

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS DOIS VIZINHOS
CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA

ANDRE LUIS PRIESTER

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCÓLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA
DE *Apis mellifera* VISANDO A UTILIZAÇÃO DE MARCADORES
MOLECULARES DO TIPO MICROSSATÉLITE**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS
2018

ANDRE LUIS PRIESTER

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCÓLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA
DE *Apis mellifera* VISANDO A UTILIZAÇÃO DE MARCADORES
MOLECULARES DO TIPO MICROSSATÉLITE**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação,
apresentado ao Curso Bacharelado em
Zootecnia, da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná, *campus* Dois Vizinhos,
como requisito parcial à obtenção do título de
Zootecnista.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Morini Küpper
Cardoso Perseguini

Dois Vizinhos

2018



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Dois Vizinhos
Curso de Zootecnia



TERMO DE APROVAÇÃO
TCC

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCÓLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA
DE *Apis mellifera* VISANDO A UTILIZAÇÃO DE MARCADORES
MOLECULARES DO TIPO MICROSSATÉLITE**

Autor: Andre Luis Priester

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Morini Küpper Cardoso Perseguini

TITULAÇÃO: Zootecnista

APROVADO em 26 de Novembro de 2018.

Betty Cristiane Kuhn

Profa. Dra. Betty Cristiane Kuhn

Fernanda Raulino Domanski

Mã. Fernanda Raulino Domanski

Juliana Morini Küpper Cardoso Perseguini

Profa. Dra. Dra. Juliana Morini Küpper Cardoso

Perseguini

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por tudo.

À minha família, por sempre estarem do meu lado, apoiando e dando forças em todos os momentos.

À minha orientadora, Juliana Morini Küpper Cardoso Perseguini, por todo o auxílio na construção deste trabalho e pelo carinho com que trata a todos.

Aos professores Emilyn Midori Maeda, Fabiana Martins Costa Maia e Gregório Camargo, pelo auxílio e incentivo na construção deste trabalho.

Aos meus amigos, Samira Moscardi, Luana Troni, Henrique Manenti, Rafael Girardi, Soraia Antunes, Laila Lopes, Daniel Pegorini, Renata Aguilar, Taynara Stopassoli, Gustavo Santana, Miguel Cogo, Bruno Guimarães, Tainara Lambertes, Caroline Felipetto, Ana Sordi, Nubia Oliveira e Rodrigo Macgnan, pela ajuda e apoio, por me proporcionarem tantos momentos bons, e por não terem me abandonado durante os maus.

À Fernanda Raulino Domanski e Letícia Saory, pela ajuda na coleta das amostras e por tornarem um trabalho cansativo em algo alegre e divertido.

À Emanoele Weiss, Andressa Neves e Ariane Enara, pela ajuda no laboratório, pelos momentos de descontração e principalmente pelo apoio nesse período.

Ao grupo PET Zootecnia, por ter sido minha segunda família durante o período em que fiz parte, me proporcionando muitos ensinamentos e amizades.

A todos os professores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos, por me proporcionarem muito mais do que desenvolvimento profissional, mas também pessoal.

EPÍGRAFE

*“A felicidade pode ser encontrada mesmo nas horas mais difíceis, se você lembrar
de acender a luz.”*
(Alvo Dumbledore).

PRIESTER, Andre L. Estabelecimento de protocolo para extração de DNA de *Apis mellifera* visando a utilização de marcadores moleculares do tipo microssatélite. 29p. Trabalho (Conclusão de Curso) – Programa de Graduação em Bacharelado em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2018

RESUMO

As abelhas africanizadas são as maiores responsáveis pelo desenvolvimento da atividade apícola brasileira. Conhecer a variabilidade genética, através da análise do DNA, de colônias que são utilizadas em programa de melhoramento genético, é de extrema importância para obter ganhos genéticos. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi o de padronizar um protocolo de extração de DNA de abelhas africanizadas *Apis mellifera* provenientes de programa de melhoramento genético conduzido na Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Dois Vizinhos. Foram utilizadas rainhas e operárias, sendo realizado protocolos com a ponta das asas das rainhas e com todo o corpo das operárias para a extração de DNA. As extrações foram feitas utilizando um kit comercial “Wizard genomic DNA Purification kit”, e foram testados 5 protocolos diferentes (1, 2, 3, 4 e 5), sendo que para os quatro primeiros protocolos foram utilizadas asas de abelha para realizar a extração de DNA, e no último protocolo foi utilizado a abelha inteira para realizar a extração do DNA genômico total. Os marcadores SSRs utilizados nesse trabalho para padronização através da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram: mrjp3, mrjp5, Ap243, Ap049 e Ap288 que foram amplificados pelo programa de amplificação *Touchdown* e submetidos a eletroforese para verificar a qualidade da amplificação. Dos protocolos analisados, apenas o nº 5 gerou material de qualidade para amplificação via PCR, sendo que para os demais protocolos não foi possível obter uma quantidade de DNA genômico total para realizar as reações de PCR, que são essenciais para realizar a genotipagem de locos SSRs, que serão empregados em um estudo futuro de diversidade genética.

Palavras chaves: Abelha africanizada, apicultura, operária, PCR, rainha.

PRIESTER, Andre L. Establishment of DNA extraction protocol of *Apis mellifera* for the use of microsatellites molecular markers. In 2018. 29p. TCC (Labor Course Completion) – Undergraduate degree in Animal Science, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2018

ABSTRACT

Africanized bees are the main responsible for the development of Brazilian beekeeping activity. Knowing the genetic variability, through DNA analysis, of colonies that are used in a genetic breeding program, is extremely important to obtain genetic gains. In this sense, the aim of this study was to standardize a DNA extraction protocol of Africanized bees *Apis mellifera* from a breeding program conducted at Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Dois Vizinhos. Queen and workers were used and protocols were carried out with the queens wing tip and the whole body of the workers for the DNA extraction. The extraction will be done using a commercial kit "Wizard genomic DNA Purification kit", and were tested five different protocols (1, 2, 3, 4 e 5), being that for the first four protocols were used bee wings to perform the DNA extraction and in the last protocol the entire bee was used to perform the total genomic DNA extraction. The SSR markers used in this study for standardization through Polymerase Chain Reaction (PCR) were: mrjp3, mrjp5, Ap242, Ap049 and Ap288 that were amplified by *touchdown* amplification program and exposed to electrophoresis to verify the amplification quality. After the protocols analyze, only No. 5 generated quality material for amplification, and it was not possible to obtain an amount of total genomic DNA of the other protocols to perform the PCR reactions wich are essential to perform the genotyping of SSRs locus, wich will be used in a future study of genetic diversity.

