

COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE SSCP, DS-PCR, PCR-RFLP PARA DETECÇÃO DE MUTAÇÃO NO GENE MITOCONDRIAL 16S RRNA EM POPULAÇÕES DE *MELIPONA RUFIVENTRIS*

COMPARATIVE MOLECULAR TECHNIQUES SSCP, DS-PCR, PCR-RFLP FOR ANALYSIS OF MUTATION DETECTION IN MITOCHONDRIAL GENE 16S RRNA IN *MELIPONA RUFIVENTRIS*

*Cristina Soares de SOUSA*¹; *Warwick Estevam KERR*²; *Ana Maria BONETTI*³; *Cristiano Soares de SOUZA*⁴; *Flávia Assumpção SANTANA*⁵; *Luiz Ricardo GOULART*⁴; *Rosana de Cássia OLIVEIRA*⁷; *Carlos Ueira VIEIRA*⁵; *Soraya Matos VASCONCELOS*⁹

RESUMO: Esse trabalho analisou a região 16S do DNA mitocondrial em populações de *Melipona rufiventris* do Espírito Santo, comparando a eficiência das técnicas moleculares SSCP (Single Strand Conformation Polymorfism), PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism-Polimerase Chain Reaction) e DS-PCR (Double-Stringency-Polimerase Chain Reaction). A técnica PCR-RFLP foi sensível para detectar alterações resultantes de mutações, entre as espécies *Melipona rufiventris* e *Melipona compressipes* mas não entre as amostras de *Melipona rufiventris*. A técnica DS-PCR não mostrou resultado satisfatório. A técnica SSCP foi a mais eficiente e a única capaz de identificar polimorfismo em uma amostra de *M. rufiventris* proveniente do município de Alto Castelinho- ES.

UNITERMOS: Mutação, Abelha, Técnicas moleculares, DNA mitocondrial

INTRODUÇÃO

Estudo de Moure e Kerr (1950) divide a abelha *Melipona rufiventris* Lepelletier, 1836 em 5 subgrupos: *M. rufiventris rufiventris*, *M. rufiventris flavolineata*, *M. rufiventris paraensis*, *M. rufiventris brachychaeta* e *M. rufiventris dubia*, com suas respectivas distribui es geográficas. Essas espécies de abelhas ocorrem desde a região Norte (Amazonas, Pará, Amapá, Maranhão) até o Centro Sul do Brasil (Goiás, Minas Gerais, sul da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina).

Melipona rufiventris e outros Meliponineos têm sofrido uma redu o de suas popula es em consequ cia

dos desmatamentos, queimadas de florestas e a o indiscriminada dos meleiros. Esses fatos tem levado   perda de variabilidade genética e a produ o de machos diplóides, como verificado em *Melipona compressipes* (KERR, 1987), *Melipona scutellaris* (CARVALHO et al., 1995) e *Melipona quadrifasciata* (CAMARGO, 1995).

O estudo das varia es genéticas entre popula es pode contribuir para a compreensão de seu processo de especia o (TEMPLETON, 1981). Análises moleculares têm sido uma ferramenta poderosa para inferir o status de espécies e estimar suas rela es evolucionárias, permitindo testar hipóteses sobre o processo de especia o (TEMPLETON, 1994). O DNA mitocondrial reúne características ideais para análises

¹ Mestranda em Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia.

² Engenheiro Agrônomo, Doutor, Pesquisador do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia.

³ Bióloga, Doutora, Professora Coordenadora da Pós gradua o em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

⁴ Engenheiro Agrônomo e Biólogo, Doutor, Professor na Universidade Federal de Uberlândia

⁵ Graduando, Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia

⁶ Químico, Faculdade de Filosofia, Ciências e letras de Patos de Minas.

