

## METAGENOMA DO PÓLEN DE ABELHAS SEM FERRÃO AMAZÔNICAS

Rebeca Oliveira França de MELO<sup>1</sup>; Gislene Almeida CARVALHO ZILSE<sup>2</sup>; Diana Vieira BRITO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; <sup>2</sup>Orientadora CBIO/INPA; <sup>3</sup>Colaborador CBIO/INPA

### 1.Introdução

O pólen apícola é uma das principais fontes de alimentação de uma colméia de abelhas sem ferrão amazônicas e é constituído por pólen floral, néctar e substâncias salivares da abelha (Brasil, 2001). Depois de coletado e armazenado em potes de cerume no interior da colméia(Nogueira-Neto, 1997), as abelhas regugitam substâncias salivares para que este fermente e seja consumido por elas (Kerr *et al.*, 1996). Esta fermentação pode ser causada pela ação de leveduras (Carvalho *et al.*, 2005) e microorganismos(Bellini, 2006), pois além de fermentação alcoólica também há indícios de fermentação acética(Rebelo, 2011). Assim, para a determinação de uma possível diversidade microbiana no pólen, foi feito um estudo do metagenoma deste. Para isso, uma das técnicas utilizadas foi a amplificação de uma região do gene 16S do rDNA do DNA total de bactéria encontrado no pólen seguida de digestão enzimática a fim de identificar polimorfismos entre as amostras.

### 2.Materiais e Métodos

Foram coletados três amostras de duas espécies de abelhas sem ferrão da amazônia (*Melipona seminigra* e *M. interrupta*) provenientes do Meliponário do Grupo de Pesquisas em Abelhas (GPA) no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) . A extração do DNA total de bactéria do pólen foi baseado no método de Lise Alcalina de Sambrook (Sambrook, 2001), com modificações, e aferido sua concentração com o auxílio do Nanodrop 2000. Em seguida a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada utilizando os primers 530F e 1492R (descritos por Borneman e Triplett, 1997) para a amplificação do gene 16S do rDNA. Aplicou-se a técnica de eletroforese em gel de agarose 1% corado com gelRed para análise dos produtos PCR. Em seguida, os produtos foram submetidos à digestão molecular pelas enzimas PmlI e Sau3AI nas seguintes condições reacionais: NE Buffer I a 1X, BSA a 0,1mg/mL, água milli-Q, DNA a 1mg/mL, 5U de cada enzima. A digestão ocorreu a 37°C para ambas as enzimas. O tempo de reação foi de cinco horas para PmlI e de duas horas para Sau3AI.

### 3.Resultados e Discussão

#### 1..1 Extração do DNA de bactéria:

As quantidades ótimas de pólen para extração do DNA de bactéria estão apresentadas na tabela 1.

**Tabela 1: Quantidade ótima de pólen utilizado para extração de DNA de cada amostra.**

Amostra	Quantidade (g)
<i>Melipona interrupta</i> – amostra 1 (Mi1)	0,316
<i>Melipona interrupta</i> – amostra 2 (Mi2)	0,311
<i>Melipona seminigra</i> – amostra 1 (Ms1)	0,315
<i>Melipona seminigra</i> – amostra 2 (Ms2)	0,301

#### 3.2 Quantificação do DNA extraído:

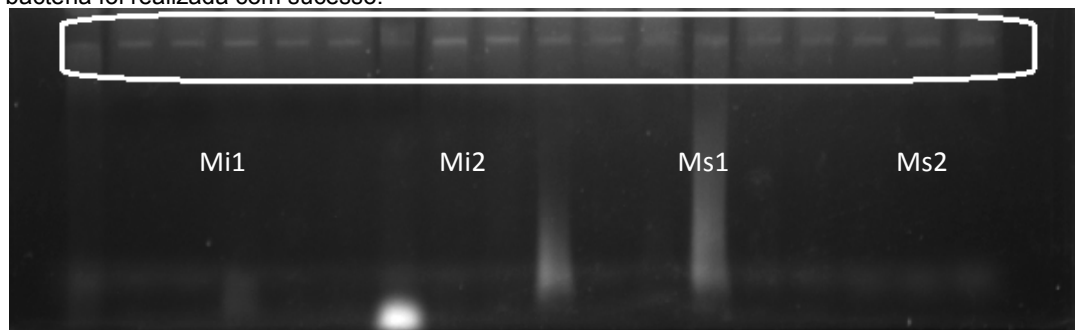
Por leitura em Nanodrop 2000, a concentração média de DNA extraído por amostra de pólen foi de 288,84 ng/µL (Tabela 2).

**Tabela 2: Concentração de DNA extraído em cada amostra de pólen de *Melipona interrupta* (Mi) e *M. seminigra* (Ms).**

Amostra	Concentração (ng/µL)
Mi1	319,7
Mi2	223,4
Ms1	154,3
Ms2	295,5

#### 1..3 Integridade do DNA extraído:

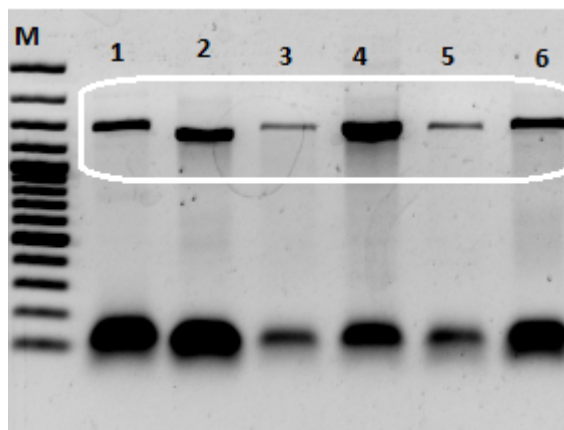
O DNA extraído estava íntegro como pode ser visualizado na Figura 1, indicando, assim, que a extração do DNA de bactéria foi realizada com sucesso.



