto, recentemente Silvestre et al. (2008) realizaram o

sequenciamento parcialmente completo da espécie *Melipona bicolor*, abelha altamente eussocial pertencente a tribo Meliponini.

A escolha da técnica de extração de DNA é uma etapa primordial para o sucesso das diversas análises feitas dentro da biologia molecular; As extrações por vezes empregam reagentes prejudiciais à saúde humana a exemplo da mistura fenol- clorofórmio-álcool isoamílico etc. O uso destes reagentes exige cautela em sua preparação e descarte. Uma alternativa consiste na utilização de kits comerciais que reduzem o tempo da extração e aumentam a segurança do pesquisador, além disso, é possível obter DNA com quantidade e qualidade. No entanto, a principal desvantagem é custo elevado.

O sucesso na extração do DNA não vai depender apenas dos reagentes escolhidos, mas também da amostra em estudo. Em 1997, Waldschmidt et al. observaram que a quantidade e pureza de DNA extraído de *Melipona quadrifasciata* sofriam interferência do estágio de desenvolvimento do inseto (adulto ou larva) e dos componentes do tampão de extração. SOUZA et al. (2008) obtiveram DNA de qualidade para realização de PCR-RFLP em abelhas do gênero *Melipona*. Entretanto, o protocolo de extração se baseou no uso de fenol-clorofórmio que são tóxicos.

Com o intuito de se conhecer a estrutura populacional de *Frieseomellitadoederleine*, nosso trabalho tem como objetivo avaliar distintos métodos de extração de DNA que nos forneça DNA de boa qualidade, utilizando reagente comercial e sílicavizando padronizar uma técnica de extração para a espécie que seja de baixo custo e reduza os riscos a saúde do manipulador.

## **2 REFERÊNCIAL TEÓRICO**

### *A caatinga*

O polígono das secas, que compreende a região semiárida do Brasil, está situado em sua maior parte nos estados da região Nordeste, sendo que cerca de 6% se situam na Paraíba (MEDEIROS, 2008). A vegetação típica do semiárido é a Caatinga, corresponde a um tipo vegetacional xerófilo único, ocorrendo somente no Brasil, sendo considerada como uma vegetação de significativa relevância ecológica (AGUIAR et al., 2002). Esse ecossistema

segundo ZANELLA & MARTINS (2003), é o mais negligenciado quanto a conservação de sua biodiversidade.

### *Os impactos ambientais sobre a fauna de abelhas da Caatinga*

A flora da caatinga ocorre em uma paisagem que é um mosaico de distintos tipos vegetacionais, em praticamente toda a escala de observação, e que refletem a heterogeneidade de disponibilidade da água no solo, sofrendo influências de diversos fatores como: topografia, propriedades do solo, material de origem e efeitos microclimáticos e mesoclimáticos (REID et al., 1999). Além dessa variação natural, atualmente um intenso processo de degradação da vegetação, resultando na fragmentação das florestas. Esse processo é particularmente intenso na região do Seridó, considerada um dos quatro núcleos de desertificação do Brasil (SÁ & SÁ, 2008) e que compreende parte do sertão da Paraíba e do Rio Grande do Norte.

É provável que o efeito dessa fragmentação das florestas secas da caatinga seja particularmente impactante sobre a fauna de abelhas eussociais sem ferrão, pois muitas espécies dependem da ocorrência de árvores velhas com ocos para sobreviver. Além disso, essas abelhas não abandonam os ninhos quando necessário, chegando a perecer se as condições não propícias se mantiverem por muito tempo (MICHENER, 1974; ROUBIK, 2006). Na Caatinga, como a disponibilidade de recursos florais durante o período seco é predominantemente garantida por espécies arbóreas (ZANELLA & MARTINS, 2003), essas abelhas necessitam de áreas com cobertura arbórea diversificada que garantam recursos ao longo desse período desfavorável.

Uma das características que dificultam a recomposição das populações em áreas onde foram previamente extintas é que essas abelhas apresentam reduzida capacidade de colonização a longa distância. Essa à baixa capacidade de dispersão através da formação de novas colônias se dá uma vez que as colônias filhas mantêm por certo tempo uma ligação com a colônia mãe. Desse modo, a distância entre elas é muito pequena, não mais que 400 metros (NOGUEIRA-NETO, 1997; ZANELLA, 2005). Por fim, mesmo que, após a extinção local dessas abelhas, uma área volte a oferecer condições propícias para a recolonização, esse processo é limitado (ZANELLA, 2005).

Dados de levantamentos da fauna apícola realizados na região têm revelado um quadro de possível extinção da maioria das espécies desse grupo em muitos locais, inclusive em áreas de preservação mantidas sem exploração a mais de 30 anos e com cobertura florestal relativamente preservada (ZANELLA & MARTINS, 2003). Medeiros (2008), em um estudo etnoentomológico na região de Patos/PB, registrou o desaparecimento de muitas espécies e redução na abundância e distribuição de outras.

O desaparecimento dessas espécies é de importância ecológica, devido ao seu papel na polinização de plantas nativas, e social, pois essas abelhas fazem parte da cultura regional, sendo utilizadas como fonte de mel, cera e pólen (VILELA, 2000, *apud* MEDEIROS, 2008). Sua criação em meliponários é prática relativamente comum, mas na maioria dos casos a exploração se dá pela atividade dos meleiros, que são pessoas com habilidade para localizar e retirar os recursos das colônias. No entanto, usualmente, essa atividade traz prejuízo para as populações naturais, uma vez que causa a morte das colônias.

#### *Estudos sobre a fauna de abelhas da Caatinga*

A fauna de abelhas da Caatinga é relativamente pouco diversificada se comparada à de outras regiões, mas apresenta um componente endêmico significativo (ZANELLA & MARTINS, 2003). Os estudos sobre essa fauna têm revelado idiosincrasias, como espécies endêmicas e interações específicas com sua flora, além de informações relevantes sobre o conhecimento biogeográfico da fauna de abelhas Neotropical (ZANELLA & MARTINS 2003).

As abelhas eussociais sem ferrão tem se tornado um dos grupos de maior preocupação quanto à conservação e preservação.

Segundo Zanella (2000) a fauna de abelhas eussociais da região da Caatinga inclui a *Apis mellifera* L., espécie introduzida, e 20 espécies nativas: *Frieseomelitta aff. flavicornis* (Fabr., 1798); *F. varia dispar* (Moure, 1950); *Geotrigonaxanthopoda* Camargo & Moure, 1996; *Lestrimelittalimao* (Smith, 1863); *Meliponaasilvae* Moure, 1971; *M. mandacaia* Smith, 1863; *M. marginata* Lep., 1836; *M. subnitida* Ducke, 1911; *Paratrigona incerta* Camargo & Moure, 1994; *P. lineatalineata* (Lep., 1836); *Partamona* 3 spp.; *Plebeia mosquito* (Smith, 1863); *P. flavocincta* (Ckll.1912); *Scaptotrigona aff. tubiba* (Smith, 1863);

*Trigona truculenta* Almeida, 1984; *T. groupfusicipennis* Friese, 1900; *T. spinipes* (Fabr., 1793) e *Trigoniscaaff. pediculana* (Fabr., 1804).

Segundo Faria & Lamartine (1964), na região do Seridó foram encontradas onze espécies: entre elas: *Frieseomelitta varia* (Lep.), *Trigonaspinipes*, *Lestrimellitalimao*, *Partamonacupira*, *Meliponasubnitida*, *Tetragoniscajaty* (Sm), *Plebeia sp*, *Plebeia mosquito*, *Cephalotrigonacapitata* (Sm) e *Scaptotrigonatubiba*. No entanto as ações antrópicas têm contribuído para a degradação deste bioma. Em um cenário de fragmentação de habitats, populações anteriormente contínuas são subdivididas em conjuntos de populações locais menores que podem estar isoladas em maior ou menor grau dependendo da distribuição espacial dos fragmentos e do poder de dispersão inerente às espécies (CERQUEIRA et al., 2005).

As alterações no tamanho, forma e distribuição de um habitat natural provocadas pela fragmentação, afetam a taxa de extinção e tamanho das populações locais, assim como o padrão de dispersão de indivíduos entre estas populações. O tamanho reduzido das populações favorece acasalamento entre indivíduos aparentados, ou endocruzamento, processo que contribui para o aumento da similaridade genética entre os indivíduos de uma mesma população (SCHNEIDER et al., 2005).