⁷ Doutoranda em Genética, Departamento de Genética e Matemática Aplicada   Biologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

⁸ Mestranda em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

⁹ Doutoranda em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

Recebido em 25/06/02

Aceito em 20/09/02

filogenéticas por ser uma molécula distinta e bem distribuída, permitindo compara es entre uma grande variedade de organismos. Essa organela tem estrutura genética simples e não possui modelos complexos de DNA repetitivo, elementos de transposi o, pseudogenes ou introns, exibindo um modo de transmissão genética direta, sem recombina o ou rearranjos (ATTARDI, 1985).

A análise da seq ncia de nucleotídeos do DNA mitocondrial em *Apis Melifera* mostrou a existência de genes para 2 rRNAs, 22 tRNAs, 3 subunidades da citocromo oxidase, 2 subunidades de ATPase, apocitocromo b e 7 regiões codificantes para diferentes subunidades da NADH desidrogenase (ARIAS ; NOBREGA, 1991).

Muta es em DNA de fita simples tem sido estudadas pela técnica de Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) que foi desenvolvida por Orita *et al.* (1989). Esse método   baseado no fato de que a mobilidade eletroforética de uma fita única de ácido nucleico, em gel de poliacrilamida não denaturante depende não somente do tamanho mas, também, da sua seq ncia. Maruya *et al.* (1996) desenvolveram um procedimento para obten o de fita simples de DNA usando uma soluço LIS (10% de sacarose, 0,01% de azul de bromofenol e 0,01% de xileno cianol) que, pela sua alta sensibilidade, permite detectar até mesmo muta es de ponto nos fragmentos analisados. Os polimorfismos no comprimento de fragmentos, baseados na técnica PCR-RFLP, podem ser observados em gel de agarose após corte por enzimas de restri o dos fragmentos de DNA de fita dupla, possibilitando que o DNA de dois ou mais indivíduos sejam comparados. Matioli e Brito (1995) desenvolveram a técnica DS-PCR (Double-Stringency PCR) que foi utilizada pelos mesmos autores para obten o de marcadores genéticos em duas linhagens de *Drosophila mercatorum*. Vasconcelos (1998), utilizando a técnica SSCP comparou o padrão de bandas resultantes da migra o das fitas do fragmento 16S rRNA mitocondrial, obtendo três haplótipos entre as popula es de *Melipona rufiventris*: 1- popula es do Maranhão, Pia  e Bahia; 2- popula es de Santa Catarina e Espírito Santo, 3- popula o de Minas Gerais. Tal agrupamento demonstrou uma provável taxa de evolu o diferencial para DNA mitocondrial e nuclear entre as popula es analisadas.

Em nosso trabalho investigamos as muta es no DNA mitocondrial de popula es de *Melipona rufiventris* do Espírito Santo, por meio das técnicas SSCP (Single Strand Conformation Polymorfism), PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism-Polimerase Chain Reaction) e DS-PCR (Double-Stingency-Polimerase Chain Reaction), buscando identificar a técnica mais adequada para esse tipo de análise, em abelhas.

MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética do Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB) da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

O material biológico para realiza o dos experimentos foi a abelha *Melipona rufiventris* conhecida pelos nomes vulgares de: janda ira, tuiuva ou uru u-amarela, sendo que operárias adultas foram coletadas em col nias naturais nos municípios de Castelo, Marechal Floriano, Alfredo Chaves, Alto Castelhinho, no Estado do Espírito Santo. As amostras de *Melipona compressipes* coletadas em Barra do Corda, Maranhão, foram utilizadas como controle nas amplia es PCR-RFLP.

O DNA foi extraído segundo o protocolo desenvolvido por Sheppard *et al.* (1996), quantificado a 260nm em espectrofot metro GBC-UV/VIS911A. A qualidade dos DNAs assim obtidos foi avaliada em gel de agarose a 0,8 % e armazenados em freezer a -22  C até o uso.