Keywords: Africanized bee, beekeeping, PCR, queen, workers.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. OBJETIVO GERAL	11
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1. <i>Apis mellifera</i>	12
3.2. Histórico e importância econômica	12
3.3 Importância da avaliação da diversidade genética para programas de melhoramento genético	13
3.4 Análise de diversidade genética em abelhas utilizando marcadores moleculares.....	14
3.5 Marcadores microssatélites	15
3.6 Extração do DNA de <i>Apis mellifera</i>	16
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Caracterização do local	18
4.2 Material biológico	18
4.3 Extração do DNA genômico total.....	18
4.3.1 PROTOCOLOS UTILIZADOS.....	18
4.4 Caracterização com marcadores SSRs.....	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6 CONCLUSÕES	25
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

1. INTRODUÇÃO

A apicultura é arte do manuseio das abelhas com o propósito de produzir mel, cera, ou outros produtos derivados para consumo pessoal ou industrial. Essa atividade tem grandes impactos sociais e econômicos, podendo de gerar lucros direta e indiretamente, ao mesmo tempo que desenvolve a flora local através da polinização (ABEMEL, 2018).

As abelhas, principalmente *Apis mellifera* são conhecidas como uma das espécies de maior sucesso no reino animal devido a sua excelente habilidade de adaptação (MASUKU, 2013). Além de boas produtoras de mel, são também exímias polinizadoras, sendo consideradas as principais e mais eficientes a realizar essa atividade (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2013).

A extração do DNA das abelhas vem sendo utilizado em diversas análises genéticas, e é de grande importância para programas que utilizem dados moleculares para realizar estudos que permitam verificar quais são os níveis de diversidade genética das colônias para promover o melhoramento genético. Grande parte dessas técnicas de extração de DNA são fatais (CHÂLINE et al., 2004), entretanto, busca-se hoje por maneiras que não sejam invasivas para esse procedimento, para que o indivíduo consiga voltar a desempenhar seu papel na colônia.

O uso de marcadores moleculares microssatélites vêm crescendo dentro de diversas análises genéticas. A vantagem do uso desses marcadores é que os mesmos apresentam polimorfismo alto, codominância, heterozigosidade, mostram padrão de herança mendeliana e também não sofrem influência ambiental, ou seja, a diversidade que é mensurada na análise avalia somente o genótipo. Os microssatélites são também conhecidos como SSRs (repetições de sequências simples), são unidades de repetição de 2 até 6 nucleotídeos e são amplamente encontradas no genoma. Além disso, a análise pode ser feita a partir de qualquer tecido, independente do seu estágio de desenvolvimento, sendo necessário apenas uma pequena quantidade de DNA (OLIVEIRA et al., 2006); (GRIFFITHS et al., 2008).

No ano de 2011, na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos começou-se o desenvolvimento de um programa de melhoramento genético em populações de abelhas *A. mellifera* africanizadas selecionadas por meio de avaliação genética para produção de mel, entretanto, ainda não se utilizam dados

moleculares para realizar essas avaliações. Os dados moleculares têm por objetivo deixar as avaliações genéticas mais precisas e acuradas, proporcionando ganhos elevados. Com isso, mostra-se a importância de se padronizar um método para extração de DNA, assim sendo possível obter dados moleculares para serem utilizados nesse programa.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Padronizar a extração do DNA de *Apis mellifera* através da utilização de diferentes protocolos de extração.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a qualidade do DNA extraído;
- Avaliar o método mais efetivo para se realizar a extração do DNA;
- Padronizar a amplificação do DNA com a utilização de marcadores moleculares do tipo SSRs.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Apis mellifera*

As abelhas são pertencentes ao Reino Animalia, Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Hymenoptera, Superfamília Apoidea, Gênero *Apis*, com diversas subespécies, como: *A. mellifera mellifera*, *A. mellifera linguistica* e *A. mellifera scutellata* (GALLO et al., 2002). A abelha africanizada presente no Brasil, é resultante do cruzamento da *A. mellifera scutellata* com as outras subespécies de origem europeia e difere das mesmas pela maior produção de mel, mas também por serem mais reativas, sendo conhecidas como “abelhas assassinas” (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2013).

As abelhas-de-mel são facilmente diferenciadas das outras espécies pela sua pelagem marrom dourada e sua forma característica. São muito importantes para o ecossistema, pois encontram-se como as principais e mais eficientes polinizadoras, além de serem muito valiosas, pois produzem aproximadamente \$300 milhões em produtos relacionados a cera e mel, e sua polinização vale mais de 100 vezes esse valor (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2013).

As abelhas se organizam em três castas dentro da colônia: rainha, operária e zangão (GALLO et. Al., 2002), e sua origem é controlada pela fertilização dos ovos: ovos fertilizados dão origem a fêmeas operárias ou a rainhas. As rainhas são originadas do mesmo tipo de larvas que as operárias, o que as diferencia é a alimentação, onde a larva que dará origem a rainha tem uma alimentação mais rica, com a utilização da geleia real. Já os ovos não fertilizados originarão os zangões. (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2013).

3.2. Histórico e importância econômica

Desde sua implantação em 1839, a atividade apícola brasileira passou por muitas mudanças para chegar na sua conjuntura atual. A partir da implantação de abelhas de origem europeia até após o processo de africanização, essa atividade sofreu grande impacto tecnológico, biológico, econômico e social (MARTINEZ; SOARES, 2012). Apesar de ser uma atividade favorável a ser realizada no Brasil

(devido a ótima flora e clima), a produtividade nacional ainda é aquém do esperado, e é explicada pela baixa utilização de recursos tecnológicos pelos apicultores (SEBRAE AGRONEGÓCIO, 2018).

Segundo Martinez e Soares (2012), as abelhas africanizadas são as maiores responsáveis pelo desenvolvimento da atividade apícola brasileira. Ainda segundo os autores, por serem mais resistentes e adaptadas ao clima do país, se desenvolveram de forma a não sofrerem por pragas e doenças que são comuns em todo o mundo, alavancando a produção e fazendo com que a atividade tenha conquistado cada vez mais o mercado mundial.

A apicultura é uma excelente alternativa de exploração agrícola, pois apresenta-se como uma atividade com baixo investimento e boa lucratividade. Além do mais, proporciona diversificação na produção, tendo produtos como o mel, própolis, cera entre outros, fazendo com que o produtor possa escolher qual melhor se adapta ao mercado consumidor local (ALMEIDA; CARVALHO, 2009).