#### *O Gênero Frieseomelitta*

O Gênero *Frieseomelitta* possui distribuição exclusivamente neotropical, com ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o sudoeste do México (Sinaloa) até a Região Sudoeste do Brasil. São abelhas eussociais, podendo ser encontradas em matas, cerrado, caatinga e regiões montanhosas, chegando até 1600m de altitude (Iguala, Guerrero, México). São geralmente pequenas e delgadas, com aparelho coletor de pólen em forma de corbícula, conhecida popularmente como branca, moça branca, asa branca, entre outros. Aparentemente, não se adaptam ao ambiente antrópico, com poucos registros de coletas em centros urbanos (OLIVEIRA, 2003).

O gênero é composto por 16 espécies das quais 10 estão presentes no Brasil: *Frieseomelitta díspar*, *F. flavicornes*, *F. francoi*, *F. languida*, *F. longipes*, *F. portoi*, *F. silvestrii*, *F. trichocerata* e a *F. doederleini*. (SILVEIRA et al.,

2002). Segundo Oliveira (2003), a espécie *F. doederleine* está distribuída no Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Bahia.

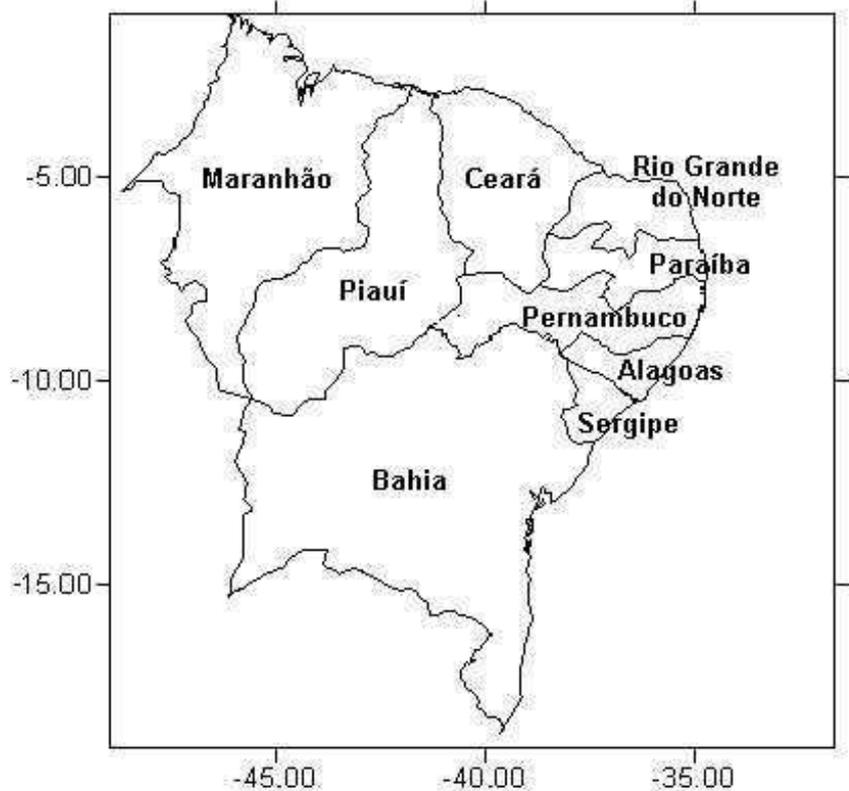


Figura 1. Mapa da região nordeste com a distribuição da espécie *Frieseomellitadoederleine*, segundo (OLIVEIRA, 2003).

A espécie mede em torno de 5,33 mm de comprimento e constrói seus ninhos em cavidades pré-existent de árvores vivas ou mortas. A entrada do ninho caracteriza-se por não possuir tubo externo, porém uma borda pouco aparente, construída com resina clara e endurecida. O orifício de entrada é pequeno (6 mm) dando passagem a uma abelha por vez (OLIVEIRA, 2003).



Figura 2. Tamanho corporal da abelha *Frieseomellitadoederleine*



Figura 3. Abelha guarda na entrada do ninho

### *Técnicas Moleculares*

No âmbito das técnicas de Biologia Molecular, vários métodos diretos têm sido utilizados para investigação da variação genética em populações naturais, tanto de animais como de vegetais, e são particularmente importantes nos casos em que não há registro de variação fenotípica (SCHNEIDER et al., 2005). Essas técnicas ajudam a compreender os eventos ocorridos dentro de populações que, devido a barreiras naturais ou ocasionadas pela ação do homem, podem trazer consequências trágicas à diversidade genética. Populações isoladas ou fragmentadas podem apresentar perda da diversidade genética, devido a fatores como deriva genética, efeito do fundador e redução das trocas genéticas por ausência de migração (PRIMACK & RODRIGUES, 2001). Essa redução da variabilidade genética pode contribuir para a extinção

das espécies e o entendimento das suas causas permite o planejamento de iniciativas conservacionistas, garantindo a sua permanência nos ecossistemas.

### *Marcadores Moleculares*

O conceito de marcadores está intimamente ligado á capacidade humana de definir, com precisão, os fatores genéticos que governam as características fenotípicas de seu interesse. (VIANA et al., 2003) O avanço da biologia molecular tem levado ao desenvolvimento e a introdução de vários tipos de marcadores moleculares. De modo geral, a introdução de novos marcadores reflete uma melhoria contínua na forma de acessar a variação genética (CAIXETA et al., 2009)

A grandevantagem dos marcadores moleculares do DNA, com relação a outros tipos de marcadores, é a sua insensibilidade aos fatores do ambiente e o fato de o DNA estar presente em todas as células do organismo. Eles foram usados pela primeira vez na década de 70, com o desenvolvimento de uma técnica denominada RFLP (*RestrictionFragmentLengthPolymorphism*, ou polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição). Nessa técnica, o DNA de um indivíduo é clivado com enzimas de restrição e os fragmentos são separados de acordo com o seu tamanho, por eletroforese, (VIANA et al., 2003).

Com o advento da tecnologia da amplificação de fragmentos específicos de DNA por intermédio da reação em cadeia da polimerase (PCR), esses métodos evoluíram para o sequenciamento de DNA nuclear e mitocondrial e, posteriormente, para amplificação de marcadores anônimos, como o RAPD e AFLPs e o uso de marcadores específicos como os microssatélites (SCHNEIDER et al., 2005).

Apesar dos diferentes tipos de marcadores genéticos serem desenvolvidos continuamente, nem sempre o últimomarcador desenvolvido é o ideal para o trabalho. Se isso ocorresse, com o surgimento de um novo marcador, os demais não seriam mais utilizados. Segundo Caixeta et al., (2009), a escolha do marcador molecular a ser utilizado depende de uma série de fatores. Para mais detalhes consultar o autor.

Os marcadores moleculares passaram a exercer um importante papel no estudo da diversidade e evolução das abelhas. Dentre as ferramentas

moleculares recentemente mais utilizadas em estudos populacionais, estão o RFLP (*RestrictionFragmentLengthPolymorphism*), sequenciamento do DNA mitocondrial (DNAmt) e os microssatélites(GONÇALVES, 2010).

#### *DNA mitocondrial (DNAmt)*

O DNAmt é uma molécula circular e apresenta um conteúdo gênico bastante conservado evolutivamente, nos invertebrados há uma região rica em A+T, não codificadora, e tida como responsável pela origem de replicação e transcrição da molécula de DNAmt (WOLSTENHOLME, 1992)

Estudos a exemplo de (SILVESTRE et al., 2008), (GONÇALVES, 2010), (SOUZA, 2010)utilizaram o DNAmt, esse tipo de marcador tem se mostrado bastante informativo para estudos filogenéticos, populacionais e evolutivos.

#### *Os microssatélites*

Os microssatélites são definidos como regiões do genoma que contêm número variável de repetições (uma a cinco bases) em tandem. Esses marcadores são classificados em quatro grupos: perfeitos, imperfeitos, interrompidos e compostos. Tais regiões são amplificadas via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e são úteis em estudos genéticos por serem, caracteres mendelianos, codominantes, seletivamente neutros, altamente polimórficos e estarem amplamente distribuído pelo genoma(HILLIS et al., 1996). Eles vêm sendo usados em estudos de âmbito populacional e comportamental de diferentes espécies de abelhas.