Amplifica o do fragmento do gene 16S rRNA do DNA mitocondrial e técnica SSCP

A amplifica o foi feita utilizando-se 40 ng de DNA, 200 M de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 1,2 U de *Taq* DNA polimerase e 10 pmoles dos *primers* Mcomp 47/420 (396 pb) da região 16S rRNA do genoma mitocondrial para um volume final de 25 l. Os *primers* Mcomp 47/420 foram desenvolvidos a partir de seq ncias de *Melipona compressipes*, descritas por Cameron (1993). A seq ncia do *primer* Mcomp47   5'-CTgTACAAAggTAGCATAATCA-3' e do *primer* Mcomp420 5' CTTCTgCATTTAAATTTATCTT-3'. Utilizou-se um programa de 25 ciclos, nas seguintes condi es: 95 C por 20s, para desnatura o, 48 C por 1 min, para o anelamento, 72 C por 20s para extensão, terminando a 4 C. Para aplica o da técnica de SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) foram adicionados 4 l do produto de PCR a 16 l de soluço de LIS (sacarose 10%, azul de bromofenol 0,01%, xileno cianol 0,01%) e incubados a 95 C por 5 min. 15 l dessa mistura foram aplicados em PAGE 13% (Acrilamida-bisacrilamida-49:1) com espaçadores de 0,7 mm. A eletroforese foi realizada a 10 mA por um período de 17h.

Amplifica o por DS-PCR (Double Stringency-Polimerase Chain Reaction)

A amplifica o foi processada utilizando-se o mesmo par de *primers* utilizado na técnica anterior e

primers aleatórios OPF-20, OPF-18, OPF-15, OPI-06, OPI-08 (Operon Technologies Inc). Os *primers* aleatórios foram selecionados para uso de acordo com a homologia observada entre eles e a sequência da região 16S rRNA do mtDNA de *Melipona compressipes*.

Para um volume final de 14µl foram utilizados 10mM Tris-HCl pH 8,4, 200µM de dNTPs, 2,5mM MgCl₂, 6,0 pmoles do *primer* específico, 9,6 pmoles do *primer* arbitrário, 1,2 U de *taq* DNA polimerase, 5 µg de BSA (Soro Albumina Bovina) em cada reação. A reação de amplificação do gene foi realizada em termociclador (Hybaid PCR Express), programado durante os primeiros 15 ciclos para a temperatura de 48°C, para anelamento do *primer* específico e 35°C, para o *primer* aleatório. A visualização dos produtos amplificados foi feita em gel de agarose Metaphor 2,8% e em gel de poliacrilamida 6%, após coloração por prata.

PCR-RFLP TnR

A partir da sequência desenvolvida por Cameron (1993) identificou-se um sítio de restrição para a enzima *DdeI* no fragmento 16S do DNA mitocondrial de *Melipona compressipes*. Como sequências do DNA mitocondrial são conservadas entre essas espécies, procurou-se identificar possíveis mutações entre as populações de *Melipona rufiventris* utilizando o *primer* heterólogo Mcomp 47/420 e utilizou-se a abelha *M. compressipes* como controle, visto que o *primer* heterólogo utilizado para análise das populações de *M. rufiventris* foi desenvolvido a partir da sequência do DNA mitocondrial de *M. compressipes*.

O DNA de *Melipona rufiventris* e de *Melipona compressipes* foram amplificados com o mesmo programa utilizado na técnica DS-PCR, utilizando-se o OPI 08 como *primer* aleatório e Mcomp 47/420 como *primers* específicos. Depois de amplificado, o DNA foi visualizado em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio, quantificado por estimativa e submetido a restrição pela enzima *DdeI* (1,5 U/µl da enzima, 0,9µg do DNA amplificado) para um volume final de 50 µl. A. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O padrão de bandas obtido pela técnica DS-PCR, com os *primers* aleatórios OPI 06, OPI 08, OPF 15 não apresentou polimorfismo entre as sete amostras analisadas (Figura 01). Todas as bandas presentes foram menores do que 396 pb, sugerindo que os fragmentos amplificados estariam dentro da região 16S do DNA

mitocondrial, já que os *primers* aleatórios foram selecionados por homologia com o fragmento 16S sequenciado de *Melipona compressipes*. Com os *primers* aleatórios OPI 15, OPF 18, OPF20, bandas menores e maiores que 396pb foram visualizadas, provavelmente, devido a anelamentos inespecíficos dos *primers* aleatórios ou do *primer* heterólogo ao DNA nuclear ou outra região do DNA mitocondrial. Matioli e Brito (1995) utilizaram a técnica DS-PCR (Double-Stringency PCR) para obtenção de marcadores genéticos em duas linhagens de *Drosophila mercatorum*.