3.3 Importância da avaliação da diversidade genética para programas de melhoramento genético

Segundo Frankham, Ballou e Briscoe (2008), a diversidade genética é a diferença nas sequências do DNA, que podem ser expressas a nível de fenótipo, como em cor, pelagem entre outros. Seu estudo em populações remete ao fim do século XIX, com Francis Galton, que começou analisando as diferenças hereditárias em humanos (HARTL; CLARK, 2010).

O controle dos dados de genealogia (pedigree) tem grande propósito para a genética. Através deles é possível avaliar a base genética da população, e também características como grau de endogamia e de parentesco (WILLIAMS-BLANGERO; BLANGERO, 2006). Além da endogamia, a diversidade genética está estritamente ligada à performance (WOYKE, 1980); procura por alimento (OLDROYD et. Al, 1992); (MATTILA; SEELEY, 2007) e resistência a doenças, parasitas e pestes; (JI; YIN; CHEN, 2011).

Grandes populações geralmente contêm alta variabilidade genética (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008), mas, ao se iniciar um programa de melhoramento genético em dada população, a tendência é que a diversidade diminua,

pois, ao se realizar a seleção de animais a população irá se tornar cada vez menor e as próximas gerações irão descender de poucos indivíduos, que sofreram um rígido processo de seleção (KINGHORN; WERF; RYAN, 2006).

Kinghorn, Werf e Ryan (2006) também dizem que, ao se diminuir o tamanho da população, provoca-se aumento da endogamia. A endogamia ou consanguinidade é o acasalamento entre indivíduos com algum grau de parentesco (KINGHORN; WERF; RYAN, 2006) (PEREIRA, 2012). Lopes et al. (2005) também diz que pode haver consanguinidade em uma população quando as chances de acasalamento entre parentes são mais altas do que com outros indivíduos. Caso a endogamia não seja controlada, os indivíduos da população estarão altamente relacionados, tornando impossível o acasalamento entre indivíduos não relacionados (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

A endogamia irá acentuar a homozigose e diminuir a heterozigose (PEREIRA, 2012) e promover a diferença genética entre linhagens, mas com uniformidade gênica dentro das mesmas. Quando em grau elevado, podem ocasionar redução na fertilidade, sobrevivência e vigor dos indivíduos, a perda desse vigor é dita como depressão endogâmica (LOPES et al., 2005) (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). Por aumentar a homozigose também pode aumentar o número de indivíduos afetados por defeitos genéticos, pois essas mutações tendem a ocorrer com maior frequência em homozigotos. Por esse motivo é de extrema importância o controle de genealogia nos programas de melhoramento, pois os indivíduos mais distantes proporcionam maior ganho genético (KINGHORN; WERF; RYAN, 2006).

3.4 Análise de diversidade genética em abelhas utilizando marcadores moleculares

Durante muitos anos, a única alternativa para medir a variação entre abelhas era através da morfometria, mas, apesar de ser uma ferramenta muito importante, a técnica tem algumas falhas, o que prejudica o seu uso em estudos genéticos. Com o desenvolvimento dos marcadores moleculares em outras espécies, viu-se que os mesmos se encaixariam favoravelmente no estudo das abelhas e de suas características específicas (ESTOUP et al., 1995).

Com o aumento da diversidade genética em colônias de abelhas aumenta-se a variedade e frequência das tarefas que são realizadas pelas operárias, por isso,

determinar as variações genéticas usando marcadores moleculares é de suma importância, e pode fornecer informações valiosas para a seleção de características desejáveis dentro de programas de melhoramento genético (RAHMI et al., 2014).

A diversidade genética é essencial para a sobrevivência da colônia como um todo. As abelhas rainha fecundam com mais de um zangão para que a colônia tenha uma variabilidade genética alta, assim gerando indivíduos geneticamente diferentes. Ao conceber indivíduos mais distantes geneticamente, a rainha impede que toda a colônia seja acometida severamente por algum agente infeccioso, pois algum zangão pode ter genes mais resistentes a certos patógenos que outros (TARPY, 2003).

Segundo Mattila, Bruke e Seeley (2008), estudos recentes mostram que a diversidade genética dentro da colônia tem benefícios na produtividade, como maior estocagem de comida e maior ganho de peso. Os autores também viram que, as colônias com maior diversidade genética, trouxeram alimentos de distâncias mais longas do que as colônias em que a rainha foi fecundada por apenas um zangão, criando baixa diversidade genética, isso se deu porque a maior diversidade aumentou a produção e a comunicação das abelhas operárias. Atualmente, não há muita informação na literatura especializada sobre trabalhos de análise da diversidade genética dentro de programas de melhoramento genético de abelhas.

3.5 Marcadores microssatélites

As diferenças na sequência de DNA ao longo do genoma de uma determinada espécie são quantificadas pelos marcadores moleculares. Estas variações são chamadas de polimorfismos, sendo originadas por rearranjos cromossômicos, como inserções, duplicações, deleções, mutações, entre outros. O polimorfismo dos marcadores moleculares pode ser herdado de forma Mendeliana e ser acompanhado através das gerações (GRIFFITHS et al., 2008).

Os marcadores moleculares têm sido utilizados em análise genética com as mais variadas finalidades, como por exemplo: identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares, estudo de fluxo gênico, estimativas de taxas de cruzamento e parentesco, análise da diversidade genética entre indivíduos, construção de mapas genéticos e na seleção assistida por marcadores. Atualmente existe uma grande variedade de marcadores moleculares, cuja escolha dependerá de uma série de

fatores, relacionados ao objetivo da pesquisa, recursos financeiros e infraestrutura disponível (Borén e Caixeta, 2006).

O estudo genético de abelhas com o uso de marcadores SSRs teve início com Estoup et. al (1993), quando desenvolveram primers que amplificam regiões de SSRs para *A mellifera* e *B. terrestris*. Desde então, o gênero tem sido estudado ao redor do mundo, com diversos trabalhos que avaliam a diversidade genética de populações de diferentes tamanhos.

Kaskinova et al. (2015) avaliaram populações de *Apis mellifera mellifera* L. da parte sul da República de Bashkortostan (Rússia), utilizando cinco SSRs diferentes e após as análises dos dados, notaram que, apesar de uma intensa relação inter pedigrees, ocorre deficiência de heterozigose em todos os locos estudados. Esses dados demonstraram que há um alto grau de endogamia na região estudada e sugerem que há uma fronteira entre a população de *A. m. mellifera* L. pura e as populações híbridas de outras subespécies.