#### *Estudos moleculares em abelhas*

A primeira barreira a ser enfrentada em ensaios de biologia molecular é a extração de DNA de boa qualidade, que não depende apenas dos reagentes escolhidos, mas também da amostra a ser estudada. Em 1997, Waldschmidt et al. observaram que a quantidade e pureza de DNA extraído de *Meliponaquadrifasciata* sofriam interferência do estágio de desenvolvimento do inseto (adulto ou larva) e dos componentes do tampão de extração. Pascual et al. (2006) avaliaram que cabeça, tórax, asas e pernas são úteis e confiáveis para extração do DNA, devendo ser evitado o abdome por não permitir reprodutibilidade da técnica.Essa reprodutibilidade provavelmente não foi

observada devido à contaminação da amostra, o que deve ter ocorrido no momento em que as partes do inseto foram separadas ficando no abdômen grãos de pólen.

Por outro lado, o DNA de formiga *Acromyrmex hehryi* foi viável até 16 meses de armazenamento, com quatro protocolos de extração distintos compostos basicamente de proteinase K, SDS, CTAB,  $\beta$ -mercaptoetanol e alcoóis (GRUTZMACHER et al., 2002). SOUZA et al. (2008) obtiveram DNA de qualidade para realização de PCR-RFLP em abelhas do gênero *Melipona*. Entretanto o protocolo de extração se baseou no uso de fenol-clorofórmio que são reagentes são tóxicos.

Para abelhas nativas, os esforços para o desenvolvimento de análises moleculares são recentes, sendo poucos os trabalhos publicados e com maior abordagem com a abelha africanizada *Apis mellifera* (COLLET et al., 2006; DEARDEN et al., 2006; FRANCK et al., 2001). Silvestre et al. (2008) realizou o sequenciamento de 78% do DNA mitocondrial de uma abelha eussocial, a *M. bicolor*.

O estudo da biodiversidade de abelhas foi primeiro realizado por análise morfométrica, entretanto a metodologia é inadequada para identificação de híbridos. Os dados moleculares corroboraram com a classificação morfológica em *M. mondury* e *M. rufiventris* (BARNI et al., 2007), entretanto a identificação de colônias híbridas de sub-espécies de *M. quadrifasciata* só foi possível através da PCR-RFLP para marcadores moleculares de DNA mitocondrial (SOUZA et al., 2008); a hibridização provavelmente ocorreu em função das práticas de criação comercial. Para a espécie *Frieseomelitta doederleini* não se achou registro na literatura de estudos moleculares, no entanto para a espécie *Frieseomelitta varia*, houve um estudo com o intuito de verificar a variabilidade genética de uma pequena população dessa espécie, com inferências sobre direção de fluxo gênico e sobre a colonização da área do campus da USP-PR (GONÇALVES, 2010).

Devido ao papel ecológico e social que essas abelhas desenvolvem no bioma da Caatinga, faz-se necessário que pesquisas sejam realizadas com o intuito de avaliar a sua dispersão, existência de colônias híbridas e o impacto que a ação antrópica exerce sobre as diversas espécies de abelhas nativas.

Desta forma, é importante que protocolos de extração sejam avaliados para cada espécie de inseto com objetivo de diminuir custos, evitar danos à saúde e ao meio ambiente e garantir uma boa qualidade do material genético para a reação de amplificação.

### 3 REFERÊNCIAS

AGUIAR, J.; T. LACHER & J.M.C. SILVA.. **The Caatinga**. Pp. 174-181 In: P.R. Gil (ed) Wilderness –Earth’s Last Wild Places. CEMEX, Cidade do México, 2002 p.174-181.

BARNI, G. S. et al. Mitochondrial genome differences between the stingless bees *Meliponarufiventris* and *Meliponamondury* (Apidae: Meliponini). **Genet Mol Res.**, v. 29, n. 6, p. 8-14, 2007.

BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SODHI N. S.; NG, P. K. L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K. K.; DAS I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends Ecol. Evol.**, v. 22, n. 3, p. 148-155, 2006.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. **Tipos de marcadores moleculares** IN BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**.11-93. 2.ed. Viçosa, 2009

CERQUEIRA, R; BRANT, A., NASCIMENTO, M. T. & PARDINI, R. Fragmentação: alguns conceitos. Pp. 23 - 40. In: RAMBALDI, D.M. & OLIVEIRA, D.A. (Orgs.). **Fragmentação de Ecossistemas: Causas, Efeitos sobre a Biodiversidade e Recomendações de Políticas Públicas**.2 ed. Brasília, MMA. 2005.

COLLET, T. et al. Genetic structure of Africanized honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI-COII patterns. **Heredity**. v. 97, n. 5, p. 329-35, 2006.

CROZIER, R. H., CROZYER, Y. C.**The mitochondrial genome of the honeeb***Apis mellifera*: Complete sequence and the genome organization.**Genetics**, v. 133, p. 97-117, 1993.

DEARDEN, P. K. et al. Patterns of conservation and change in honey bee developmental genes. **Genome Res.** v. 16, n. 11, p.1376-84, 2006.

FARIA, O. L. & LAMARTINE, H. Algumas abelhas dos sertões do Seridó. **Arq. Inst. Antrop., Natal** (Univ. Rio Grande do Norte), v.1 n. 2, 1964. p. 185-198.

FRANCK, P. et al. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. **Heredity**. v. 86, n. 4, p. 420-30, 2001.

GONÇALVES, P. P. **Análise da variabilidade genética de uma pequena população de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de análise do DNA mitocondrial, microssatélites e morfometria geométrica das asas**. 2010, 148. f.. Dissertação. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

GRUTZMACHER, D. D. et al. Comparação de protocolos para extração de DNA de *Acromyrmexheyeri*. **R. Bras. Agrocência**, v. 8, n. 2, p. 165-167, 2002.

HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K.. **Molecular systematics**. 2nd edn. Sinauer Associates Inc., Massachusetts, 1996.

KLEIN, A. M.; DEWENTER, F. I.; TSCHARNTKE, T. Pollination of *Coffeacaneophora* in relation to local and regional agroforestry management. **J. of Applied Ecol**, 2003. p. 837-845.

MEDEIROS, A. V. S. **Avaliação do impacto da introdução da abelha africanizada sobre as abelhas sociais nativas na microrregião de Patos-PB no semi-árido nordestino, por meio do resgate do conhecimento popular**. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB. 2008. XIV + 4f.

MICHENER, C. D. **The social behavior of bees**. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 1974.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo, Editora Nogueirapis. 1997. 445p.

OLIVEIRA, F. F. **Revisão do gênero *Frieseomelitta* Von Ihering, 1912 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae), com notas bionômicas de algumas espécies**. 2003. 327. f.. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

PASCUAL, A. N. T.; SUZUKI, K. M.; ALMEIDA, F. S.; SODRÉ, L. M. K. AND SOFIA, S. H. Evaluation of the RAPD Profiles from Different Body Parts of *Euglossa pleosticta* Dressler Male Bees (Hymenoptera: Apidae, Euglossina). **Neotropical Entomology**. Londrina, v. 35, n. 6, p. 811-817. 2006.

PRIMACK, R. B & RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: Planta. 328 p., 2001.

REID, K. D.; WILCOX, B. P.; BRESHEARS, D. D. & MACDONALD, L. Runoff and Erosion in a Pinon–Juniper Woodland: Influence of Vegetation Patches. **Soil Science Society of American Journal**. v. 63. 1999.

ROUBIK, D. W. Stingless bees nesting biology. **Apidologie**. v. 37, p. 124-143. 2006.

SÁ, I. B. & SÁ, I. I. S. 2008. A cobertura florestal do bioma Caatinga: subsídios ao monitoramento de processos de desertificação. In: VIII Seminário de Atualização em Sensoriamento Remoto e Sistemas de Informação Geográfica aplicados à Engenharia Florestal, Anais, v. 1. p. 64-82. Disponível em [[http://www.cpatsa.embrapa.br/public\\_eletronica/downloads/OPB2233.pdf](http://www.cpatsa.embrapa.br/public_eletronica/downloads/OPB2233.pdf)]. Acesso em: 16 mai. 2010.

SCHENEIDER, M. P. C. et al. Genética de populações naturais. Pp. 297-315. In: RAMBALDI, D. M. & OLIVEIRA, D. A. (Orgs.). **Fragmentação de Ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas**. 2 ed. Brasília, MMA. 2005.

SILVEIRA, F. A.; MELO G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas do Brasil: Sistemática e Identificação**. 1ª ed. Belo Horizonte, Edição do autor. 2002.

SILVESTRE, D; DOWTON, M; ARIAS, M. C. 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**, v.31, n.2, p. 451-460, 2008.

SOUZA, M. T. **Identificação molecular de abelha sem ferrão da Amazônia**. 2010, 57f. Dissertação. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia. Departamento de genética, conservação e biologia evolutiva.