Por meio da técnica PCR-RFLP pode-se observar diferenças nos sítios de restrição nas sequências de nucleotídeos entre as duas espécies e não foi observado polimorfismo entre as populações de *M. rufiventris*. A espécie *M. rufiventris* apresentou três fragmentos após a restrição enquanto *M. compressipes* apresentou apenas dois fragmentos (Figura 02). A diferença na sequência de nucleotídeos nas duas espécies pode ser devido a algum tipo de mutação, sugerindo assim, que os *primers* Mcomp47/420 não devem ser usados em *M. rufiventris* para o estudo específico da região 16S do rRNA. Carvalho (2000) estudou 29 populações de *Melipona scutellaris* de quatro Estados brasileiro quanto à presença de polimorfismos do DNA mitocondrial por meio de digestão enzimática com a enzima *Dde I* associada a técnica de SSCP. Esta não observou polimorfismo entre as amostras.

Os produtos amplificados da região 16S foram analisados quanto à polimorfismos de fita simples e observou-se polimorfismo na amostra de Alto Castelinho-ES em comparação com as de Castelo, Marechal Floriano, Alfredo Chaves, no Estado do Espírito Santo. Não é possível afirmar se esse polimorfismo estaria relacionado ao DNA mitocondrial devido ao fato de termos utilizado *primers* heterólogos (Mcomp 47/420). Somente o sequenciamento do fragmento polimórfico da região 16S encontrado (Figura 03) poderá esclarecer a origem nuclear ou mitocondrial do polimorfismo. Oliveira et al. (1999) e Vasconcelos (1998) utilizaram a técnica de SSCP para análises de polimorfismo de DNA mitocondrial em populações de *Tetragonisca angustula* e de *Melipona rufiventris*, respectivamente, conseguindo a diferenciação entre haplótipos usando a região 16S do rRNA mitocondrial.

CONCLUSÕES

Nas condições em que o trabalho foi desenvolvido pode-se concluir que a técnica SSCP foi a mais eficiente e adequada para detectar mutações no DNA mitocondrial de *Melipona rufiventris*.

A técnica PCR-RFLP mostrou-se eficiente para diferenciar as espécies de *Melipona rufiventris* e *Melipona compressipes*, mas não diferenciou as populações de *Melipona rufiventris*.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro

ABSTRACT: This investigation has analysed the genetic variability within the 16S rRNA mitochondrial DNA of *Melipona rufiventris* populations from Espírito Santo State, Brazil, comparing the efficiency of molecular techniques SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction), and DS-PCR (Double-Stringency-Polymerase Chain Reaction). The PCR-RFLP technique was very sensitive to discriminate *M. rufiventris* and *M. compressipes*; however, it was not useful to detect variation within *M. rufiventris* populations. DS-PCR did not show satisfactory results. On the other hand, the SSCP was the most efficient technique to demonstrate nucleotide polymorphisms among *M. rufiventris* allowing the differentiation of Alto Castelinho country population.