Rahimi et al. (2014), ao analisar a diversidade de três diferentes populações de *A. mellifera meda* também usando cinco marcadores SSRs, notou que as três populações, apesar de serem distintas entre si, tinham baixa variabilidade, indicando a existência de uma única estrutura populacional.

Parpinelli (2011) ao avaliar abelhas africanizadas provenientes de seleção para geleia real utilizando marcadores SSR específicos para geleia real, encontrou um grau de heterozigosidade média (0,4905) indicando alto grau de diversidade genética. Esses índices se devem grande parte pelos zangões, pois as rainhas foram fecundadas por pelo menos dois zangões, chegando ao máximo de cinco.

3.6 Extração do DNA de *Apis mellifera*

Existem diferentes métodos descritos na literatura para a extração do DNA de *Apis mellifera*. Essa técnica é de grande importância para diversas avaliações genéticas, por isso a grande variedade da mesma.

Essas técnicas podem usar um conjunto de reagentes específicos, como descrito por Issa et al. (2013), ou também usando um kit de extração, que são mais comumente usados, como mostrado por Ahn et al. (2015); Hamiduzzaman, Guzman-nova e Goodwin (2010); Françoso, Gomes e Arias (2015).

O DNA extraído pode ser utilizado em diversas análises, como no estudo da filogenia (GONÇALVES, 2011), identificação de doenças (HAMIDUZZAMAN; GUZMAN-NOVOA; GOODWIN, 2010), análise de diversidade genética (KASKINOVA et al., 2015); (PARPINELLI, 2011), entre outras, e, para que se tenha um material amplificado de boa qualidade, é necessário haver uma quantidade mínima de DNA, como descrito por Solignac et al. (2003)

Geralmente os métodos de extração do DNA de abelhas consistem em métodos invasivos ou muitas vezes letal, pois as colônias possuem inúmeras operárias que podem ser usadas sem que o seu funcionamento seja afetado, entretanto, quando se fala em colônias menores, ou no uso de rainhas para estudos, o uso dessas técnicas não é efetivo pois esses indivíduos são necessários, fazendo com que um método em que o indivíduo permaneça ativamente dentro da colônia seja requerido (CHÂLINE et al., 2004). Por isso a extração de DNA onde os indivíduos ainda conseguem permanecer ativos na colônia está sendo cada vez mais usada, e se tornando importante em estudos de populações que devem ser conservadas (STARKS; PETERS, 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização do local

O presente trabalho foi realizado na Unidade Ensino e Pesquisa (UNEPE - Apicultura), da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos (UTFPR - DV). Foi utilizada uma população de abelhas africanizadas, formadas por matrizes vindas dos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, selecionadas no programa de melhoramento genético para produção de mel.

4.2 Material biológico

Para a realização do trabalho, foram utilizadas rainhas e operárias presentes na UNEPE – Apicultura.

O material genético foi proveniente das pontas das asas das rainhas, para que a mesma pudesse continuar na colônia normalmente; também foram utilizadas operárias inteiras. O material foi coletado a campo, com a ajuda de uma pinça e uma tesoura curva, armazenados em um tubo de eppendorf devidamente identificado e autoclavado. Os eppendorfs foram congelados em freezer comum, à -20°C até a realização da extração do DNA.

4.3 Extração do DNA genômico total

A extração de DNA foi realizada com Kits comerciais, “Wizard genomic DNA Purification kit” (Promega). Os protocolos adotados foram testados e adaptados para gerar material de qualidade para a amplificação com marcadores SSRs.

4.3.1 Protocolos utilizados

Para a realização da extração utilizou-se cinco diferentes protocolos, sendo os quatro primeiros a partir da ponta da asa da abelha rainha e o quinto a partir de uma operária inteira. Os reagentes e equipamentos utilizados estão presentes na tabela 1.

Tabela I. Protocolos utilizados para a extração do DNA.

Passos	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5
Cell Lysis Solution	-	-	500 µL	300 µL	900 µL
Banho Maria	-	-	10 minutos 35° C	-	30 minutos 65° C
Centrifuga	-	-	15.000 RPM 30 segundos	-	-
Nuclei Lysis Solution	600 µL	600 µL	300 µL	300 µL	--
Vórtex	10 segundos	10 segundos	-	-	-
Banho maria	30 minutos 65° C	30 minutos 65 ° Cs	30 minutos 37° C	-	-
RNAse Solution	-	-	1,5 µL	-	-
Banho Maria	-	-	15 minutos 37° C	-	-
Protein Precipitation Solution	-	-	100 µL	-	-
Proteinase K	17,5 µL	17,5 µL		20 µL	17,5 µL
Banho Maria	-	-	-	3 horas 55° C	-
Protein Precipitation Solution	-	-	-	100 µL	-
Congelamento	5 minutos -20 ° C	5 minutos -20° C	-	-	5 minutos -20° C
Vórtex	-	-	30 segundos	20 segundos	-
Centrifuga	-	15.000 RPM 5 minutos	15.000 RPM 25 minutos	15.000 RPM 10 minutos	15.000 RPM 5 minutos
Isopropanol	600 µL	600 MI	300 µL	300 MI	600 µL
centrifuga	15.000 RPM 10 minutos	15.000 RPM 10 minutos	15.000 RPM 15 minutos	15.000 RPM 10 minutos	15.000 RPM 10 minutos
Etanol	600 µL	600 MI	-	-	600 µL
Centrifuga	-	-	-	-	15.000 RPM 10 minutos
Rehydration Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

4.4 Caracterização com marcadores SSRs.

Para realizar a amplificação dos marcadores SSRs selecionados (Tabela I) utiliza-se as seguintes quantidades de cada reagente: 1,5 microlitros de água milliq (Kit MasterMix da Promega), 7,5 microlitros de Master Mix, 1,0 microlitro de cada primer (direito e reverso) à uma concentração de 10 ng/ μ L, 4,0 microlitros de DNA genômico total, em um volume final de reação de 15 microlitros. O programa utilizado foi de 94°C por 2 minutos, *touchdown* de 60°C à 55°C e 72°C por 7 minutos, totalizando 35 ciclos com um tempo total de duração de 1 hora, 20 minutos e 34 segundos. Para verificar a qualidade das amplificações, os produtos das reações de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% (, corado com GelRed™ 1X (Biotium, Inc. Hayward, CA) para visualização dos produtos da amplificação. Para analisar o tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado Ladder de 100 pares de bases (Marca: Ludwig).