SOUZA, R. O. et al. Differentiation of *Melipona quadrifasciata* L. (Hymenoptera, Apidae, Meliponi) subspecies using cytochrome b PCR-RFLP patterns. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 2, 445-450, 2008.

VELLOSO, A. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; PAREYN, F. G. C. **Ecorregiões propostas para o bioma caatinga**. Recife: Associação Plantas do Nordeste; Instituto de Conservação Ambiental The Nature Conservancy do Brasil. 76 folhas. 2002.

VIANA, J. M. S.; CRUZ, C. D.; BARROS, E. G.; **Genética volume 1- Fundamentos**. 2ed. Ver. e ampl. Viçosa: UFV, 2003.

VILELA, S.L. de O. **A importância das novas atividades agrícolas ante a globalização: a apicultura no Estado do Piauí**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2000. 228p.

WALDSCHMIDT, A. M. et al. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Braz. J. Genet.**, v.20, n.3, 1997. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-84551997000300011&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84551997000300011&lng=en&nrm=iso&tlng=en). Acesso em: 27 mai. 2009.

WOLSTENHOLME, D. R.. Animal mitochondrial DNA: Structure and evolution. In: **Mitochondrial Genomes** (D.R. Wolstenholme e K. W. Jeon, Eds.), pp. 173-216, Academic Press, San Diego, 1992.

ZANELLA, F. C. V & MARTINS, C. F. Abelhas da caatinga: biogeografia, ecologia e conservação. Pp. 75-134. In: I.R. LEAL, TABARELLI & J. M. C.

SILVA (Eds) **Ecologia e conservação da caatinga**. Editora Universitária da UFPE, Recife. 2003.

ZANELLA, F. C. V. Abelhas da Estação Ecológica do Seridó (Serra Negra do Norte, RN): diversidade abundancia e distribuição espacial das espécies na região da Caatinga. In: **Apoidea Neotropica**: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure. (G.A.R.Melo and I. Alves dos Santos, Eds.) Editora UNESC, Criciúma, SC. 2003.

ZANELLA, F. C. V. Abelhas da Ilha do Mel: estrutura da comunidade, relações biogeográficas e variação sazonal. Pp 189-208. In: **História Natural e conservação da Ilha do Mel** (Marques, M.C.M. & Britez, R.M., orgs.). Curitiba, Editora da UFPR. 271p. 2005.

ZANELLA, F. C. V. The bees of the Caatinga (Hymenoptera, Apoidea, Apiformes): a species list and comparative notes regarding their distribution. **Apidologie** v.31, p. 579-592. 2000.

## CAPÍTULO II

## **AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE ABELHAS SEM FERRÃO (*Frieseomelittadoederleini*)**

LUNA, D. C<sup>1</sup>.; LUCENA, D. A. A<sup>2</sup>.; ROTONDANO, T. E. F<sup>3</sup>.; ZANELLA, F. C. V<sup>4</sup>.; ANDRADE, P. P<sup>5</sup>.; MELO, M. A<sup>6</sup>.

1. Aluna de graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas, UFCG. e-mail: daniluna22bio@gmail.com;

2. Aluno de graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas, UFCG. e-mail: daerciobio@gmail.com;

3. Doutoranda em Ciências Biológicas na UFPE, E-mail: terezarotondano@hotmail.com;

4. Professor Doutor da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, UFCG. e-mail: fcvzanella@gmail.com

5. Professor Doutor da Universidade Federal de Pernambuco. E-mail: andrade@ufpe.br.

6. Professora Doutora da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, UFCG. e-mail: marcia.melo@pq.cnpq.br

### **RESUMO**

Abelhas sem ferrão têm sido vítimas da fragmentação dos habitats naturais. A conservação dessas espécies, bem como o seu manuseio sustentável, é de real importância para manutenção do ecossistema caatinga. Com o intuito de iniciar estudos de variabilidade genética das populações de abelhas nativas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes métodos de extração de DNA de abelhas sem ferrão *Frieseomelittadoederleini* para posterior uso em filogenia molecular. As coletas do material biológico foram realizadas no município de Santana do Seridó/RN. Foram testados quatro protocolos: Protocolo 1: Técnica do Brazol®, utilizando abelhas desidratadas e congeladas e 0,2% de 2-mercaptoetanol no tampão de lise; Protocolo 2: Técnica do Brazol® utilizando abelhas desidratadas e congeladas com adição de 1µL de 2-mercaptoetanol nas amostras no momento da extração; Protocolo 3: Técnica da sílica utilizando abelhas desidratadas e congeladas com 0,2% de 2-mercaptoetanol no tampão de lise; Protocolo 4: Técnica da sílica utilizando abelhas desidratadas e congeladas com adição de 2µL de 2-mercaptoetanol nas amostras no momento da extração. Os melhores resultados de extração foram obtidos com o uso do Brazol® nas amostras desidratadas e congeladas. O DNA extraído de abelhas desidratadas e congeladas com Brazol® foi quantitativamente e qualitativamente superior ao obtido com a sílica, entretanto com os insetos desidratados a maceração é facilitada.

Palavras-chave: 1. Abelhas eussociais. 2. Semiárido. 3. Biologia Molecular.

## **EVALUATION OF TECHNIQUES FOR DNA EXTRACTION FROM STINGLESS BEES (*Friesea melittae doederleini*)**

LUNA, D. C.<sup>1</sup>.; LUCENA, D. A. A.<sup>2</sup>.; ROTONDANO, T. E. F.<sup>3</sup>.; ZANELLA, F. C. V.<sup>4</sup>.; ANDRADE, P. P.<sup>5</sup>.; MELO, M. A.<sup>6</sup>.

1. Aluna de graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas, UFCG. e-mail: daniluna22bio@gmail.com;

2. Aluno de graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas, UFCG. e-mail: daerciobio@gmail.com;

3. Doutoranda em Ciências Biológicas na UFPE, E-mail: terezarotondano@hotmail.com;

4. Professor Doutor da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, UFCG. e-mail: fcvzanella@gmail.com

5. Professor Doutor da Universidade Federal de Pernambuco. E-mail: andrade@ufpe.br.

6. Professora Doutora da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, UFCG. e-mail: marcia.melo@pq.cnpq.br

### **ABSTRACT**

Stingless bees have been victims of fragmentation in their natural habitats. The conservation of these species and their sustainable management is important to maintaining the Caatinga ecosystem. In order to initiate studies of genetic variability in populations of native bees, this work aims to evaluate different methods of DNA extraction from thorax and wings of *F. doederleini*, for being used in molecular phylogeny. The samples were collected in Santana do Seridó / RN and four protocols were tested: 1: Brazol® reagent, dehydrated and frozen bees and 0.2% 2-mercaptoethanol in the lysis buffer; Protocol 2: Brazol® reagent, dehydrated and frozen bees further 1 µL of 2-mercaptoethanol into the samples; Protocol 3: fractionated silica, dehydrated and frozen bees, 0.2% 2-mercaptoethanol in the lysis buffer; Protocol 4: fractionated silica, dehydrated and frozen bees, further 2 µL of 2-mercaptoethanol into the samples. DNA extracted from dehydrated and frozen bees with Brazol® was quantitatively and qualitatively superior to that obtained with silica.

Keywords: 1. Eusocial bees. 2. Semiarid. 3. Molecular Biology

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de técnicas moleculares para reconhecimento da estrutura genética de populações tem permitido a avaliação dos efeitos da fragmentação dos habitats, sendo útil em programas de manejo para conservação genética de populações remanescentes. Medeiros (2008), em um estudo etnoentomológico na região de Patos, registrou o desaparecimento de muitas espécies e redução na abundância e distribuição de outras. O desaparecimento dessas espécies é de importância ecológica, devido ao seu papel na polinização de plantas nativas, e social, pois essas abelhas fazem parte da cultura regional, sendo utilizadas como fonte de mel, cera e pólen (VILELA, 2000, *apud* MEDEIROS, 2008). O gênero *Frieseomelitta* está distribuído na Caatinga, no Cerrado e na Floresta de Mata Atlântica (ZANELLA, 2000).

No âmbito das técnicas de Biologia Molecular, vários métodos diretos têm sido utilizados para investigação da variação genética em populações naturais, tanto de animais como de vegetais, e são particularmente importantes nos casos em que não há registro de variação fenotípica (SCHNEIDER et al., 2005). Em insetos, os genes para o 16S rRNA e para a enzima citocromo C oxidase têm sido utilizados como marcadores moleculares para identificar espécies (HAJIBABAEI et al., 2006; RAMÍREZ et al., 2010).