**Figura 1** - Integridade do DNA extraído das amostras de pólen de abelhas sem ferrão amazônicas em gel de agarose 1% corado com gelRed. **Ms1** e **Ms2** – amostras 1 e 2 de *Melipona seminigra*; **Mi1** e **Mi2** – amostras 1 e 2 de *M. interrupta*.

#### 1.4 PCR:

A amplificação de parte da região 16S do rDNA, por PCR, produziu um fragmento de aproximadamente 1200 pb (Figura 2).

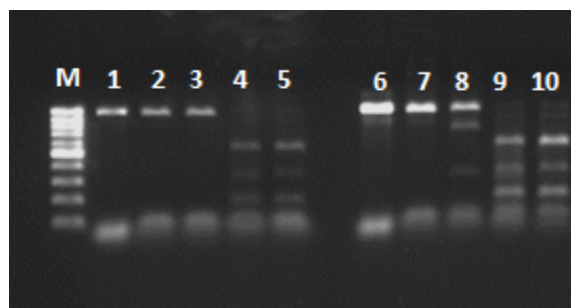


**Figura 2** – Produto de PCR da região 16S do rDNA em amostras de pólen de *Melipona interrupta* (Mi) e de *M. seminigra* (Ms). **M**: Marcador 100pb (Ladder, Invitrogen). **1** e **2**: amostra Ms1; **3** e **4**: amostra Ms2; **5** e **6**: amostra Mi1.

#### 3.5 Digestão do DNA:

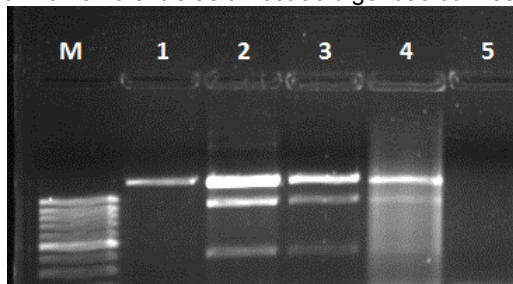
A análise de polimorfismos entre as amostras de pólen das espécies de abelhas, foi realizada por digestão enzimática dos produtos de PCR da região 16S do rDNA com as enzimas Sal3AI (enzima de corte frequente) e PmlI (corte em região específica da região 16S).

Das quatro amostras digeridas com a enzima Sal3AI, apenas duas funcionaram e das que funcionaram a enzima cortou o DNA em dois lugares formando três fragmentos. No entanto, não se observou polimorfismos (Figura 3).



**Figura 3** – Perfil eletroforetico em gel de agarose a 1% corado com gelRed da digestão enzimática dos produtos PCR da região 16S do rDNA amplificados a partir do pólen de abelhas *Melipona interrupta* (Mi) e *M.*

*seminigra* (Ms). **M**: Marcador; **1 e 6**: amostras sem restrição (Ms1 e Ms2, respectivamente); **2, 3 e 7, 8**: amostras Ms1 e Ms2, digeridas com PmlI; **4, 5 e 9,10**: amostras Ms1 e Ms2 digeridas com a enzima Sal3AI. Com a enzima PmlI, o DNA digerido apresentou dois fragmentos, mas não foi digerido completamente. Da mesma forma, não foi observado polimorfismo entre as amostras digeridas com esta enzima (Figura 4).



**Figura 4** - Perfil eletroforetico em gel de agarose a 1% corado com gelRed da digestão enzimática da região 16S do rDNA do DNA amplificado a partir do pólen de abelhas *Melipona interrupta* e *M. seminigra* com enzima PmlI. **M**: Marcador; **1**: amostra sem restrição; **2, 3, 4 e 5**: amostras Mi1, Mi2, Ms1 e Ms2, respectivamente

### 5. Conclusão

A extração e a amplificação da região do 16S do rDNA indicou a presença de microrganismos mostrando a possibilidade da diversidade microbiana contida no pólen que pode ser responsável pelas fermentações. Não foi detectado polimorfismos intra e interespecífico entre as sequências de DNA das amostras analisadas. Estudos mais aprofundados sobre esta questão serão realizados posteriormente usando-se a técnica de sequenciamento do DNA a fim de permitir a identificação de possíveis espécies de bactérias contidas no pólen potencialmente responsáveis pela fermentação alcoólica e acética deste.

### 5. Referencias Bibliográficas

- Bellini, M. Z. 2006. *Caracterização bioquímica dos vinagres brasileiros*. Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 82 p.
- Brasil. Instrução Normativa n. 3, de 19 de janeiro de 2001. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 23 jan. 2001, Seção 1, p. 18.
- Borneman, J.; Triplett, E. W. 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2647–2653.
- Carvalho, M.; Rocha, A.; Estevinho, L.; Choupina, A. 2005. Identification of honey yeast species based on RFLP analysis of the ITS region. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 1: 11-17.
- Nogueira-Neto, P. 1997. *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. São Paulo: Editora Tecnapis. 445 p.
- Rebelo, K.S. 2011. *Caracterização química, físico-química e espectroscópica do pólen coletado por abelhas sem ferrão amazônicas*. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, UFAM – AM. 111p.
- Sambrook, J.; Russel, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 2001.