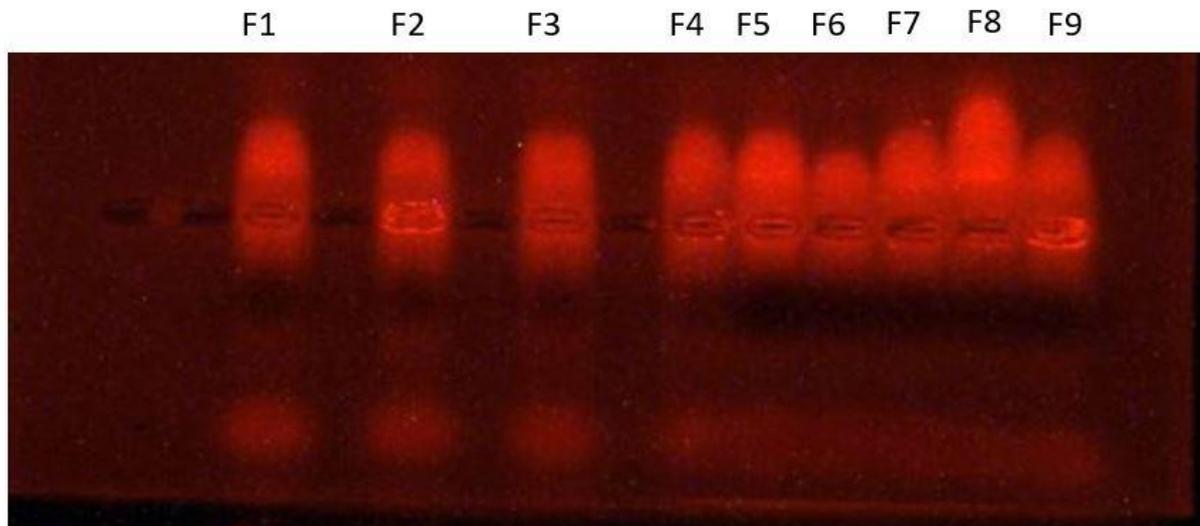
Tabela II. Marcadores SSRs que foram utilizados para padronização da reação de PCR.

Nº	Loco SSR	Sequências do primer 5´ - 3´	Temperatura de Anelamento (°C)	Referência Bibliográfica
1	mrjp3	F: ATG TAA TTT TGA AGA ATG AAC TTG R: TGT AGA TGA CTT AAT GAG AAA CAC	54	Albert et al., 1999b
2	mrjp5	F: AGA CTC TTC AAA CGG TCG TTG C R: CTG TAA TTT CAT ACT TAA AGC CAT	54	Albert et al., 1999a
3	Ap049	F: CCA ATA GCG GCG AGT GTC R: GGG CTT CGT ACG TCC ACC	58	Solignac et al., 2003
4	Ap243	F: AAT GTC CGC GAG CAT CTG R: TGT TTA CGA GAA TTC GAC GGG	50	Solignac et al., 2003
5	Ap288	F: GTT AGT TCG TCG TCG ACC G R: TCT TAG CTT TAT AAC GAG CAC G	48	Solignac et al., 2003

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao realizar os protocolos de extração 1, 2, 3 e 4, os quais utilizaram a asa da abelha como material genético para a extração do DNA, não foi possível obter material de qualidade para que fosse possível realizar amplificação por PCR, como mostrado na figura 1.

Figura 1 – Exemplo de extração malsucedida. De F1 à F9 amostras pós processo de extração de DNA da ponta da asa de abelhas rainhas diferentes.



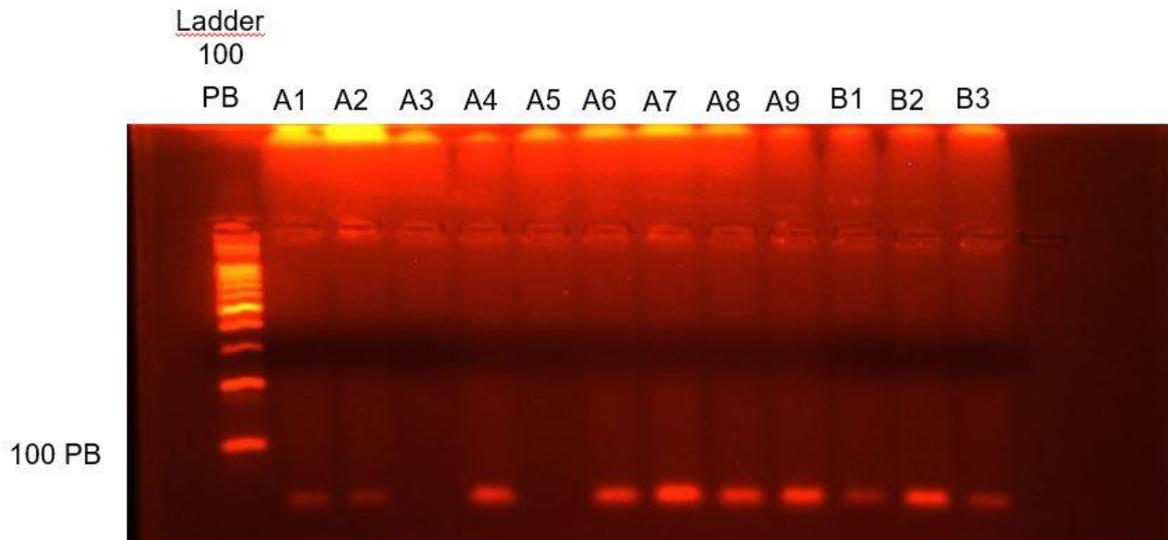
Fonte: O autor.

Ao analisar a imagem 1, não foi possível identificar nenhuma banda de DNA, indicando que o processo de extração não ocorreu de forma adequada. Algumas razões que podem justificar o corrido são a presença de pouca quantidade de material genético nas amostras, ou da perda do mesmo durante o processo de extração.

Ao contrário dos resultados encontrados, Gonçalves (2011) teve êxito na extração do material genético proveniente da asa da abelha, utilizando um protocolo similar ao protocolo 4, mostrando assim que é possível a realização da prática. Já Amorim et al. (2007), só obteve êxito ao extrair DNA da asa de abelhas do Gênero *Melipona* ao utilizar o polímero Chelex® 100.