A primeira barreira a ser enfrentada em ensaios de biologia molecular é a extração de DNA de boa qualidade, que não faça uso de reagentes que causem agravos à saúde, agridam o meio ambiente e que tenham baixo custo.

Em 1997, Waldschmidt et al. observaram que a quantidade e pureza de DNA extraído de *Melipona quadrifasciata* sofriam interferência do estágio de desenvolvimento do inseto (adulto ou larva) e dos componentes do tampão de extração. Por outro lado, a extração de DNA de formiga *Acromyrmex heyeri* foi viável, até 16 meses de armazenamento, com quatro protocolos distintos compostos, basicamente, de proteinase K, SDS, CTAB, b-mercaptoetanol e alcoóis (GRUTZMACHER et al., 2002). Souza et al., (2008) obtiveram DNA suficiente para realização de PCR-RFLP em abelhas *Melipona* extraído com fenol-clorofórmio, técnica frequentemente utilizada, mas os reagentes são tóxicos. Desta forma, é importante que protocolos de extração sejam avaliados para cada espécie para garantir uma boa qualidade de ácido nucléico para a reação de amplificação.

O objetivo deste trabalho foi a avaliação das técnicas de extração de DNA, um pré-requisito para as futuras análises moleculares.

## **2OBJETIVOS:**

### **2.1Objetivo Geral**

Avaliar métodos de extração de DNA abelhas sem ferrão *Frieseomelittadoederleini* para posterior uso em filogenia molecular.

### **2.2Objetivos específicos**

Avaliar a qualidade e a quantidade do DNA de *Frieseomelittadoederleini* extraído com reagente comercial e pelo protocolo da sílica;

Avaliar a eficiência das técnicas em abelhas desidratadas e congeladas;

Avaliar a quantidade e pureza do DNA com a aplicação de 2-mercaptoetanol no momento da extração.

## **3MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Local de coleta das abelhas**

As coletas foram realizadas na Fazenda Morada das Jandaíras, localizada no município de Santana do Seridó, Rio Grande do Norte, coordenadas 6° 44' 16''S e 36° 43' 13''W (Figura 4). A fazenda possui aproximadamente 377,18 hectares, 179 ha de área florestal e Reserva Legal de 75,44 ha. A média anual de precipitação pluviométrica para o município de Santana do Seridó é de 723,5 mm.

A região do Seridó apresenta vegetação típica de caatinga arbustiva arbórea aberta, com grandes extensões de herbáceas e predomínio do capim panasco (*Aristidasp*). O relevo é suave ondulado com altitudes que variam entre 100 a 400 m, solos rasos, pedregosos, de origem cristalina e fertilidade de média à alta, mas muito suscetíveis à erosão; predominam os solos Brunos-não-Cálcicos, Podzólicos, Litólicos e Planossolos. O clima, segundo a classificação de Köppen, é tropical semiárido (Bsh), caracterizado por ser quente e seco, com as precipitações concentradas em poucos meses, usualmente de fevereiro a maio. O total pluviométrico varia muito entre os anos e de local para local em um mesmo ano (VELLOSO et al., 2002; SUDEMA, 2004).

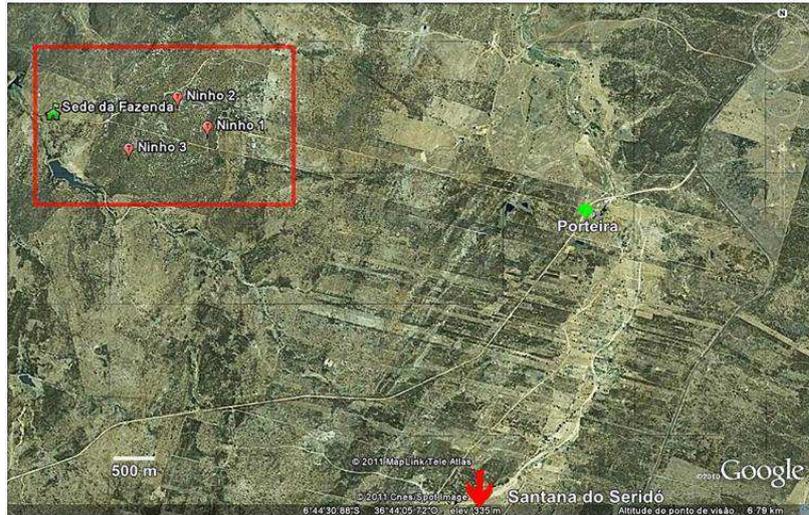


Figura4. Imagem de satélite da Fazenda Morada da Jandaíra, com a área em estudo destacada no retângulo. Os pontos em vermelho georreferenciam os ninhos onde foram coletadas as abelhas (Fonte: Google Earth.com).

### 3.2 Material biológico

As colônias estão localizadas geograficamente nas seguintes coordenadas geográficas: Colônia1:  $6^{\circ}43'51''S$   $36^{\circ}45'07.6''W$ , Colônia 2:  $6^{\circ}43'45,5''S$   $36^{\circ}45'19.9''W$  e Colônia 3 :  $6^{\circ}43'58.2''S$   $36^{\circ}45'34''W$  (Figura 1).

Abelhas operárias adultas de *Friesseomelittadoederleine* foram coletadas diretamente na entrada das colônias (colônias silvestres) com o auxílio de uma rede entomológica (Figura 5; Figura 6). As abelhas foram sacrificadas em tubos contendo cianeto de potássio, levadas ao Laboratório de Ecologia e Biogeografia da Caatinga (LEBIC) e dissecadas com auxílio de lupa e pinças; as asas e o tórax foram depositados em microtubos de 1,5 mL e conservadas em álcool a 70%.



Figura5. Coleta das amostras de *Frieseomelittadoederleine* com rede entomológica na entrada do ninho.

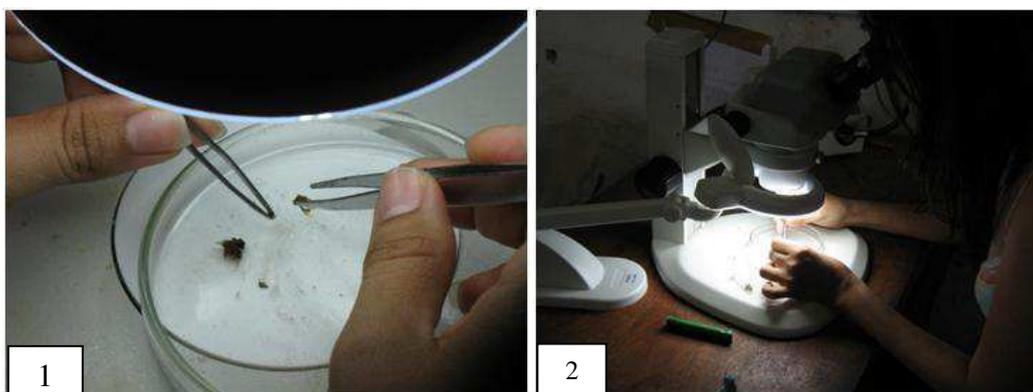


Figura6. Tórax das abelhas sendo separado para extração do DNA.

### 3.3 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido do Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campus de Patos-PB.

O DNA foi obtido a partir do tórax e asas de abelhas desidratadas em estufa a 60°C e congeladas a -20°C.

A extração de DNA foi realizada em triplicata, contendo material de cinco abelhas por microtubo, e em três dias de extração com intervalos de 48 ou 72h. O DNA foi extraído com Brazol®<sup>1</sup> e com sílica de acordo com a metodologia abaixo.

#### 3.3.1 Extração com Brazol®

##### 3.3.1.1 Protocolo 1

Em 2 (dois) microtubos de 2 ml foram macerados material de 5 abelhas congeladas e 5 desidratadas por cinco minutos com auxílio de um macerador de tecido. Um volume de 500µl de tampão de lise (Tris – HCl 100mM, NaCl 1,4M, EDTA 20mM, CTAB 2% e 2- mercaptoetanol 0,2%). Em seguida foram adicionados 20µl de proteinase K (20mg/µl), homogeneizado-se com vortex por cinco minutos e incubado-se a 56°C por 18 horas.

Após a lise, 500µl de Brazol® foram adicionados à amostra e homogeneizados em vortex por cinco minutos. Após 1 hora de repouso foram adicionados 250µl de clorofórmio, homogeneizado em vortex e centrifugados a

<sup>1</sup> LGC Biotecnologia

12.000g por 15 minutos para que a fase aquosa (superior, contendo o DNA) e a fase orgânica (inferior) fossem separadas. (Figura 7).

