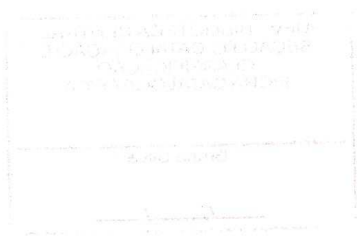


**FERNANDA APARECIDA FERRARI SOARES**

**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE BASES AT E GC POR CITOMETRIA  
DE FLUXO EM ABELHAS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação  
em Genética e Melhoramento,  
para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012**



Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

S676d  
2012

Soares, Fernanda Aparecida Ferrari, 1985-  
Determinação da composição de bases AT e GC por  
citometria de fluxo em abelhas / Fernanda Aparecida Ferrari  
Soares. – Viçosa, MG, 2012.  
vii, 22f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Carlos Roberto de Carvalho.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 19-22.

1. Citometria de fluxo. 2. Ácido desoxirribonucleico -  
Análise. 3. Genoma. 4. Abelha. I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.

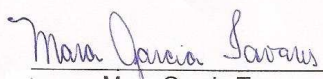
CDD 22. ed. 572.8


FERNANDA APARECIDA FERRARI SOARES

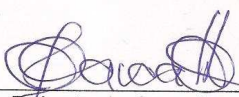
DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE BASES AT E GC POR  
CITOMETRIA DE FLUXO EM ABELHAS

Dissertação apresentada  
à Universidade Federal de  
Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Genética e  
Melhoramento, para obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de fevereiro de 2012

  
\_\_\_\_\_  
Maria Garcia Tavares

  
\_\_\_\_\_  
Wellington Ronildo Clarindo

  
\_\_\_\_\_  
Carlos Roberto de Carvalho  
(Orientador)

**Aos meus pais Valme e Eny  
Ao meu namorado Bruno**

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa por fornecer um ensino público de qualidade, sem o qual dificilmente teria acesso a um curso de pós-graduação.

Ao Departamento de Biologia Geral, aos professores e funcionários que foram fundamentais na minha caminhada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Ao meu orientador e amigo Professor Carlos Roberto de Carvalho, pelos grandes ensinamentos e por ser um exemplo profissional.

Aos meus conselheiros Prof. Wellington Ronildo Clarindo, Prof<sup>a</sup>. Mara Garcia Tavares e Prof. Gustavo Ferreira Martins pelo auxílio.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética e Citometria: Maria Andréia, Andrea, Paulo, Evandro, Chris, Sirlei, Isabella, Thaís e Guilherme pelo apoio e pelos muitos momentos de descontração.

À Deus, acima de tudo, pelo dom da vida, pela proteção de cada dia e por permitir alcançar mais um objetivo.

Aos meus pais Eny e Valme pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos; aos meus irmãos Rafael e Ramon pela cumplicidade e fraternidade que nos une.

Ao meu namorado e melhor amigo Bruno por tanto carinho, apoio, incentivo e compreensão. Obrigada por tornar tudo mais fácil!

Às minhas amigas e companheiras de república, Larisse, Juliana e Rocio pela companhia, pela amizade e pela torcida.

Aos amigos que me acompanharam até hoje sempre incentivando e transmitindo energia positiva.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. OBJETIVOS.....	7
3.1. Objetivo Geral.....	7
3.2. Objetivos Específicos.....	7
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
4.1. Material Genético.....	8
4.2. Citometria de Fluxo.....	8
4.2.1. Determinação do conteúdo de DNA total.....	8
4.2.2. Determinação da composição de bases AT e GC.....	10
5. RESULTADOS.....	13
6. DISCUSSÃO.....	15
7. CONCLUSÃO.....	18
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

## RESUMO

SOARES, Fernanda Aparecida Ferrari, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Determinação da composição de bases AT e GC por citometria de fluxo em abelhas.** Orientador: Carlos Roberto de Carvalho. Coorientadores: Mara Garcia Tavares e Gustavo Ferreira Martins.

A determinação do tamanho genômico e da composição de bases AT e GC é considerada uma informação crucial dentro das análises que visam à caracterização do material genético de um indivíduo, ou mesmo em estudos de biologia molecular e de interpretações filogenéticas e evolutivas. Por ser relativamente rápida, precisa e econômica, a citometria de fluxo tem se destacado como ferramenta para quantificação do conteúdo de DNA e caracterização da composição de bases em diversos grupos de plantas e animais, incluindo insetos. Considerando os insetos himenópteros, até o momento cerca de 100 indivíduos tiveram seu conteúdo de DNA determinado, e 46 % destes são abelhas sem ferrão. Apenas uma espécie de abelha, a *Apis mellífera*, teve sua composição de bases AT e GC determinadas até o momento e esses dados foram obtidos por meio do sequenciamento genômico. Esse trabalho buscou detalhar o procedimento para a quantificação de DNA e desenvolver metodologia para a determinação da composição de bases AT e GC por citometria de fluxo em abelhas. Objetivou-se então contribuir com o aumento do número de espécies com conteúdo de DNA determinado e disponibilizar uma metodologia eficiente para caracterização do genoma. As espécies de abelhas empregadas foram *Scaptotrigona xantotricha*, *Trigona hyalinata* e *Partamona rustica*. Os gânglios de cada pupa foram utilizados para preparação da suspensão nuclear analisada no citômetro de fluxo. A *S. xantotricha* (2C = 0,88 picogramas) foi utilizada como padrão interno nas análises de determinação do conteúdo de DNA nuclear total e da proporção de bases AT e GC. Os histogramas gerados na citometria de fluxo apresentaram coeficientes de variação abaixo de 5,0 % e possibilitaram a determinação da quantidade absoluta de DNA nuclear e da composição de bases AT e GC. *P. rustica* e *T. hyalinata* apresentaram 1,15 e 1,07 picogramas de DNA, respectivamente. *S. xantotricha* apresentou 61,32 % de bases AT e 38,68 % de bases GC; *P. rustica* apresentou AT = 62,82 % e GC = 37,18 %; *T. hyalinata* apresentou AT = 62,40 % e GC = 37,60 %. Esse trabalho detalha o protocolo para quantificação do DNA por meio da citometria de fluxo, contribuindo para o aumento do número de espécies com conteúdo de DNA determinado. Ainda,

disponibiliza metodologia para a determinação da composição de bases AT e GC em abelhas também empregando a citometria de fluxo. Essa nova técnica pode ser aplicada a outras espécies de abelhas ou até mesmo a outros insetos himenópteros, a fim de fornecer dados relevantes para análises de caracterização do genoma.