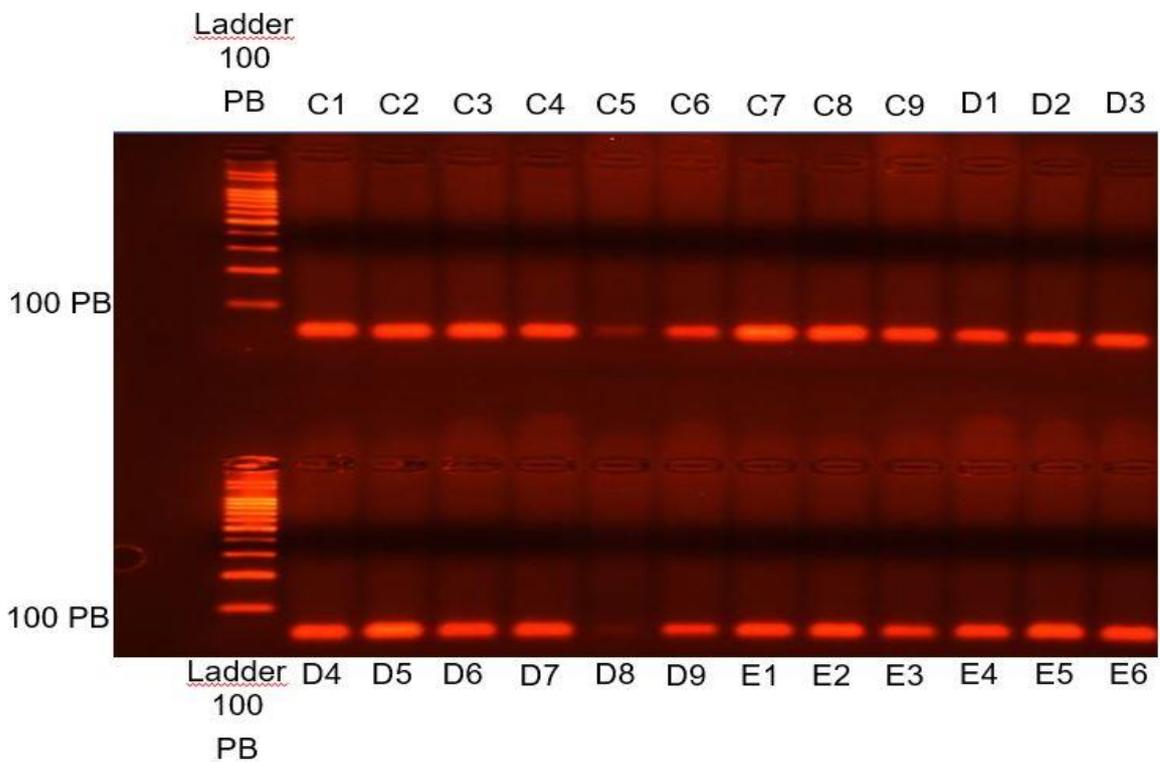
Apesar de não ter sido possível a identificação de material genético extraído, realizou-se à amplificação dessas e de outras amostras através de PCR, sendo os resultados obtidos os mostrados a seguir.

Figura 2 – Resultado da amplificação de 12 amostras de DNA da asa da abelha rainha utilizando o marcador microssatélite MRJP3. Na figura, em ordem da esquerda para a direita, Ladder de 100 pares de base e amostras de diferentes rainhas.



Fonte: O autor.

Figura 3 – Resultado da amplificação da extração do DNA do protocolo 4. a figura, da esquerda para a direita, Ladder de 100 pares de bases e as amostras de diferentes rainhas.



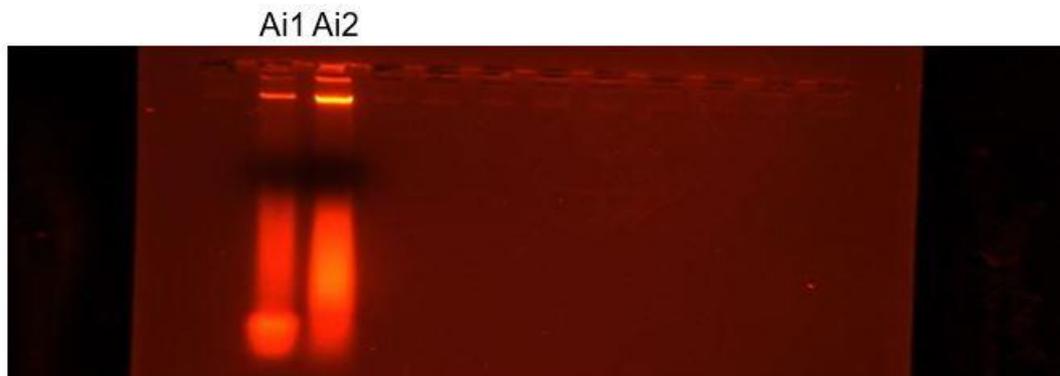
Fonte: O autor.

Como é possível verificar nas figuras 2 e 3, os produtos da extração, após passarem por processo de amplificação, não mostraram nenhum produto amplificado,

sendo possível apenas notar a presença de restos de primers nas amostras, evidenciando assim os resultados já observados anteriormente.

Com isso, utilizou-se o protocolo de extração 5, que consiste na extração do DNA utilizando todo o corpo da abelha. Os resultados obtidos estão na figura 4.