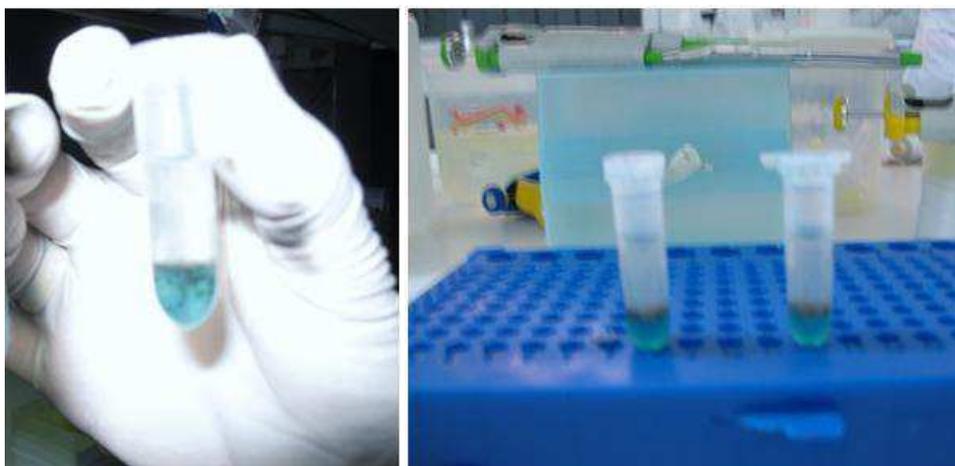


Figura7. Imagens mostrando a separação da amostra em fases aquosa (transparente, contendo o DNA) e a orgânica (azul, contendo proteínas e lipídios) após extração com Brazol®.

A fase aquosa foi transferida para outro microtubo de 1,5  $\mu$ L e acrescentados 500 $\mu$ l de etanol absoluto para a precipitação dos ácidos nucléicos, misturado-se por inversão e centrifugado-se por 20 minutos a 12.000g. O sobrenadante foi desprezado e o pellet lavado por duas vezes com álcool 70% seguido de centrifugação por 5 minutos a 12.000g.

O DNA foi eluído em 50 $\mu$ l de água destilada, deixado em repouso por uma hora, quantificado em biofotômetro em absorvância de 260/280 e armazenado a -20°C.

A quantidade (diretamente proporcional à absorvância a 260 nm) e qualidade (tanto maior quanto maior a razão das absorvâncias a 260 e a 280 nm) do DNA extraído foram analisadas com abelhas secas e abelhas congeladas em triplicata com intervalo de 2 a 3 dias entre as extrações, para avaliar a reprodutibilidade da técnica. Todas as extrações foram feitas em triplicata em três dias de extração totalizando 18 amostras.

### **3.3.1.2 Protocolo 2**

Em 2 (dois) microtubos de 2 ml foram macerados material de 5 abelhas congeladas e 5 desidratadas por cinco minutos com auxílio de um macerador de tecido. Um volume de 500 $\mu$ l de tampão de lise Tris – Hcl 100mM, NaCl 1,4M, EDTA 20Mm CTAB 2% e 2- mercaptoetanol 0,2%), 1 $\mu$ l de 2-mercaptoetanol

PA no momento da extração e 20µl de proteinase K (20mg/µl). A mistura foi homogeneizada com o auxílio de um vortex por cinco minutos e incubado a 56°C *por 18 horas*. Os procedimentos seguintes foram realizados de acordo com o protocolo 1.

### **3.3.2 Extração com Sílica**

O fracionamento da sílica foi realizado de acordo com Mesquita et al. (2001). O princípio desta técnica é a extração do DNA após lise mecânica e digestão enzimática das membranas celulares e ligação do DNA a sílica. A técnica foi realizada de acordo com os dois protocolos de extração abaixo:

#### **3.3.2.1 Protocolo 3**

Em 2 (dois) microtubos de 2 ml foram macerados material de 5 abelhas congeladas e 5 desidratadas por 5 minutos com auxílio de um macerador de tecido e adicionado 1000µl de tampão de lise (Tris – HCl 100mM, NaCl 1,4 M, EDTA 20mM, CTAB 2% e 2- mercaptoetanol 0,2%), 20µl de proteinase K (20mg/µl), 1 pérola de vidro e 0,5g de zircônia. A mistura foi homogeneizada em vortex e incubado a 56°C por 18 horas.

Após essa etapa os tubos foram centrifugados a 12.000g por 15min. 500µl do sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado igual volume de solução ligadora de DNA (6% W/V de sílica, 4mM de tiocianato de guanidina pH 6.4) e misturado por inversão por 5 min, para que o DNA se ligue a sílica.

A sílica foi peletada por centrifugação a 12.000g por 2 min e lavada duas vezes usando 1 ml de etanol 70% gelado. Após as lavagens o tubo ficou em repouso por 4 horas para evaporar o álcool ainda retido na sílica.

O DNA foi eluído pela adição de 100µl de água destilada e repouso de 2 horas. Após centrifugação a 12000g por 2 min, o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo microtubo, dosado em biofotômetro e armazenado à -20°C.

#### **3.3.2.2 Protocolo 4**

Em 2 (dois) microtubos de 2 ml foram macerados material de 5 abelhas congeladas e 5 desidratadas com auxílio de um macerador de tecido por 5 minutos. Adicionou-se um volume de 1000µl de tampão de lise (Tris –

HCl 100mM, NaCl 1,4M, EDTA 20mM, CTAB 2% e 2- mercaptoetanol 0,2%), 1 pérola de vidro, 0.5g de zircônia, mais 2µl de 2-mercaptoetanol PA no momento da extração e 20µl de proteinase K (20mg/µl). O extrato foi homogeneizado no vortex e incubado a 56°C por 18 horas. Os passos seguintes foram realizados como descritos no protocolo 3.

Para a dosagem do DNA foi utilizado o biofotômetro<sup>2</sup> em absorbância de A260/A280. O DNA foi quantificado e armazenado a – 20 °C.

A qualidade do DNA extraído em cada protocolo também foi verificada por visualização em gel de agarose 1,2%. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal com TBE 0,5 X (Tris base 1M, ácido bórico anidro 1M e EDTA sódico di-hidratado 20 mM) pH 8.0) e o gel corado com Blue Green<sup>3</sup>. Após a corrida as bandas foram visualizadas em transiluminador e fotografadas.

### **3. 4 Análise estatística**

Para a análise foi utilizado o programa SAS (1999) e as médias foram comparadas pelo Teste de Scheffé com significância de 95%. Considerando as variações intra e entre protocolos, a análise estatística foi realizada comparando os seguintes Grupos:

#### *Extração com Brazol®*

Grupo1 - Extração com Brazol®, abelhas desidratadas, adição de mercaptoetanol direto na amostra.

Grupo2 - Extração com Brazol®, abelhas congeladas adição de mercaptoetanol direto na amostra.

Grupo3 - Extração com Brazol®, abelhas congeladas, mercaptoetanol presente apenas no tampão de lise.

Grupo4 - Extração com Brazol®, abelhas desidratadas, mercaptoetanol presente apenas no tampão de lise.

#### *Extração com sílica*

Grupo5 - Extração com sílica, abelhas desidratadas e adição de mercaptoetanol à amostra.

Grupo6 - Extração com sílica, abelhas congeladas adição de mercaptoetanol direto na amostra.

---

<sup>2</sup>Eppendorf Bio-photometer Plus

<sup>3</sup> LGC Biotecnologia

Grupo7 - Extração com sílica, abelhas congeladas, mercaptoetanol presente apenas no tampão de lise.

Grupo8 - Extração com sílica, abelhas desidratadas, mercaptoetanol presente apenas no tampão de lise.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram analisados comparando quantidade e qualidade do DNA extraído de abelhas (desidratadas e abelhas congeladas) com Brazol® e sílica fracionada e 2-mercaptoetanol presente apenas no tampão ou adicionado à amostra. Os valores correspondem às médias de triplicatas repetidas três vezes com intervalos de 48 e 72 horas.

Nas tabelas 1 e 2 observa-se que não houve diferenças estatísticas entre os Grupos 1, 2, 3, 4 quando comparados com relação à quantidade de DNA e o grau de pureza ( $p = 0,0726$  e  $p = 0,9320$ , respectivamente).

Tabela 1. Médias dos resultados da extração de DNA ( $\mu\text{g/mL}$ ) de abelhas congeladas e desidratadas através do Brazol® e da sílica fracionada, com mercaptoetanol apenas no tampão de lise ou adicionado no momento da extração.

