

IDENTIFICAÇÃO DE GENE ENVOLVIDO NA DETERMINAÇÃO DO SEXO EM *Melipona interrupta* E *M. seminigra*

Filipe de Souza MENDES¹
Diana Vieira BRITO²
Gislene Almeida Carvalho ZILSE³

¹Bolsista IC INPA - PAIC/FAPEAM; ² Colaboradora doutoranda/INPA;
³Orientadora CBIO/INPA

INTRODUÇÃO

Nas abelhas a determinação de sexo se dá por partenogênese arrenótoca, ou seja, machos originam-se de ovos não fecundados (“n” cromossomos) e fêmeas de ovos fecundados (“2n” cromossomos). No entanto, o processo de fertilização em si não determina o sexo nas abelhas, pois já foi observada a existência de machos diploides em *Apis mellifera* (van Wilgenburg *et al.* 2006). O sistema de determinação de sexo proposto para *A. mellifera* é composto por três elementos principais (Schütt e Nöthiger 2000). O gene *complementary sex determiner* ou *csd* é responsável pelo sinal primário este induz a expressão diferencial do sinal secundário, o gene *feminizer* ou *fem*, cuja função é manter o estado sexual determinado pelo *csd*, o *fem* por sua vez transmite esse sinal para o terceiro gene da via o *double sex dsx*. Esse gene, por fim, codifica um fator de transcrição que regula a expressão dos genes que irão, de fato, conferir o dimorfismo sexual (Lodish *et al.* 2004; Nunes-silva 2008). Em *A. mellifera* é possível encontrar 4 isoformas do gene *dsx*, sendo duas isoformas de fêmeas (Dsx^{F1} e Dsx^{F2}), uma de macho (Dsx^M) e uma quarta isoforma em ambos os sexos (Dsx^B) (Cho *et al.* 2007). As proteínas Dsx^F e Dsx^M são fatores de transcrição que ativam/reprimem os genes que conferem os fenótipos sexo-específicos (An *et al.* 1996).

O estudo molecular do sexo em *A. mellifera* poderá subsidiar programas de manutenção da variabilidade genética, reprodução assistida, melhoramento genético, etc. Assim, a possibilidade de estudar, em nível molecular, o sistema genético de determinação do sexo em outras abelhas, como *Melipona seminigra* e *M. interrupta*, que são abelhas nativas da região Amazônica traz promissoras questões acerca da reprodução em cativeiro ou em populações naturais a fim de explorá-las economicamente e também auxiliar estratégias de conservação destes polinizadores. Até o momento, nenhuma investigação acerca do gene *dsx* está registrada na literatura. Portanto, este trabalho objetivou verificar a presença do gene em ambas as espécies bem como caracterizá-lo molecularmente.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletas: As amostras de *Melipona interrupta* e *M. seminigra* foram coletadas diretamente de colmeias mantidas no Meliponário do Grupo de Pesquisas em Abelhas (GPA) no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), e armazenadas em freezer a -80 °C. Foram coletadas larvas, pupas de olho branco e abelhas adultas recém emergidas de ambas as espécies. Nestas duas últimas fases foi possível identificar os sexos (machos e fêmeas) e castas (operárias e rainhas) dos indivíduos.

Extração de RNA: O RNA total de cada indivíduo foi extraído com o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega), seguindo as orientações do fabricante.

Síntese da primeira fita de cDNA: As fitas de DNA complementar (cDNA) foram sintetizadas utilizando-se o RNA total extraído como molde. O kit utilizado foi o Improm-II™ Reverse Transcription System (Promega) seguindo o protocolo do fabricante.

Iniciadores utilizados na reação: Para amplificação dos transcritos do gene *dsx*, foram utilizados os iniciadores Mdsx_fw1 ATGTACCGCAAGAGG GCGAGCA, Mdsx_Rev1 CTACGTAGAATGTTCTGGAGGAC, Mdsx_Rev2f GAATTTTCGTTCGCTGGCGTCAACC. O iniciador Mdsx_fw1 foi usado para indivíduos machos e fêmeas, o Mdsx_Rev1 foi usado em machos e o Mdsx_Rev2f foi usado para fêmeas.

Amplificação do gene *dsx*: As amostras de cDNA foram usadas como molde na amplificação do gene *dsx* por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Os reagentes e volumes utilizados foram Master mix 12,5 µL, MgCl₂(50 Mm), 1,0 µL, iniciadores F e R (5 picomoles/µL) 1,0 µL cada, BSA 1,5 µL, amostra (cDNA) 2,0 µL e água 6,0 µL para um volume final de reação de 25,0 µL. A reação de amplificação foi feita com o auxílio de um termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed™ 6,6X (Biotium), e visualizados em fotodocumentador LPIX (Loccus Biotecnologia).

Condições de ciclagem: Desnaturação inicial 94°C por 2 minutos e 30 segundos (1x). Desnaturação 94°C por 30 seg, anelamento 60°C por 30 seg, extensão 72°C por 40 seg passos repetidos 35 vezes. Extensão final 72°C por 10 minutos e hold 4°C.

Purificação dos produtos de PCR: As bandas dos produtos de PCR foram excisadas e purificadas com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), seguindo-se as orientações do fabricante. Os produtos de PCRs purificados foram quantificados em Nanodrop para serem utilizados no processo de sequenciamento nucleotídeo, pelo método de Sanger.