## ABSTRACT

SOARES, Fernanda Aparecida Ferrari, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Determination of the AT GC base composition by flow cytometry in bees.** Adviser: Carlos Roberto de Carvalho. Co-advisers: Mara Garcia Tavares and Gustavo Ferreira Martins.

The genomic size determination and AT GC base composition should be considered an important factor in the analysis to genetic material characterization, or even in studies of molecular biology and phylogenetic interpretations. Flow cytometry has emerged as a tool for quantification of DNA content and characterization of base composition in many plant and animal groups, including insects. Considering the hymenopterous, about 100 species had their DNA content determined, and 46 % of them are stingless bees. This work aimed to detail the procedure for DNA quantification and to develop methodology for determining the AT and GC base composition by flow cytometry in bees. It will increase the number of species with DNA content determined and provide an effective genomic characterization procedure. *Scaptotrigona xantotricha* (2C = 0.88 picograms) was used as internal standard to determinate the DNA content and base composition of *Trigona hyalinata* and *Partamona rustica*. The histograms generated in the flow cytometry showed coefficients of variation below 5.0 % and enabled the determination of the nuclear DNA content and AT GC composition. *P. rustica* and *T. hyalinata* showed 1.15 and 1.07 picograms of DNA, respectively. *S. xantotricha* presented 61.32 % of bases AT and 38.68 % of GC, *P. rustica* presented AT = 62.82 % and GC = 37.18 %, *T. hyalinata* presented AT = 62.40 % and GC = 37.60 %. This study details the protocol for DNA quantification by flow cytometry, contributing to increasing the number of species of DNA content determined. Also provides methodology for determining the base composition AT and GC bees using flow cytometry. This new technique can be applied to other bee species or even other hymenopteran insects, in order to provide relevant data for genomic characterization analysis.

# 1. INTRODUÇÃO

O conhecimento do tamanho do genoma de um organismo é de grande relevância em virtude da sua aplicação direta em estudos filogenéticos, em análises de correlações entre o tamanho do genoma e características fisiológicas, em análises do efeito ambiental sobre o tamanho do genoma, em estudos de variabilidade intra e interespecífica e em estudos evolutivos (Ochatt, 2008).

A determinação da composição de bases AT e GC complementa a caracterização genômica de um organismo, contribuindo principalmente para: (i) estudos taxonômicos e evolutivos, (ii) análises comparativas da estrutura genômica, (iii) projetos de sequenciamento e (iv) mapeamento genético (Gregory, 2005).

Segundo Gregory (2005), a citometria de fluxo, a citometria de imagem e o sequenciamento genômico têm sido considerados os principais métodos para estimar o tamanho do genoma nuclear. Dentre eles, a citometria de fluxo tem se mostrado uma ferramenta relativamente econômica, rápida, precisa e de reprodutibilidade e, portanto, tem ganhado destaque.

Diversas plantas e animais, incluindo insetos, apresentam seu conteúdo de DNA determinado (Bennett e Leitch, 2012; Gregory, 2012). No entanto, o tamanho do genoma da maioria das espécies de abelhas da família Apidae ainda permanece completamente desconhecido, apesar da reconhecida importância ecológica como polinizadores ativos e da grande diversidade deste grupo. Estudos sobre a quantidade de DNA em abelhas foram realizados recentemente por Lopes et al. (2009), Tavares et al. (2010a,b, 2011). Como resultado desses trabalhos, 45 espécies de abelhas sem ferrão tiveram seu conteúdo de DNA (valor 1C)

determinado por citometria de fluxo, dentre as quais três espécies de *Partamona* e três espécies de *Trigona*.

Até o momento não se encontra disponível nenhuma metodologia de citometria de fluxo para determinação da proporção de bases AT e GC em abelhas. *Apis mellifera* é a única espécie desse grupo cujo conteúdo de bases AT e GC está estimado. Esses dados foram obtidos por meio de sequenciamento de DNA. Os autores determinaram que o genoma dessa abelha apresenta 67 % de bases AT e 33 % de bases GC (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006). Segundo Bennett et al. (2003), considerar um genoma completamente sequenciado implica num conceito relativo, já que os dados obtidos por meio do sequenciamento podem conter erros causados por subestimação do número de bases. Isso porque dificilmente todas as sequências de bases serão representadas ao final da análise.

Portanto, esse trabalho propõe detalhar o procedimento para a quantificação de DNA nuclear por citometria de fluxo, além de contribuir para o aumento do número de espécies de abelhas com conteúdo de DNA mensurado. Propõe ainda disponibilizar metodologia para determinação do conteúdo AT e GC também baseada na técnica de citometria de fluxo, visto que essa ferramenta é relativamente rápida, e de grande reprodutibilidade, além de ser amplamente empregada para a quantificação e caracterização do genoma nuclear de diversas espécies.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A determinação do tamanho genômico deve ser considerada um importante dado dentro das análises que visam a caracterização do material genético de um indivíduo ou mesmo em estudos de biologia molecular e de interpretações filogenéticas e evolutivas (Gregory, 2005).