	Abelhas congeladas		Abelhas desidratadas	
	MERCAPTOETANOL			
	Amostra	Tampão de lise	Amostra	Tampão de lise
Brazol®	143 <sub>a</sub>	169 <sub>a</sub>	119 <sub>a</sub>	76 <sub>a</sub>
	131 <sub>a</sub>	78 <sub>a</sub>	116 <sub>a</sub>	59 <sub>a</sub>
	150 <sub>a</sub>	54 <sub>a</sub>	160 <sub>a</sub>	49 <sub>a</sub>
Sílica	51 <sub>a</sub>	68 <sub>a</sub>	61 <sub>a</sub>	75 <sub>a</sub>
	79 <sub>a</sub>	96 <sub>a</sub>	71 <sub>a</sub>	62 <sub>a</sub>
	43 <sub>a</sub>	89 <sub>a</sub>	29 <sub>a</sub>	27 <sub>a</sub>

a: letras iguais não há diferença significativa pelo teste de scheffé ( $p < 0,05$ )

Tabela 2. Média do grau de pureza do DNA de abelhas congeladas e desidratadas extraído com Brazol® e sílica fracionada, com mercaptoetanol apenas no tampão de lise ou adicionado no momento da extração.

	Abelhas congeladas		Abelhas desidratadas	
	MERCAPTOETANOL			
	Amostra	Tampão de lise	Amostra	Tampão de lise
Brazol®	1,7 <sub>a</sub>	1,8 <sub>a</sub>	1,8 <sub>a</sub>	1,9 <sub>a</sub>
	1,8 <sub>a</sub>	1,7 <sub>a</sub>	1,8 <sub>a</sub>	1,7 <sub>a</sub>
	1,8 <sub>a</sub>	1,9 <sub>a</sub>	1,8 <sub>a</sub>	1,9 <sub>a</sub>
Sílica	1,3 <sub>a</sub>	1,2 <sub>a</sub>	1,3 <sub>a</sub>	1,3 <sub>a</sub>
	1,0 <sub>a</sub>	1,2 <sub>a</sub>	1,2 <sub>a</sub>	1,3 <sub>a</sub>
	1,2 <sub>a</sub>	1,2 <sub>a</sub>	1,2 <sub>a</sub>	1,1 <sub>a</sub>

a: letras iguais não há diferença significativa pelo teste de scheffé ( $p < 0,05$ )

Apesar dos protocolos não terem se diferenciados estatisticamente, os resultados do Grupo 1 e 2 (extração com Brazol®, abelhas desidratadas e congeladas, adição de mercaptoetanol direto na amostra) tem mais reprodutibilidade quanto a quantidade e o grau de pureza do DNA; por este método os valores foram mais constantes (Figuras 8 e 9). Nos Grupos 3 e 4 a quantidade de DNA foi inferior, além de haver oscilações entre os três dias de extração, mas o grau de pureza se manteve dentro dos valores adequados para a realização da PCR. De acordo com Held (2009), baseado na relação A260/A280, preparações puras de DNA e RNA devem ter uma absorvância esperada  $> 1,8$  e  $< 2,0$ , respectivamente. Em valores abaixo de 1,8, há contaminação por proteínas, como demonstrado por Glasel (1995).

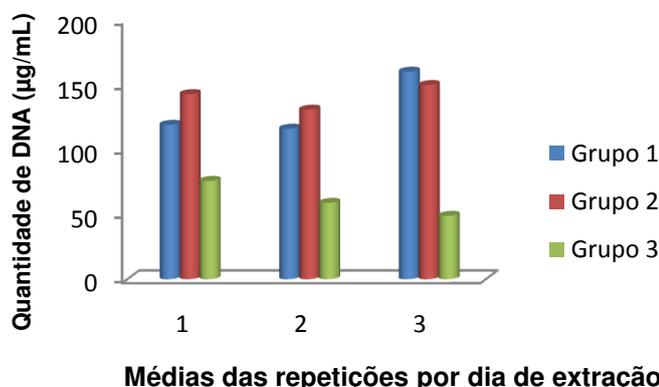


Figura 8: Resultados das médias diárias da quantidade de DNA ( $\mu\text{g/mL}$ ) extraídas com Brazol® nos Grupos 1, 2, 3, 4.

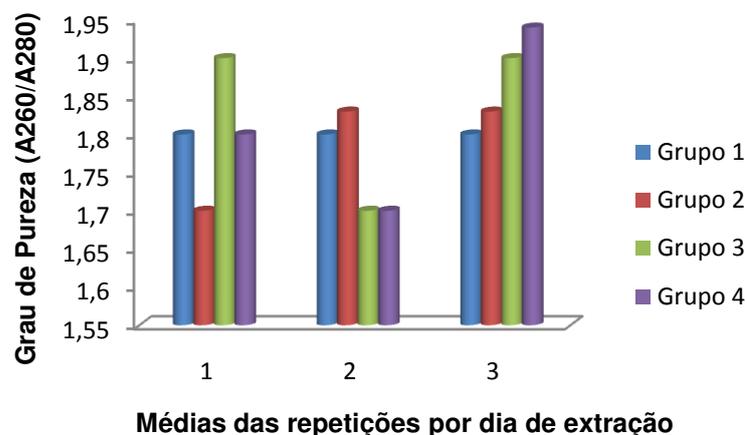


Figura 9: Resultados das médias diárias do grau de pureza de DNA(A260/A280) extraídas com Brazol®, nos Grupos 1, 2, 3, 4.

Os Grupos 5, 6, 7 e 8 (amostras extraídas com a sílica) não diferiram estatisticamente, tanto na quantidade de DNA quanto no grau de pureza ( $p = 0,2858$  e  $0,6966$ , respectivamente) (Tabelas 1 e 2). Apesar de não haver diferença estatística, o Grupo 7 foi o que apresentou valores maiores de DNA genômico. Para o grau de pureza, os valores ficaram na faixa que caracteriza mistura com proteínas, de acordo com Glasel (1995) (Figuras 9 e 10).

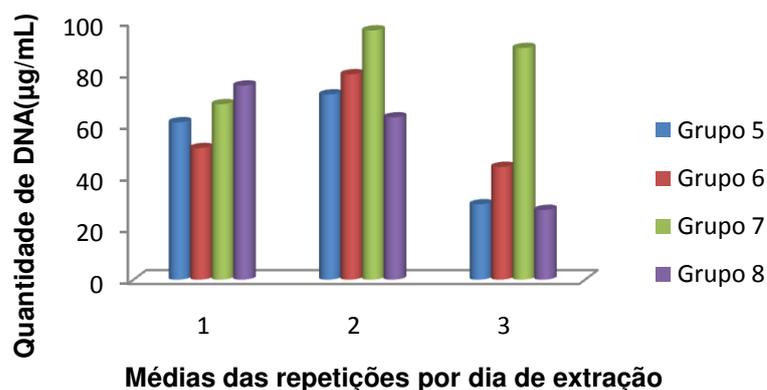


Figura 10: Resultados das médias diárias da quantidade de DNA ( $\mu\text{g/mL}$ ) extraídas com sílica nos Grupos 5, 6, 7, 8.

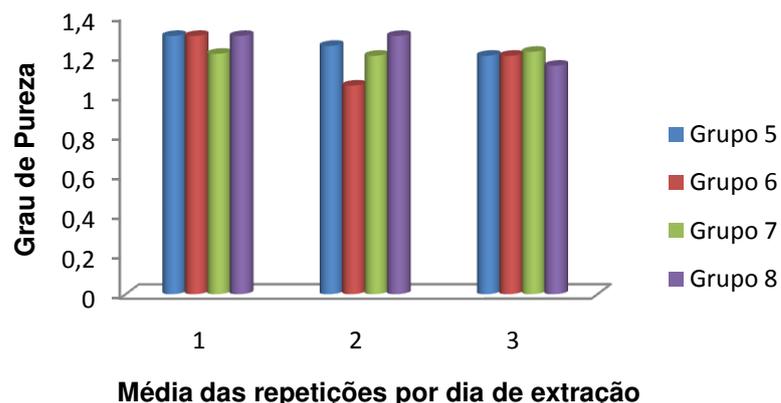


Figura11: Resultados das médias diárias do grau de pureza de DNA(A260/A280) extraídas com sílica nos Grupos 5, 6, 7, 8.