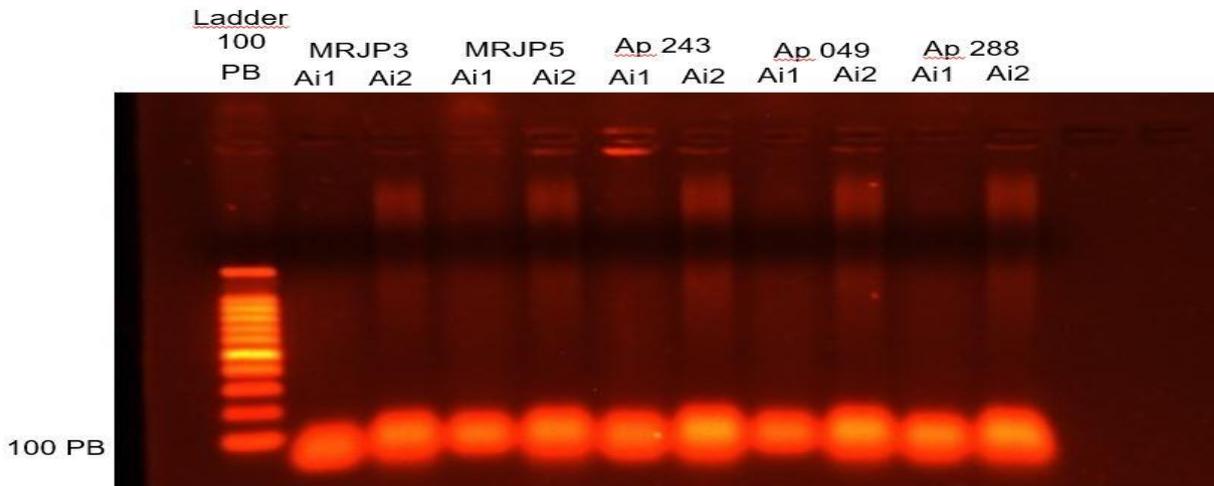
Figura 4 – Resultado da extração de DNA através do protocolo 5. Nota-se a presença de bandas nas duas amostras. Ai1 – Utilizando a Abelha inteira (número 1); Ai2 – Utilizando a Abelha inteira (número 2).



Fonte: O autor.

Ao contrário dos outros protocolos, nesse foi possível extrair DNA genômico total de boa qualidade, como evidenciado pela presença das bandas. Outros protocolos semelhantes foram utilizados por Waldschmidt et al. (1997) e Rowe et al. (1997). Essas amostras DNA foram utilizadas para amplificação por meio da PCR com 5 microssatélites (MRJP3, MRJP5, Ap 243, Ap 049 e Ap 288). Os resultados obtidos encontram-se na figura 5.

Figura 5 – Produtos da extração amplificados utilizando marcadores moleculares do tipo SSRs. Amplificou-se duas amostras para cada marcador. Usou-se duas amostras diferentes (Ai1 e Ai2) para cada marcador.



Fonte: O autor.

É possível observar que todos os primers SSRs amplificaram fragmentos com tamanho entre 55 a 100pb. Também ressaltamos a presença de polimorfismo, pois é evidente a diferença do tamanho de amplificação para uma mesma região entre os indivíduos, sendo este requisito fundamental para realizar o estudo de variabilidade genética entre os indivíduos de uma mesma espécie.

6 CONCLUSÕES

O protocolo 5 mostrou-se o mais eficaz neste trabalho, sendo possível extrair um material de qualidade e posteriormente amplificá-lo via PCR. Mais protocolos podem ser testados para que seja possível realizar a extração a partir da asa da abelha, pois, por ser um método não-letal, tem muito a contribuir para estudos genéticos. Contudo, no programa de melhoramento genético das abelhas da UTFPR-DV, o protocolo 5 será empregado para realizar a extração de DNA genômico total de abelhas operárias das colônias de *A. mellifera* da Unidade Ensino e Pesquisa (UNEPE - Apicultura). O presente trabalho foi de suma importância para que seja possível dar continuidade no projeto de análise de diversidade genética utilizando marcadores SSRs das colônias da UNEPE-Apicultura, sendo possível verificar que uma nova metodologia de seleção e coleta terá de ser analisada, levando em consideração o número de abelhas operárias de cada colônia será utilizado.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEMEL. **APICULTURA NO BRASIL**. Disponível em: <<http://brazillletsbee.com.br/o-setor.aspx>>. Acesso em: 13 maio 2018.

AHN, Ah-jin et al. Molecular Prevalence of Acarapis Mite Infestations in Honey Bees in Korea. **The Korean Journal Of Parasitology**, [s.l.], v. 53, n. 3, p.315-320, 30 jun. 2015. Korean Society for Parasitology.

ALBERT, Stefan; KLAUDINY, Jaroslav; HMOOTH, Jozef. Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [s.l.], v. 29, n. 5, p.427-434, maio 1999. Elsevier BV.

ALBERT, Stefan et al. The Family of Major Royal Jelly Proteins and Its Evolution. **J Mol Evol**, [s.i.], p.290-297, fev. 1999.

ALMEIDA, Marco Antonio Dantas de; CARVALHO, Corália Maria Sobral. **Apicultura: uma oportunidade de negócio sustentável**. Salvador: Sebrae Bahia, 2009. 52 p.

AMORIM, Marineide Rodrigues et al. **Extração Não Letal de DNA em Abelhas do Gênero Melipona**. Teresina: Embrapa, 2007.

BORÉN, A.; CAIXETA, E.T. Marcadores moleculares. Ed. UFV, Viçosa, Minas Gerais, 2006.

CHÂLINE, Nicolas et al. Non-lethal sampling of honey bee, *Apis mellifera*, DNA using wing tips. **Apidologie**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.311-318, maio 2004. Springer Nature.

ESTOUP, Arnaud et al. Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 21, n. 6, p.1427-1431, 1993. Oxford University Press (OUP).

ESTOUP, Arnaud et al. Microsatellite Variation in Honey Bee (*Apis Mellifera* L.) Populations: Hierarchical Genetic Structure and Test of the Infinite Allele and Stepwise Mutation Models. **Genetics**, [s.i.], v. 150, n. 2, p.679-695, jun. 1995.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J.. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 14, n. 8, p.2611-2620, jul. 2005. Wiley.

EXCOFFIER, Laurent; LISCHER, Heidi E. L.. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.564-567, maio 2010. Wiley.

FRANÇOSO, Elaine; GOMES, Fernando; ARIAS, Maria Cristina. A protocol for isolating insect mitochondrial genomes: a case study of NUMT in *Melipona flavolineata* (Hymenoptera: Apidae) **Mitochondrial Dna**, [s.l.], p.1-4, 10 jun. 2015.

FRANKHAM, Richard; BALLOU, Jonathan D.; BRISCOE, David A.. **Fundamentos de genética da conservação**. Ribeirão Preto: Sbg, 2008. 280 p.

GALLO, Domingos et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: Fealq, 2002. 920 p.

GONÇALVES, Rodrigo Barbosa. **Filogenia Molecular das abelhas Augochlorini (Hymenoptera, Apidae)**. 2011. 146 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

GRIFFITHS, A.J.F. et al. **Introdução à Genética**. Ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2008.

HAMIDUZZAMAN, Mollah Md.; GUZMAN-NOVOA, Ernesto; GOODWIN, Paul H.. A multiplex PCR assay to diagnose and quantify Nosema infections in honey bees (*Apis mellifera*). **Journal Of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 105, n. 2, p.151-155, out. 2010

HARTL, Daniel L.; CLARK, Andrew G.. **Princípios de genética de populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660 p.