A citometria de fluxo é uma ferramenta amplamente utilizada para quantificar o DNA nuclear (Dolezel e Bartos, 2005). Ela apresenta vantagens frente outras técnicas de quantificação, uma vez que fornece o valor C de forma rápida e acurada, a partir de uma pequena quantidade de amostra, e é economicamente viável. Essa técnica baseia-se no pressuposto de que existe uma relação linear entre a quantidade de DNA e a fluorescência emitida pelos núcleos, tanto da amostra quanto do padrão de referência utilizado, cujo conteúdo de DNA é conhecido (Zoldo et al., 1998).

O citômetro de fluxo avalia a intensidade relativa de fluorescência de núcleos isolados a partir de células obtidas de tecidos não proliferativos. A análise gera um histograma típico, em ciclos celulares não alterados. Nesses histogramas, o pico maior corresponde ao número de núcleos na fase  $G_0/G_1$  e o pico menor ao número de núcleos na fase  $G_2$ , enquanto a região entre os dois picos corresponde ao número de núcleos em fase S (Galbraith et al., 1983; Price et al., 2000; Dolezel e Bartos, 2005).

A citometria de fluxo foi desenvolvida originalmente como um método para rápida contagem e análise de células sanguíneas. Com a evolução da técnica, ela tornou-se importante ferramenta em muitas áreas de pesquisas biológicas (Dolezel, 1997), destacando-se por permitir o monitoramento do ciclo celular e

suas alterações (Rabinovitch, 1994) e por possibilitar também a detecção de aneuploidias (Kawara et al., 1999) e apoptose (Vermes et al., 2000).

Para estimar o conteúdo de DNA nuclear por citometria de fluxo, suspensões de núcleos são coradas com fluorocromos DNA-específicos e a quantidade de luz emitida por cada partícula é quantificada (Dolezel e Bartos, 2005). Segundo Dolezel (1997), a posição do pico  $G_0/G_1$  no histograma da amostra analisada é comparada com a posição do pico de uma amostra padrão, que tem seu conteúdo de DNA já estabelecido. Desse modo, o tamanho do genoma nuclear é determinado em picogramas (pg) de DNA ou, quando é realizada a conversão, em mega pares de bases (Mpb); sendo que 1 pg de DNA representa 978 Mpb (Dolezel et al., 2003).

A tabela 1 apresenta os fluorocromos mais utilizados para estimar o conteúdo de DNA nuclear. Dentre esses fluorocromos, o iodeto de propídeo (IP) e o brometo de etídeo (BE) são os mais recomendados para a determinação do valor absoluto, uma vez que esses corantes intercalam-se quantitativamente na cadeia dupla do DNA (Loureiro e Santos, 2004).

Os demais fluorocromos, tais como DAPI e Mitramicina apresentam afinidade com regiões ricas em pares de bases AT ou GC, respectivamente, o que possibilita determinar a composição de bases de uma determinada espécie em relação a um padrão de referência (Marie e Brown, 1993).

**Tabela 1.** Corantes fluorescentes mais utilizados em CF para estimar o conteúdo de DNA nuclear.

Fluorocromo	Modo de Ligação Primário	Comprimento de Onda	
		Excitação	Emissão
Iodeto de Propídeo (IP)	Intercalação	525 (azul-verde)	605 (vermelho)
Brometo de Etídeo (BE)	Intercalação	535 (azul-verde)	602 (vermelho)
4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)	Regiões ricas em A-T	345 (UV)	460 (azul)
Hoechst 33258	Regiões ricas em A-T	360 (UV)	460 (azul)
Cromomicina	Regiões ricas em G-C	445 (violeta-azul)	570 (verde)
Mitramicina (MI)	Regiões ricas em G-C	445 (violeta-azul)	575 (verde)

(Loureiro e Santos, 2004)

A quantificação do valor C, juntamente com o padrão de arranjo das sequências e a composição de bases nitrogenadas dos genomas são de grande importância em estudos moleculares. Por exemplo, o tamanho do genoma determina o número de clones necessários na construção de bibliotecas genômicas. O padrão de arranjo das seqüências e o conteúdo de bases GC influenciam as estratégias de clonagem e as condições de hibridização (Warren e Crampton, 1991).

De acordo com Bennett e Leitch (2012) e Gregory (2012), estão disponíveis os valores 1C obtidos por citometria de fluxo de 4.945 espécies de plantas e 1.653 espécies de animais, respectivamente. Especificamente em insetos, apenas 706 espécies tiveram seu conteúdo de DNA determinado. Dentro do grupo Hymenoptera, as abelhas destacam-se como polinizadores de plantas floríferas em diversos ecossistemas (Bawa, 1990; Neff e Simpson, 1993), além de terem a sua ação amplamente reconhecida na perpetuação de espécies silvestres, contribuindo assim para a manutenção do equilíbrio ecológico (LaSalle e Gauld, 1993).

No Brasil, destacam-se como polinizadoras as abelhas nativas e, por apresentarem o ferrão atrofiado, são conhecidas popularmente como “abelhas sem ferrão”. Essas abelhas pertencem à família Apidae e segundo Michener (2000), são descritas mais de 500 espécies em 50 gêneros, sendo que mais de 300 espécies são encontradas na América Central e América do Sul.

Esse grupo de abelhas exibe ampla distribuição geográfica, sendo encontradas nas regiões tropicais e subtropicais do hemisfério sul, nas Américas do Sul e Central, Ásia, Ilhas do Pacífico, Austrália, Nova Guiné e África (Camargo e Pedro, 1992). Algumas espécies dessa família são essenciais para a polinização de grande parte da flora da floresta Atlântica e, dependendo do ecossistema, elas polinizam de 40 a 90% das árvores nativas (Kerr et al., 1996).

Considerando-se o pequeno número de espécies de Hymenoptera que tiveram seu conteúdo de DNA determinado por citometria de fluxo, cerca de 70 espécies até o momento (Gregory, 2012; Tavares et al., 2010a,b, 2011), pode-se dizer que pouco se sabe sobre o tamanho do genoma, sua constituição e evolução nesse grupo.