A eficiência da extração de DNA entre as técnicas de Brazol® e Sílicafoicomparada pelo teste de Scheffé usando os dois grupos com melhor desempenho, isto é, Grupo1(Brazol®) eGrupo 7 (Sílica fracionada). Houve diferença estatística entre a quantidade de DNA extraído e o grau de pureza ( $p = 0,0470$  e  $0,001$ , respectivamente).

Tabela 3. Comparação dos resultados da quantidade de DNA ( $\mu\text{g/mL}$ ) e do grau de pureza do Grupo1 (Brazol®) e do Grupo 7 (sílica fracionada).

Quantidade de DNA ( $\mu\text{g/mL}$ )		Grau de Pureza (260/280nm)	
Brazol®	Sílica	Brazol®	Sílica
119 <sub>a</sub>	68 <sub>b</sub>	1,8 <sub>a</sub>	1,2 <sub>b</sub>
116 <sub>a</sub>	96 <sub>b</sub>	1,8 <sub>a</sub>	1,2 <sub>b</sub>
160 <sub>a</sub>	89 <sub>b</sub>	1,8 <sub>a</sub>	1,2 <sub>b</sub>

a, b: letras iguais não há diferença significativa pelo teste de scheffé ( $p < 0,05$ )

Quando exemplares das amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose, as amostras dos Grupos1 e 2 apresentaram boa qualidade de DNA representada por uma banda de alto peso molecular e rastro discreto. Apesar do bom desempenho dos dois grupos, a desidratação do inseto facilitou processo de maceração. Na Figura 12 são visualizados rastros nas amostras extraídas com a sílica (G5 – G8), indicando baixo grau de pureza do DNA.

Apesar da sílica fracionada ter apresentado um baixo grau de pureza, a quantidade de DNA obtido neste trabalho foi bastante superior ao de Nóbrega (2009). Este fato se deve ao aumento no tempo de eluição do DNA para 2 horas, única diferença entre os dois protocolos.Caldart et al. (2011) obtiveram grau de pureza de 1.8 em amostras de sangue estocadas por 4 meses, diferente deste trabalho e de Nóbrega (2009). A baixa qualidade do DNA pode

estar relacionada com os componentes do tampão de lise e de lavagem. Sugerem-se alterações no protocolo da sílica fracionada para melhor o rendimento.

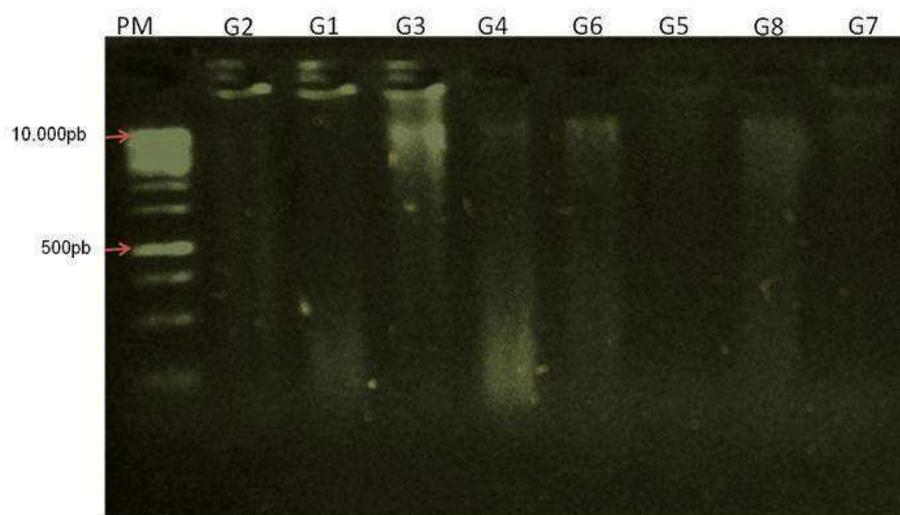


Figura 12: Visualização em gel de agarose 1,2% do DNA de *F. doederleini* extraído com Brazol® (G1-G4) e sílica fracionada (G5-G8).

## 5 CONCLUSÃO

O DNA extraído de abelhas desidratadas e congeladas com Brazol® foi quantitativamente e qualitativamente superior ao obtido com a sílica, entretanto com os insetos desidratados a maceração é facilitada.

A adição de 2-mercaptoethanol na amostra no momento da extração proporcionou melhores resultados.

## 6 REFERÊNCIAS

- CALDART, E. T.; CHIAPPETTA, C. M.; LOPES E. F.; RAVAZZOLO, A. P. Análise comparativa de métodos de extração de DNA genômico de células do sangue e do leite de pequenos ruminantes. **Acta ScientiaeVeterinariae**.v. 39, n. 1, p. 945. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/actavet/39-1/PUB%20945.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2011
- GLASEL, J. A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260/280nm absorbance ratios. **Circle Reader Service**, v. 18, n. 1, 1995. Disponível em: <http://www.colorado.edu/chem/chem4761/biolab2000/A260%20Absorption%20%20Glas.l.pdf>.> Acesso em: 01 jun. 2011.
- GRUTZMACHER, D. D. et al. Comparação de protocolos para extração de DNA de *Acromyrmexheyeri*.**R. Bras. Agrociência**, v. 8, n. 2, p. 165-167, 2002.
- HAJIBABAEI, M.; JANZEN, DH.; BURNS, JM.; HALLWACHS, W. HEBERT, PD. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. **ProcNatlAcad Sci**. 2006. v.24, n.103(4), p. 968-971. 2006.
- HELD, P. G. The nucleic acid "A260/A280" ratio measurment. Disponível em: <http://www.mnstate.edu/chastain/BCBT%202008%20website/Introduction%20280-260.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2009.
- MEDEIROS, A. V. S. **Avaliação do impacto da introdução da abelha africanizada sobre as abelhas sociais nativas na microrregião de Patos-PB no semi-árido nordestino, por meio do resgate do conhecimento popular**. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) Centro de Saúde Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB. 2008. XIV + 4f.
- MESQUITA, R. A.; ANZAI, E. K.; OLIVEIRA, R. N.; NUNES, F. D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **PesquiOdontol Bras**. v. 15, n. 4, p. 314-319, out./dez. 2001.
- NOBREGA, G. D.; ARÚJO, K. N.; MELO, M. A. ANDRADE, P.P. et al. 2009. Diagnóstico do calazar canino: Tecido versus protocolo de extração de dna.qual a melhor opção?. In: VI Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Campina Grande. Disponível em <http://www.pibic.ufcg.edu.br/anais/pibic2009/cav/index.html>. Acesso em 07 de Junho de 2011.
- RAMÍREZ, S. R.; NIEH, J. C.; QUENTAL, T. B.; ROUBIK, D. W. IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; PIERCE, N. E. A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). **MolPhylogenetEvol**.v. 56, n. 2, p. 519-25. 2010.
- SAS-Statistics Analysis Systems Institute. User's guide. North Caroline: SAS Institute Inc., 2003.

SCHENEIDER, M. P. C. et al. Genética de populações naturais. Pp. 297-315. In: RAMBALDI, D. M. & OLIVEIRA, D. A. (Orgs.). **Fragmentação de Ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas**. 2 ed. Brasília, MMA. 2005.

SOUZA, R. O. et al. Differentiation of *Melipona quadrifasciata* L. (Hymenoptera, Apidae, Meliponi) subspecies using cytochrome b PCR-RFLP patterns. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 2, 445-450, 2008.

SUDEMA SUPERINTENDENCIA DE ADMINISTRAÇÃO DO MEIO AMBIENTE. **Atualização do diagnóstico florestal do estado da Paraíba – João Pessoa**: SUDEMA, 2004. 268p.

VELLOSO, A. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; PAREYN, F. G. C. **Ecorregiões propostas para o bioma caatinga**. Recife: Associação Plantas do Nordeste; Instituto de Conservação Ambiental The Nature Conservancy do Brasil. 76 folhas. 2002.

WALDSCHMIDT, A. M. et al. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Braz. J. Genet.**, v.20, n.3, 1997. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-84551997000300011&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84551997000300011&lng=en&nrm=iso&tlng=en). Acesso em: 27 mai. 2009.

ZANELLA, F. C. V & MARTINS, C. F. Abelhas da caatinga: biogeografia, ecologia e conservação. Pp. 75-134. In: I.R. LEAL, TABARELLI & J. M. C. SILVA (Eds) **Ecologia e conservação da caatinga**. Editora Universitária da UFPE, Recife. 2003.

ZANELLA, F. C. V. The bees of the Caatinga (Hymenoptera, Apoidea, Apiformes): a species list and comparative notes regarding their distribution. **Apidologie** v.31, p. 579-592. 2000.