UNITERMS: Mutation, Bee, Molecular techniques, Mitochondrial DNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARIAS M.C. ; NOBREGA F.G. Location of genes in *Apis mellifera scutellata*- derived mitochondrial DNA of Africanized honey bees. **Apidologie**, v. 22, p. 611-619, 1991.
- ATTARDI, G. Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy. **Internacional Review Cytology**, v. 93, p. 93-145, 1985.
- CAMARGO, C. A. Produção de machos diplóides de *Melipona quadrifasciata* (Hym., Apidae). **Ciência e Cultura**, v. 26, n. 07, p. 267, 1995. Suplemento. Resumo do trabalho apresentado na Reunião Anual da SBPC, 26.
- CAMERON, S. A. Multiple origins of advanced eusociality in bees inferred from mitochondrial DNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 8687-8691, 1993.
- CARVALHO, G. A. **Contribuição à reprodução da *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Himenoptera, Apidae, Meliponinae) e suas conseqüências**. 2000. 109 f. Tese (Doutorado em Genética) - Curso de Pós-Graduação em Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2000.
- CARVALHO, G. A. ; KERR, W. E., NASCIMENTO, V. A. Sex determination in bees XXIII. Decrease of *xo* heteroalelos in a finite population of *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponinae). **Brazilian Journal Genetics**, v. 18, n. 01, p. 13-16, 1995.
- KERR, W. E. Determinação do sexo nas abelhas. XVI. Informações adicionais sobre os genes *xo*, *xa* e *xb*. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 1/2, n. 47, p. 111-113, 1987.
- MARUYA, E. ; SAJI, H. ; YOKOYAMA, S. PCR_SSCP (Low Ionic Strength Single-stranded Conformation Polymorphism). A simple method for high- resolution allele typing of HLA-DRB1, DQB1. **Genome Research**, v. 6, p. 51-57, 1996.
- MATIOLI, S. R. ; BRITO, R. A. Obtaining genetic markers by using double-stringency PCR with microsatellites and arbitrary primers. **Biotechniques**, v. 19, p. 752-758, 1995.

MOURE, J. S. ; KERR, W. E. Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apoidea). **Dusenía**, v. 1, n. 02, p. 125-129, 1950.

OLIVEIRA, R. C. ; VASCONCELOS, S. M. ; BRANDÃO, V. S. ; GOULART, L. R. ; KERR, W. E. LISS-SSCP do 16S do RNAr mitocondrial em *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Apidae, Meliponinae). **Genetics and Molecular Biology**, v.3, n. 21, p. 367.

ORITA, M. ; IWAHANA, H. ; KANAZAWA, H. ; HAYASHI, K. ; SEKIYA, T. Detection of polymorfism of human DNA by gel eletroforesis as Single Strand Conformation Polymorfisms **Proceedings of the Nathional Academy of Sciences of the United States of America** , v. 86, p. 2766-2770, 1989.

SHEPPARD, W. S. ; RINDERER, T. E. ; MEIXNER, M. D. ; YOO, H. R. ; STEIZER, J. A. ; SCHIFF, N. M. ; KAMEL, M. S. ; KRELL, R. *Hinfl* variation in mitochondrial DNA of old world honey bee subspécies. **Journal of Heredity**, v. 87, p. 35-40, 1996.

TEMPLETON, A. R. Mechanisms of speciation a population genetic approach. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 12, p. 23-48, 1981.

TEMPLETON, A. R. The role of molecular genetics in speciation studies. **Molecular Ecology Evolution**, v. 15, p. 455-477, 1994.

VASCONCELOS, S. M. **Divergência genética entre populações de *Melipona rufiventris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. 1998. 45 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 1998.