Embora algumas espécies de abelhas já apresentem o seu conteúdo de DNA determinado, apenas uma espécie, *Apis mellifera* teve sua composição de bases AT e GC caracterizada. Desse modo, há necessidade de disponibilizar uma metodologia que possibilite a obtenção desses dados de forma rápida e acurada, visando à caracterização genômica desse grupo de insetos.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. OBJETIVO GERAL

Estabelecimento de metodologia para determinação da composição de bases AT e GC utilizando as espécies de abelhas *Scaptotrigona xantotricha*, *Partamona rustica* e *Trigona hyalinata* como referenciais metodológicos.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o conteúdo de DNA nuclear, por meio da citometria de fluxo, para as espécies de abelha *Partamona rustica* e *Trigona hyalinata*;
- Estimar o conteúdo de DNA nuclear para cada espécie anteriormente citada em picogramas e em pares de bases;
- Desenvolver metodologia de citometria de fluxo para determinar a composição de bases AT e GC em abelhas utilizando as espécies *Scaptotrigona xantotricha*, *Partamona rustica* e *Trigona hyalinata*;
- Determinar a composição de bases AT (%) e GC (%) para as três espécies analisadas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL GENÉTICO

Pupas de operárias de *Trigona hyalinata* e *Partamona rustica* foram coletadas de colônias em Lontra/MG. *Scaptotrigona xantotricha* foi coletada de colônias em Viçosa/MG. *P. rustica* foi identificada pela Prof. Silvia Regina de Menezes Pedro (USP); *S. xantotricha* e *T. hyalinata* foram identificadas pelo Prof. Lúcio Antônio de Oliveira Campos (UFV). Todas as amostras foram cedidas gentilmente pela Prof<sup>a</sup>. Mara Garcia Tavares (UFV). As análises foram realizadas utilizando-se o gânglio cerebral de cada indivíduo. As espécies *P. rustica* e *T. hyalinata* foram utilizadas para quantificação do DNA nuclear total. As análises para determinar a proporção de bases AT e GC, por sua vez, foram realizadas para as três diferentes espécies citadas anteriormente, sendo a *S. xantotricha* empregada como padrão interno para análise das outras duas espécies.

### 4.2. CITOMETRIA DE FLUXO

#### 4.2.1 Determinação do conteúdo de DNA total

Utilizou-se a abelha *Scaptotrigona xantotricha* (2C = 0,88 pg de DNA) (Figura 1a) como padrão interno para a determinação do conteúdo de DNA nuclear absoluto e em pares de bases (pb) para cada indivíduo analisado (Lopes et al., 2009).

Com o auxílio de uma lupa, o gânglio cerebral do padrão (Figura 1b) e de cada amostra de pupa de abelha foi extraído, lavado em solução fisiológica (NaCl

0,155 mM) e transferido cuidadosamente, com o auxílio de um estilete de aço inoxidável para um microtubo Eppendorf® de 1,5 ml (Figura 2a) com 100 µl do tampão de extração nuclear contendo 0,1 M de ácido cítrico, 0,5 % de Tween 20 e 50 µg. mL<sup>-1</sup> de RNase, pH = 2,3 (Loureiro et al., 2006a,b; Tavares et al., 2010). Em seguida, o gânglio de cada amostra, simultaneamente com o do padrão, foi celularizado com o auxílio de um pistilo Eppendorf® (Figura 2b) a fim de se obter uma suspensão de núcleos. A suspensão obtida foi acrescida de 1,0 ml do mesmo tampão, filtrada em uma tela de nylon de 30 µm Partec CellTrics® (Figura 2c) para um microtubo Eppendorf® de 2,0 ml (Figura 2d) e centrifugada a 100 g por 5 minutos.

O precipitado foi ressuspenso em 100 µl do tampão de extração e permaneceu incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. A solução foi filtrada em uma tela de nylon de 20 µm Partec CellTrics® (Figura 2e) para um tubo de citometria Sarstedt (Figura 2f). Os núcleos em suspensão foram corados com 1,5 ml de solução contendo 0,4 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O suplementado com 75 µM de iodeto de propídeo e 50 µg. ml<sup>-1</sup> de RNase pH = 7,8, e permaneceram no escuro de 5 a 20 minutos a temperatura ambiente. Foram realizadas pelo menos quatro repetições para cada amostra, sendo então analisada num citômetro de fluxo Partec PAS® equipado com um laser de 488 nm. O tamanho médio do genoma de cada espécie foi mensurado em picogramas de acordo com a fórmula adaptada de Dolezel e Bartos (2005) e o valor 2C foi convertido para megapares de bases (1pg = 978 Mpb) (Dolezel et al., 2003).

#### 4.2.2 Determinação da composição de bases AT e GC

A fim de proporcionar linearidade nas análises e determinar um padrão interno apropriado para utilização no cálculo da composição de bases AT e GC por citometria de fluxo em abelhas, inicialmente a proporção de pares de bases AT foi determinada para *Scaptotrigona xantotricha* de tal modo que essa espécie pudesse ser utilizada posteriormente como padrão também em outras abelhas. Essa espécie já vem sendo empregada como padrão interno na determinação do conteúdo de DNA total em abelhas (Lopes et al., 2009). A análise foi realizada utilizando como padrão interno a fêmea adulta de *Drosophila melanogaster*, que apresenta seu conteúdo de DNA total mensurado e a composição AT e GC determinada (valor 1C = 0,18 pg; AT = 59 % e GC = 41 %).