ISSA, M.r.c. et al. Rapid method for DNA extraction from the honey bee *Apis mellifera* and the parasitic bee mite *Varroa destructor* using lysis buffer and proteinase K. *Genetics And Molecular Research*, [s.l.], v. 12, n. 4, p.4846-4854, 2013. **Genetics and Molecular Research**.

Ji, Ting; YIN, Ling; CHEN, Guohong. Genetic diversity and population structure of Chinese honeybees (*Apis cerana*) under microsatellite markers. **African Journal Of Biotechnology**, [s.i.], v. 10, n. 9, p.1712-1720, 28 fev. 2011.

KASKINOVA, M. D. et al. Analysis of the genetic structure of honeybee (*Apis mellifera* L.) populations. **Russian Journal Of Genetics**, [s.l.], v. 51, n. 10, p.1033-1035, out. 2015. Pleiades Publishing Ltd.

KINGHORN, Brian; WERF, Julius van Der; RYAN, Margaret. **Melhoramento Animal: uso de Novas Tecnologias**. Piracicaba: Fealq, 2006. 367 p.

KLAUDINY, J et al. Molecular cloning of two cDNAs from the head of the nurse honey bee (*Apis mellifera*L.) for coding related proteins of royal jelly. **Journal Of Apicultural Research**, [s.l.], v. 33, n. 2, p.105-111, jan. 1994. Informa UK Limited.

LEWIS, P.O. e ZAYKIN, D. (2000) Genetic data analysis: Computer program for the analysis of allelic data. ver. 1.0.

LOPES, Paulo Sávio et al. **Teoria do melhoramento animal**. Belo Horizonte: Fepmvz Editora, 2005. 118 p.

LYNCH, M. e WALSH, B. (1998) Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 980.

MARTINEZ, Omar Arvey; SOARES, Ademilson Espencer Egea. Melhoramento genético na apicultura comercial para produção da própolis. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim**, Salvador, v. 13, n. 4, p.982-900, dez. 2012.

MASUKU, B.. Socioeconomic analysis of beekeeping in Swaziland: A case study of the Manzini Region, Swaziland. **Journal Of Development And Agricultural Economics**, [s.l.], v. 5, n. 6, p.236-241, 30 jun. 2013. Academic Journals.

MATTILA, H. R.; SEELEY, T. D.. Genetic Diversity in Honey Bee Colonies Enhances Productivity and Fitness. **Science**, [s.l.], v. 317, n. 5836, p.362-364, 20 jul. 2007. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

MATTILA, H. R; BURKE, K. M; SEELEY, T. D. Genetic diversity within honeybee colonies increases signal production by waggle-dancing foragers. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 275, n. 1636, p.809-816, 7 abr. 2008. The Royal Society.

OLDROYD, Benjamin P. et al. Effects of Intracolony Genetic Diversity on Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colony Performance. **Annals Of The Entomological Society Of America**, [s.l.], v. 85, n. 3, p.335-343, 1 maio 1992. Oxford University Press (OUP).

OLIVEIRA, Eder Jorge et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics And Molecular Biology**, Piracicaba, v. 2, n. 29, p.294-307, 25 ago. 2006.

PARPINELLI, Rejane Stubs. **Avaliação de marcadores microssatélites mrjps em colônias de *Apis mellifera* africanizadas selecionadas para a produção de geleia real**. 2011. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bacharelado em Zootecnia, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

PEREIRA, Jonas Carlos Campos. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. 6. ed. Belo Horizonte: Fepmvz Editora, 2012. 758 p.

PERRIER, X. e JACQUEMOUD-COLLET J.P. (2006) DARwin: Dissimilarity Analysis and Representation for Windows. Version 5.0.158. Available at <http://darwin.cirad.fr/darwin>.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p.945-959, 2000.

RAHIMI, Ataollah et al. Microsatellite genetic diversity of *Apis mellifera* meda skorikov. **Molecular Biology Reports**, [s.l.], v. 41, n. 12, p.7755-7761, 8 ago. 2014. Springer Nature.

ROHLF, F.J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.1., New York, USA, 2000.

ROWE, D.j. et al. Seven polymorphic microsatellite loci in honeybees (*Apis mellifera*). **Insectes Sociaux**, [s.l.], v. 44, n. 2, p.85-93, 1 maio 1997. Springer Nature.

SEBRAE AGRONEGÓCIO. **BRASIL: POTENCIAL FABULOSO PARA ATIVIDADE APÍCOLA**. Disponível em: <<http://sebraemercados.com.br/brasil-potencial-fabuloso-para-atividade-apicola/>>. Acesso em: 09 maio 2018.

SOLIGNAC, Michel et al. Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome. **Molecular Ecology Notes**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.307-311, jun. 2003. Wiley.

STARKS, P.t; PETERS, J. M.. Semi-nondestructive genetic sampling from live eusocial wasps, *Polistes dominulus* and *Polistes fuscatus*. **Insectes Sociaux**, v. 49, p.20-22, 2002.

TARPY, D. R.. Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 270, n. 1510, p.99-103, 7 jan. 2003. The Royal Society.

TESSIER, C. et al. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. **Tag Theoretical And Applied Genetics**, [s.l.], v. 98, n. 1, p.171-177, 25 jan. 1999. Springer Nature

TIVANG, J.g.; NIENHUIS, J.; SMITH, O.s.. Estimation of sampling variance of molecular marker data using the bootstrap procedure. **Theoretical And Applied Genetics**, [s.l.], v. 89-89, n. 2-3, p.259-264, out. 1994. Springer Nature.

TRIPLEHORN, Charles A.; JOHNSON, Norman F.. **Estudo dos insetos**. 7. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2013. 809 p.

WALDSCHMIDT, Ana Maria et al. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Brazilian Journal Of Genetics**, [s.l.], v. 20, n. 3, p.421-423, set. 1997. FapUNIFESP (SciELO).

WILLIAMS-BLANGERO, Sarah; BLANGERO, John. Collection of Pedigree Data for Genetic Analysis in Isolate Populations. **Human Biology**, [s.l.], v. 78, n. 1, p.89-101, 2006. Johns Hopkins University Press.

WOYKE, J. Effect of Sex Allele Homo-Heterozygosity on Honeybee Colony Populations and on their Honey Production I. Favourable Development Conditions and Unrestricted Queens. **Journal Of Apicultural Research**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.51-63, jan. 1980. Informa UK Limited.