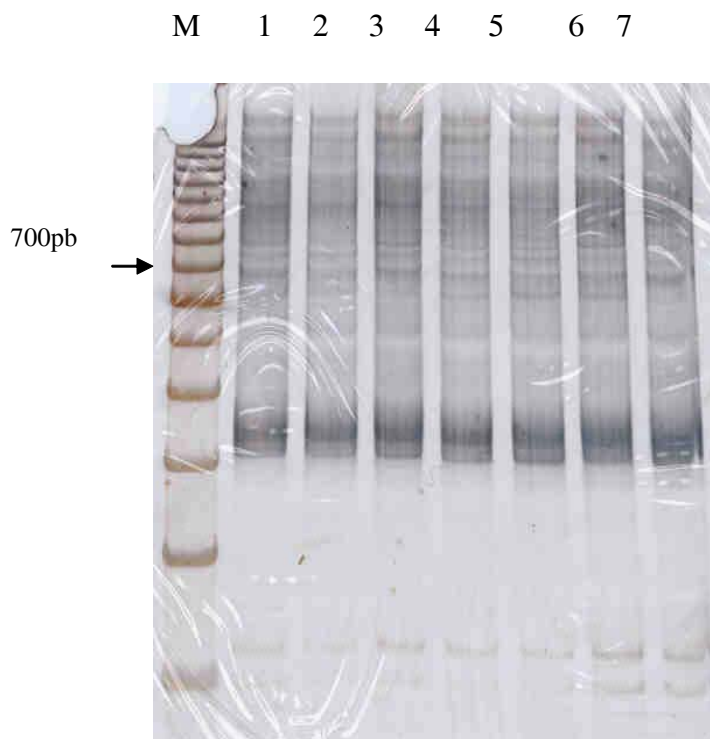


Figura 01- Padrão de bandas proveniente de amplificação por DS-PCR utilizando os *primers* Mcomp47/420 e o *primer* aleatório OPF18. Gel PAGE 6%. M- marcador de 100pb, 1-Castelo-ES, 2-Marechal Floriano-ES, 3 e 4-Alfredo Chaves-ES, 5-Alto Castelinho-ES, 6 e 7-Castelo-Braço sul ES.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 M



Figura 02 - Padrão de restrição do fragmento amplificado por DS-PCR utilizando os *primers* heterólogos Mcomp 47/420 e o *primer* aleatório OPI 08 de *M. rufiventris* e *M. compressipes* obtidos após digestão com *Dde* I e separado em gel de agarose 2%. M-marcador, Amostra 1 e 17 -(*M.compressipes* - Mc). sem restrição (sr) 2 e 18-(Mc) com restrição (cr),3- *M.rufiventris* , Castelo-ES, (sr), 4 -Mr .Castelo-ES, cr 5- M.r. Marechal Floriano-ES, (sr), 6- M.r Marechal Floriano- ES, (cr). 7- M.r.Alfredo Chaves- ES, (sr) 8- M.r. Alfredo Chaves- ES, (cr) 9- M.r. Alfredo Chaves-ES, (sr) 10- M.r. Alfredo Chaves-ES, (cr) 11- M.r. Alto Castelinho- ES, (sr) 12- M.r.Alto Castelinho- ES, (cr) 13- M.r. Castelo-Braço sul- ES, (sr) 14- M.r. Castelo-Braço sul-ES, (cr) 15- M.r Castelo-Braço sul-ES, (sr) 16- M.r. Castelo-Braço sul-ES, (cr).

1 2 3 4 5 6 7

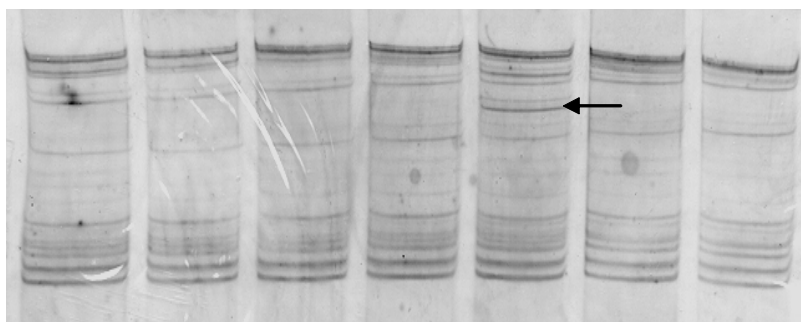


Figura 03 - Padrão de bandas resultante de SSCP utilizando os *primers* Mcomp47/420, mostrando polimorfismo (seta).Gel PAGE 13% . 1-Castelo- ES, 2-Marechal Floriano-ES, 3 e 4-Alfredo Chaves- ES, 5-Alto Castelinho-ES,6 e 7-Castelo-Braço Sul- ES.