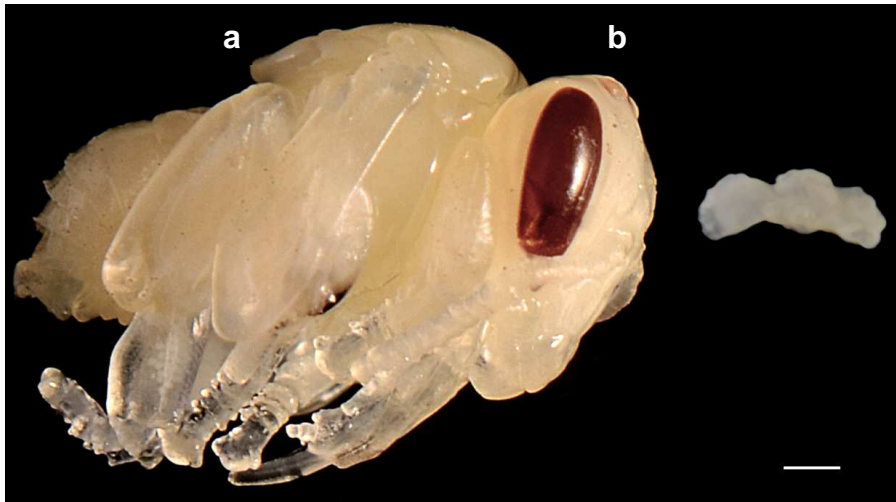
Com o auxílio de uma lupa, os gânglios cerebrais tanto da *Drosophila* quanto da pupa de *S. xantotricha* foram extraídos, lavados em solução fisiológica (NaCl 0,155 mM) e transferidos cuidadosamente, com o auxílio de um estilete de aço inoxidável para um tubo Eppendorf® de 1,5 ml com 100 µl do tampão de extração descrito anteriormente. Em seguida, os gânglios de cada indivíduo foram simultaneamente celularizados com o auxílio de um pistilo Eppendorf® a fim de se obter uma suspensão de núcleos. A suspensão obtida foi acrescida de 1,0 ml do mesmo tampão, filtrada em uma tela de nylon de 30 µm Partec CellTrics® para um tubo Eppendorf® de 2,0 ml e centrifugada a 100 g por 5 minutos.

O precipitado foi ressuspenso em 100 µl do tampão de extração e permaneceu incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. A solução foi filtrada em uma tela de nylon de 20 µm Partec CellTrics® para um tubo de citometria Sarstedt. Os núcleos em suspensão foram corados com 1,5 ml de solução contendo 0,4 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O suplementado com 1,5 µM do corante

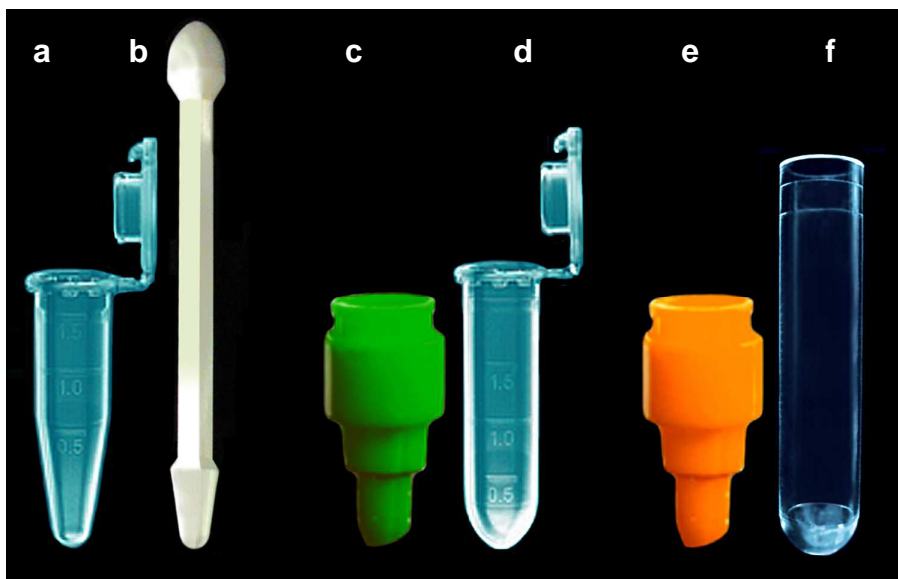
4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), pH = 7,8, e permaneceram a temperatura ambiente no escuro de 5 a 20 minutos. Foram realizadas quatro repetições sendo quatro indivíduos diferentes da mesma espécie, e as amostras foram analisadas num citômetro de fluxo Partec PAS<sup>®</sup> equipado com uma lâmpada de mercúrio de 388nm.

A composição de bases AT de *Scaptotrigona* foi determinada por meio da fórmula descrita por Godelle et al. (1993):  $AT (\%)_{amostra} = AT (\%)_{padrão} \times (R_{DAPI}/R_{IP})^{1/3}$ , onde  $R_{IP}$  = razão entre a intensidade de fluorescência da amostra em relação à do padrão, utilizando o corante IP, e  $R_{DAPI}$  a razão utilizando DAPI. A composição de bases GC foi determinada como  $GC (\%) = 100 - AT (\%)$ .

Após a determinação da composição de bases AT e GC da *S. xantotricha* para utilização como padrão interno em análises de composição de bases em abelhas, esta foi então processada junto às espécies *Trigona hyalinata* e *Partamona rustica*. Seguindo o protocolo descrito acima, as proporções de bases AT e GC foram determinadas para cada indivíduo.



**Figura 1** - Pupa da fêmea de *Scaptotrigona xantotricha* (a) e o gânglio cerebral (b) utilizado como padrão interno nas análises de quantificação do DNA nuclear e determinação da composição de bases AT e GC. Barra = 1mm.