Análise das sequências: As sequências obtidas do sequenciamento foram editadas e alinhadas usando a ferramenta ClustalW, disponível no programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.5.3. Uma sequência única (consenso) foi montada com o programa Bioedit, a qual foi comparada com o banco de dados do NCBI, por meio do programa Blastn, a fim de se verificar o grau de identidade destas com sequências de genes ortólogos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amplificação do gene *dsx* *Melipona interrupta*

Após a reação de PCR para a espécie de *M. interrupta*, conseguiu-se a amplificação do gene *dsx* em indivíduos machos de todas as fases testadas, pupas de olho branco, pupas de olho rosa e adultos recém emergidos inclusive em uma larva L1, fase na qual não é possível determinar o sexo. Para esta larva L1 o gene *fem* já havia sido amplificado e constatou-se que se tratava de macho. O tamanho dos fragmentos amplificados foram de aproximadamente 1000 pb. Nas fêmeas da espécie só foram visualizadas amplificações em operarias recém emergidas, cujo produto da PCR foi de aproximadamente 800 pb.

As sequências parciais do gene *dsx*, obtidas neste trabalho, para machos e operarias se mostraram idênticas diferentemente do que ocorre em *Apis mellifera* (Cho *et al.* 2007). No entanto, é provável que a diferença do *splicing* ocorra em outra parte da sequência não amplificada para abelhas *Melipona*.

Como não houve diferença entre a sequência amplificada de machos e operarias, montou-se uma sequência consenso para a espécie. A sequência consenso teve 77% de similaridade com a sequência do *dsx* de *A. mellifera* e 76% de similaridade com a sequência de *Drosophila melanogaster*, confirmando a presença do gene *dsx* na espécie. Também foi feito o Blastx da sequência obtida com as proteínas encontradas em *A. mellifera*, e foi possível identificar a presença de dois domínios conservados a região DM e DSX_dimer (Figura 1). Presume-se que a região DM se liga a molécula de zinco e se liga às regiões palíndromos do DNA. O domínio DSX_dimer funciona como fator de transcrição regulando o dimorfismo sexual, ambos domínios são encontrados nos splicings alternativos de machos e fêmeas de *A. mellifera* (Cho *et al.* 2007).

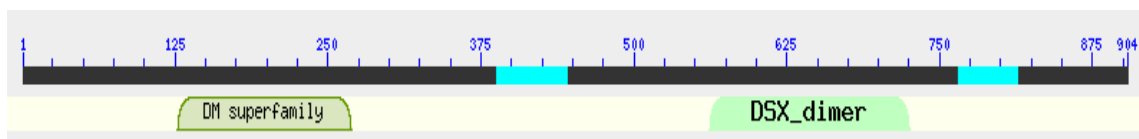


Figura 1. Domínios conservados para a sequência consenso do gene *dsx* em *Melipona interrupta*.

Melipona seminigra

Em todas as fases dos indivíduos testados tivemos amplificações, exceto na rainha adulta recém emergida. Como a região amplificada em machos e fêmeas foi idêntica, não foi possível comprovar a existência de *splicing* alternativo. Por isso foi montada uma sequência consenso para a espécie e a ferramenta Blastn revelou 76% de similaridade com o gene *dsx* de *Apis mellifera*, confirmando a presença do gene *dsx* também em *M. seminigra*. A análise por Blastx permitiu observar que a sequência predita de aminoácidos para *M. seminigra* tem 76% de similaridade com os aminoácidos do mesmo gene para *A. mellifera* (Figura 2). Ainda, que a sequência tinha os mesmos domínios conservados, inclusive nas mesmas posições, encontrados para *A. mellifera*: o domínio DM e DSX_dimer.

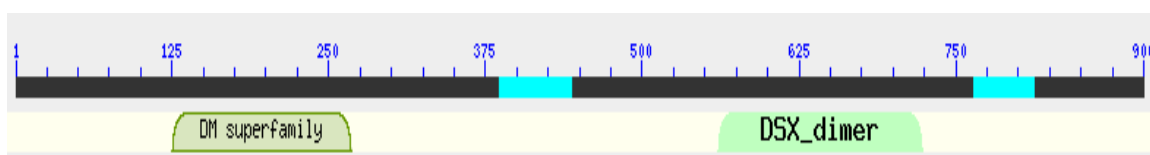


Figura 2. Domínios conservados encontrados na sequência consenso do gene *dsx* para *Melipona seminigra*.

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho sugerem forte indício de que o gene *dsx* está presente nas abelhas sem ferrão *Melipona interrupta* e *M. seminigra*. Em ambas as espécies, ele apresenta os mesmos domínios conservados de *Apis mellifera*.

REFERÊNCIAS

An, W.; Cho, S.; Ishii, H.; Wensink, P.C. 1996. Sex-specific and non-sex-specific oligomerization domains in both of the *doublesex* transcriptional factors from *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, 16: 3106-3111.

Cho, S.; Huang, Z.Y.; Zhang, J. 2007. Sex-Specific Splicing of the Honeybee *doublesex* Gene Reveals 300 Million Years of Evolution at the Bottom of the Insect Sex Determination Pathway. *Genetics Society of America*, 177: 1733-1741.

Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, L. S.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. 2005. *Molecular Cell Biology*. Fifth edition. W. H. Freeman and Company, New York, NY, USA. 973 pp.

Nunes-Silva, C.G. 2008. *Mecanismo molecular da determinação de sexo e casta em Melipona compressipes (Hymenoptera: Apidae)*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Manaus, AM, Brasil. 59 pp.

Schütt, C.; Nöthiger, R. 2000. Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects. *Development*, 127: 667-677.

van Wilgenburg, E.; Driessen, G.; Beukeboom, L.W. 2006. Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an "unintelligent" design? *Frontiers in Zoology*, 3: 1-15.