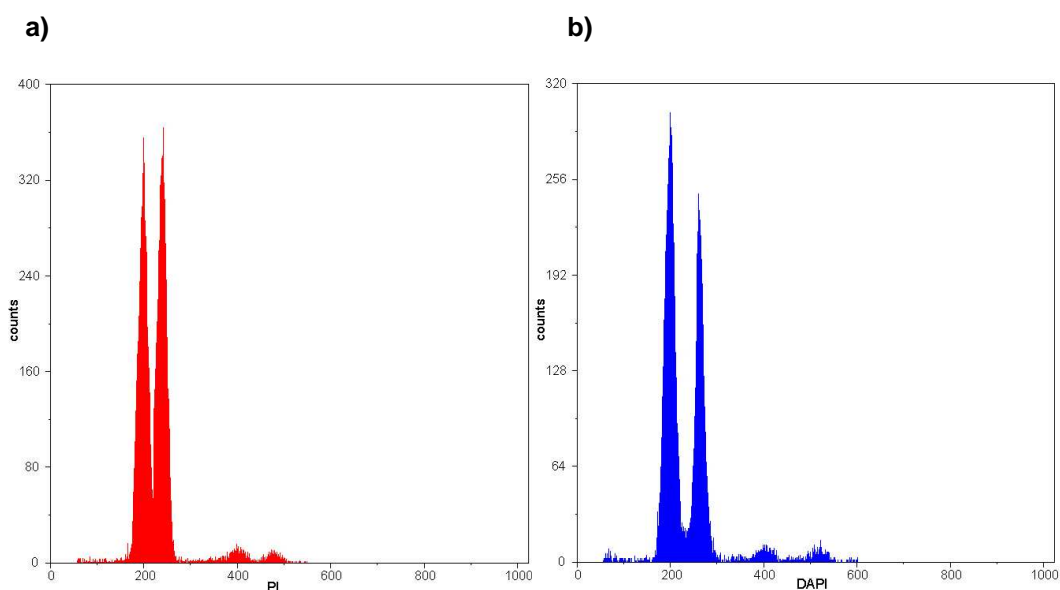


**Figura 2** – Materiais utilizados para o preparo da suspensão nuclear. Tudo Eppendorf® de 1,5 ml (a) e pistilo de plástico Eppendorf® (b) utilizado para celularizar o material. Filtro com membrana de 30 µm Partec CellTrics® (c) e tubo Eppendorf® de 2,0 ml (d). Filtro com membrana de 20 µm Partec CellTrics® (e) e tubo de citometria Sarstedt (f).

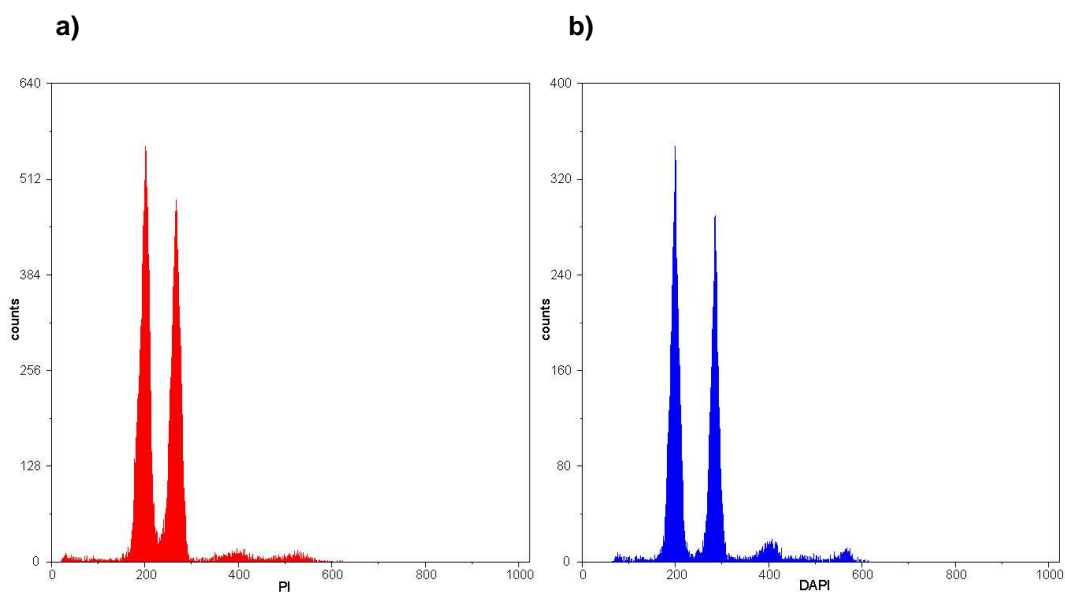
## 5. RESULTADOS

O processamento das suspensões nucleares por meio da citometria de fluxo gerou histogramas cujos picos  $G_0/G_1$  do padrão (ajustado para o canal 200) e das amostras puderam ser diferenciados e identificados. O material biológico utilizado, o gânglio cerebral, possibilitou a obtenção de núcleos intactos e fisiologicamente ativos. Além disso, esse material apresenta ploidia conhecida, informação prévia necessária nesse tipo de análise. Os histogramas obtidos apresentaram coeficientes de variação (CV) entre 2,93 % e 3,82 % (Figuras 3 e 4). O desvio padrão para as repetições de cada amostra foi menor do que 0,03. O cálculo do conteúdo de DNA em pg e em Mpb pode ser efetuado para cada espécie. *Trigona hyalinata* apresentou  $2C = 1,07$  pg, correspondendo a  $1C = 523$  Mpb. Já a *Partamona rustica*, apresentou  $2C = 1,15$  pg, correspondendo a  $1C = 562$  Mpb.

A metodologia de citometria de fluxo para determinação da composição AT gerou histogramas homogêneos e reprodutíveis, com CV variando de 2,49 % a 3,69 % (Figuras 3 e 4). O desvio padrão para as repetições de cada indivíduo foi menor do que 8,0. A composição de bases AT e GC calculada para a *Scaptotrigona xantotricha* foi de 61,32 % e 38,68 %, respectivamente. Para a *Trigona hyalinata* os valores obtidos foram AT = 62,40 % e GC = 37,60 %. *Partamona rustica* apresentou AT = 62,82 % e GC = 37,18 %.



**Figura 3** - Histogramas obtidos a partir da análise da suspensão nuclear de células do gânglio cerebral. a) Núcleos corados com iodeto de propídeo (PI). *S. xantotricha* fêmea (padrão interno, 2C = 0,88 pg de DNA, canal 200, CV = 2,93) e *T. hyalinata* fêmea (2C = 1,07 pg de DNA, canal 244, CV = 3,05). b) Núcleos corados com DAPI. *S. xantotricha* fêmea (padrão interno, AT = 61,32 % canal 200, CV = 3,85) e *T. hyalinata* fêmea (AT = 62,40 % , canal 257, CV = 2,49).



**Figura 4** - Histogramas obtidos na análise da suspensão nuclear de células do gânglio cerebral. c) Núcleos corados com iodeto de propídeo (PI). *S. xantotricha* fêmea (padrão interno, 2C = 0,88 pg de DNA, canal 200, CV = 3,82) e *P. rustica* (2C = 1,15 pg de DNA, canal 262, CV = 3,27). d) Núcleos corados com DAPI. *S. xantotricha* fêmea (padrão interno, AT = 61,32 % , canal 200, CV = 3,69) e *P. rustica* fêmea (AT = 62,82 % , canal 282, CV = 3,33).

## 6. DISCUSSÃO

A determinação de uma espécie de abelha como padrão interno para cálculos da composição AT e GC por meio da citometria de fluxo neste grupo possibilita a obtenção de resultados mais confiáveis comparados àqueles obtidos utilizando uma espécie mais distante filogeneticamente. Além disso, *Scaptotrigona xantotricha* já vem sendo utilizada como padrão interno para quantificação do genoma total em abelhas (Lopes et al., 2009), e, portanto, é conveniente tê-la como padrão na determinação do conteúdo de bases nesses indivíduos. Segundo dados do Genome Size Database (2012), a maioria dos autores utilizou como padrão interno, na quantificação do DNA de invertebrados, núcleos de *Gallus domesticus* (GD) ou *Drosophila melanogaster* (DM). De um total de 1741 invertebrados que tiveram seu conteúdo de DNA determinado, 22,52 % utilizaram GD e 16,83 % utilizaram DM, sendo que os 61 % restantes foram determinados com cerca de 39 padrões diferentes ou nem mesmo tiveram o padrão utilizado especificado (Gregory, 2012). Segundo Mendonça et al. (2010), a utilização de células GD como padrão interno deve ser cautelosa já que macho e fêmea tem sido utilizados indiscriminadamente. Esses autores determinaram que o macho apresenta 0,09 pg de DNA a mais do que a fêmea.

A utilização do gânglio cerebral como material biológico para obtenção dos núcleos implica em uma vantagem quando comparado a outros estudos de quantificação do DNA em invertebrados em que foi usado o corpo todo do indivíduo ou tecido espermático (Gregory, 2012). Segundo Gregory (2005), um desafio da citometria de fluxo consiste na obtenção de um material fresco, cujos núcleos sejam de ploidia conhecida e estável. A extração dos núcleos deve garantir que estes estejam homogêneos e preservados, o que é resultado de um

protocolo otimizado para tal fim. Em vertebrados, significa usualmente trabalhar com sangue, mas em invertebrados ainda não há um consenso sobre qual material é o mais adequado. Nesse trabalho optou-se pela utilização do gânglio cerebral de pupas. Esse material apresenta ploidia estável, não havendo a presença de células poliplóides que poderiam interferir nesse tipo de análise.

A metodologia de citometria de fluxo empregada na determinação do conteúdo de DNA em abelhas mostrou-se uma ferramenta apropriada para uma análise relativamente rápida e de reprodutibilidade. Os baixos coeficientes de variação obtidos, todos abaixo de 5,0 %, estão de acordo com o padrão internacional exigido pela European Society for Analytical Cellular Pathology (ESACP) para esse tipo de análise. Em comparação a outros métodos, como o sequenciamento genômico, essa técnica gera resultados mais acurados (Bennett, 2003). Segundo esse autor, o resultado obtido por sequenciamento apresenta erros causados pela subestimação do número de pares de bases, já que dificilmente todas as sequências de um genoma estarão representadas.

A citometria de fluxo para determinação da composição de bases em abelhas, podendo ser aplicada em outros insetos ou até mesmo em outros invertebrados, representa um avanço para a caracterização do genoma. Essa ferramenta já vem sendo empregada em diversos trabalhos envolvendo plantas e vertebrados. Para invertebrados, no entanto, nenhuma metodologia de citometria de fluxo havia sido disponibilizada (Gregory, 2012).

Os valores 2C quantificados para as espécies *T. hyalinata* e *P. rustica*, 1,07 pg e 1,15 pg, respectivamente, estão em acordância com os descritos para outras espécies de abelhas. Segundo Tavares et al. (2011), o maior valor relatado é de 1,96 pg de DNA para *Melipona flavolineata* e o menor valor é de 0,52 pg de DNA para *Paratrigona subnuda*. A quantidade de DNA determinada para *Trigona* nesse

trabalho está compreendida entre os valores 2C descritos para outras três espécies desse mesmo gênero. O mesmo acontece para *Partamona*, cujo valor 2C também está compreendido entre os valores de outras três espécies.

A composição de bases AT e GC encontrada para as espécies analisadas nesse trabalho está em acordância com o padrão relatado para abelhas por Latorff e Moritz (2008). Os referidos autores relataram que esses insetos apresentam grande quantidade de bases AT, acima de 60 %, e relacionou esse fato com maior taxa de recombinação. Segundo Gregory (2005), existe uma correlação positiva entre conteúdo GC e tamanho genômico, apesar da quantidade de bases GC não ultrapassar 46 % do genoma.

## 7. CONCLUSÃO

As metodologias de quantificação de DNA e determinação de composição de bases AT e GC em abelhas por meio da citometria de fluxo apresentaram reprodutibilidade, com adequada distinção dos picos  $G_0/G_1$  do padrão e da amostra.

O presente trabalho disponibiliza uma metodologia para determinação da composição de bases AT e GC por meio da citometria de fluxo em abelhas, podendo ser aplicado em outras espécies de abelhas ou mesmo para outros insetos himenópteros.

A aplicação dessa metodologia em abelhas representa um avanço na caracterização do genoma do grupo, fornecendo dados relevantes para estudos posteriores.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bawa, K.S. Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. *An. Rev. Ecol. Syst.*, 21:399-422, 1990.

Bennett, M.D., Leitch, I.J., Price, H.J., Johnston, J.S. Comparisons with *Caenorhabditis* (approximately 100Mb) and *Drosophila* (approximately 175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be approximately 157 Mb and thus approximately 25% larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of approximately 125 Mb. *Annals of Botany*, 91(5): 547-57, 2003.

Bennett, M.D., Leitch, I.J. Plant DNA C-values Database [online] <http://data.kew.org/cvalues/> (Acessado em 10 de janeiro de 2012), 2012.

Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M. Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hym., Apidae): a mini review. *Apidologie*, 23:1-32, 1992.

Dolezel, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomics. *J. Appl. Genet.*, 38(3): 285-302, 1997.

Dolezel, J., Bartos, J., Voglmayr, H., Greilhuber, J. Nuclear DNA content and genome size of trouts and human. *Cytom.*, 51A: 127-128. 2003.

Dolezel, J.; Bartos, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann. Bot.*, 95: 99-110. 2005.

Galbraith, D.W., Harkins, K.R., Maddox, J.M., Ayres, J.M., Sharma, D.P., Firoozabady, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissue. *Sci.*, 220: 1049-1051. 1983.

Godelle, B.; Cartier, D.; Marie, D.; Brown, S.C.; Siljak-Yakovlev, S. Heterochromatin study demonstrating the non-linearity of fluorometry useful for calculating genomic base composition. *Cytometry*, 14: 618-626, 1993.

Gregory, T.R. Genome size evolution in animals. *The evolution of the genome*. Elsevier Inc. 2005

Gregory T.R. Animal Genome Size Database [online] <http://www.genomesize.com> (acessado em 10 de janeiro de 2012), 2012.

Kawara, S. Takata, M., Takeara, K. High frequency of DNA aneuploidy detected by DNA flow cytometry in Brown's disease. *J. Derm. Science*, 21: 23-26. 1999.

Kerr, W.E., Carvalho, G.A., Nascimento, V.A. Abelha Uruçu. *Biologia, Manejo e Conservação. Coleção Manejo da vida Silvestre. nº. 2.* Belo Horizonte, Acangaú, 1996.

La Salle, J., Gauld, I.D. Hymenoptera: Their diversity and their impact on the diversity of other organisms. In: LaSalle, j., Gauld, I.D. (Eds.) *Hymenoptera and Biodiversity.* Wallingford, UK. 348p., 1993.

Lattorff, H.M.G. e Moritz, R.F.A. Recombination rate and AT-content show opposite correlations in mammalian and other animal genomes. *Evol. Biol.* 35:146–149, 2008.

Lopes D.M., Carvalho C.R., Clarindo W.R., Praça M.M., Tavares M.G. Genome size estimation of three stingless bee species (Hymenoptera, Meliponinae) by flow cytometry, *Apidol.* 40,517–523. 2009.

Loureiro, J. e Santos, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. *Boletim de Biotecnologia*, 77: 18-29, 2004.

Loureiro J., Rodriguez E., Doležel J., Santos C. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry, *Ann. Bot.* 98, 679–689, 2006a.

Loureiro J., Rodriguez E., Doležel J., Santos C. Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content, *Ann. Bot.* 98, 515–527, 2006b.

Marie, D., Brown, S.C. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell*, 78: 41-51, 1993.

Mendonça, MAC, Carvalho, CR, Clarindo, WR. DNA content differences between male and female chicken (*Gallus gallus domesticus*) nuclei and Z and W chromosomes resolved by image cytometry. *J Histochem Cytochem*, 58(3): 229–235, 2010.

Michener, C.D. The bees of the world. The John Hopkins University Press, Baltimore, 913p., 2000.

Neff, J.L., Simpson, B.B. Bees, pollination system and plant diversity. In: J. LaSalle and I.D. Gauld (eds.). Hymenoptera and Biodiversity. C.A.B. International, Wallingford, UK. 143-167, 1993.

Ochatt, S.J. Flow Cytometry in Plant Breeding. Cytometry Part A 73A: 581-598, 2008.

Price, H.J.; Hodnett, G.; Jhonston, S. Sunflower (*Helianthus annuus*) leaves contain compounds that reduce nuclear propidium iodide fluorescence. Annals of Botany, 86: 929-934, 2000.

Rabinovitch, P.S. DNA content histogram and cell cycle analysis. In Darzynkiewicz, Z., Robinson, J. P., Crissman, H. A. (Eds.) Methods in cell biology: flow cytometry, 41: 263-293, 1994.

Tavares M.G., Carvalho C.R., Soares F.A.F. Genome size variation in *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae) and sub-grouping by their DNA content, Apidologie 41, 636–642, 2010a.

Tavares M.G., Carvalho C.R., Soares F.A.F., Fernandes A. Detection of diploid males in a natural colony of the cleptobiotic bee *Lestrimelitta* sp (Hymenoptera, Apidae), Gen. Mol. Biol. 33, 491-493, 2010b.

Tavares M.G., Carvalho C.R., Soares F.A.F., Campos L.A.O. Genome size diversity in stingless bees (Hymenoptera: Apidae, Meliponini), Apidologie (no prelo), 2011.

The honeybee Genome Sequencing Consortium: Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*, Nature 443, 931-949, 2006.

Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. J. Immun. Met., 243: 167-190. 2000.

Warren, A., Crampton, J.M. The *Aedes aegypti* genome: complexity and organization. Genetical Research, 58: 225-232, 1991.

Zoldo, V.; Pape, D.; Brown, S.C.; Panaud, O.; Iljak-Yakovlev, S. Genome size and base composition of seven *Quercus* species: inter and intra-population variation. *Genome*, 41: 162-168. 1998.