

DENILCE MENESES LOPES

**ANÁLISES MOLECULARES EM *Melipona rufiventris* E
Melipona mondury (HYMENOPTERA: APIDAE)**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Estrutural, para a obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008**

DENILCE MENESES LOPES

**ANÁLISES MOLECULARES EM *Melipona rufiventris* E
Melipona mondury (HYMENOPTERA: APIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada: 28 de julho de 2008

Prof. Dr. Lúcio Antônio de Oliveira Campos
(Co-Orientador)

Prof^a. Dr^a. Tânia Maria Fernandes Salomão
(Co-Orientadora)

Prof. Dr. Luiz Antônio dos Santos Dias

Prof^a. Dr^a Ana Maria Waldschmidt

Prof^a. Dr^a Mara Garcia Tavares
(Orientadora)

“Tudo passa só Deus permanece”

(Santa Tereza de Ávila)

**Aos meus pais que sempre me
ensinaram o que realmente é importante
na vida.**

Agradecimentos

“Não dá mais para voltar, o barco está em alto mar e o vento forte que me leva pra frente é o amor de Deus”. Obrigada Senhor porque eu *sou mais forte e vou mais longe quando aqui estás”.*

À minha família... *“Se eu tentasse definir o qual especial vocês são para mim, palavras não teriam fim. Então direi apenas obrigada, sei que vocês entenderão...”*

À professora Mara pela contribuição na minha formação e por toda ajuda durante esses anos.

Ao professor Lúcio pelas sugestões e conselhos, pela amizade e por tantas vezes ser um incentivo para mim.

À professora Tânia pelo auxílio na execução desse trabalho e pelas palavras de incentivo.

À professora Ana Maria Waldschmidt pelas sugestões e pela agradável convivência no período esteve no laboratório.

Ao professor Luís Antônio pelas contribuições em trabalhos já realizados e por ter aceitado participar da banca examinadora.

Ao professor Carlos Roberto pelo auxílio nas análises de Citometria de Fluxo.

À professora Sílvia Pompolo pela contribuição na realização do trabalho de citogenética.

À Universidade Federal de Viçosa e ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular pela oportunidade de realização desse trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao PROBIO/BIRD/GEF/MMA/CNPq pelo apoio financeiro.

Aos colegas de Laboratório, em especial ao Filipe e Henrique pela ajuda com as análises.

Aos “Cirineus” que sempre me ajudaram: Heneida, Soraya, Juscelino, Dé, Flaviane, Jaqueline, Délio, Denis, Irmã Lu, Maurinho, Natália, Andressa, Ernandes, Adriana, Fonte de Vida, Cenáculo e tantos outros que são para mim concretamente um sinal do amor de Deus.

Desde já muitas saudades, afinal de contas “*só se tem saudade do que é bom*”.

Taís e Doraliza, “*bons amigos que nasceram pela fé*”, obrigada por tudo.

A Dona Dora por ter dado tanto pão e café a quem tem fome e ter me acolhido como a uma filha.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

E como diz um versículo na Bíblia:

“Ouro e Prata eu não tenho mas o que eu tenho eu lhes dou...”

O Senhor os abençoe e os guarde, que Ele lhes mostre a sua face e lhes seja favorável. O Senhor volte para vocês o Seu rosto e lhes dê a paz.”

Deus lhes pague!

Sumário

Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Introdução.....	01
1. Abelhas sem ferrão.....	01
2. Análises moleculares.....	04
3. Análise do conteúdo de DNA em insetos.....	09
Referências Bibliográficas.....	13
Capítulo 1: Caracterização de locos microssatélites para a abelha sem ferrão <i>Melipona rufiventris</i> (Hymenoptera: Apidae)	21
Capítulo 2: Nota científica sobre a caracterização de locos microssatélites para <i>Melipona mondury</i> (Hymenoptera: Apidae).....	28
Capítulo 3: Estudo comparativo do uso de <i>primers</i> microssatélites específicos e heterólogos em <i>M. rufiventris</i> e <i>M. mondury</i> (Hymenoptera: Meliponini).....	35
Resumo.....	36
Introdução.....	37
Material e Métodos.....	38
Resultados e Discussão.....	39
Referências.....	42
Tabelas e Figuras.....	46
Capítulo 4: Diferenciação genética de espécies de <i>Melipona</i> do grupo <i>rufiventris</i> por análise de DNA mitocondrial.....	49
Resumo.....	50
Introdução.....	51
Material e Métodos.....	52
Resultados.....	54
Discussão.....	55
Referências.....	58

Tabelas e Figuras.....	61
Capítulo 5:	65
Estimativa do tamanho do genoma de três abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Meliponini).....	
Resumo.....	66
Introdução.....	67
Material e Método.....	68
Resultados	69
Discussão.....	70
Referências.....	74
Tabelas e Figuras.....	82
Conclusões gerais.....	85

Resumo

LOPES, Denilce Meneses, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho, de 2008.

Análises moleculares em *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae). Orientadora: Mara Garcia Tavares. Co-Orientadores: Lúcio Antônio de Oliveira Campos e Tânia Maria Fernandes Salomão.

Melipona mondury e *M. rufiventris* são duas espécies de abelhas indígenas sem ferrão morfologicamente bastante semelhantes. Estudos realizados com essas espécies utilizando diferentes tipos de marcadores moleculares mostraram baixa variabilidade genética. Além disso, populações de algumas regiões possuem características que sugerem que mais de uma espécie está recebendo o mesmo nome científico. Neste trabalho procurou-se otimizar ferramentas que pudessem ser utilizadas em estudos populacionais e evolutivos das duas espécies supracitadas, bem como de outras espécies de abelhas. Para isto, foram (1) desenhados *primers* microssatélites para *Melipona mondury* e *M. rufiventris* os quais foram também avaliados em outras espécies de meliponíneos, (2) foram comparados os níveis de polimorfismo encontrado utilizando *primers* específicos e *primers* heterólogos, (3) o gene do citocromo B foi parcialmente amplificado e a seqüência do mesmo foi comparada em populações das duas espécies e (4) padronizado um protocolo de citometria de fluxo, para determinação do conteúdo de DNA de abelhas e aplicação do mesmo em *M. rufiventris*, *M. mondury* e *Scaptotrigona xantotricha*. Utilizando-se a técnica de ISSR foram desenhados 10 *primers* microssatélites para *M. rufiventris* e 11 para *M. mondury* e a diversidade genética nessas espécies foi estimada utilizando esses *primers* e os valores encontrados foram $H = 0,47$ e $H = 0,38$, respectivamente. Estes valores são superiores àqueles observados em ampliações nas quais se utilizaram *primers* desenhados para *M. bicolor* ($H = 0,16$ e $H = 0,18$ para *M. mondury* e *M. rufiventris*, respectivamente). Na análise de seqüências do citocromo B encontraram-se onze haplótipos que permitiram a separação de dois grupos distintos, evidenciando a existência de mais de uma espécie nas localidades estudadas. Por fim, a metodologia padronizada para determinação do conteúdo de DNA de abelhas forneceu histogramas, com valores de coeficiente de variação

de 2,87 a 4,14%, o que demonstra a utilidade da mesma em estudos envolvendo abelhas. Os valores de conteúdo de DNA 1C encontrados para fêmeas de *M. rufiventris*, *M. mondury* e *S. xantotricha* foram $C = 0.93$ pg, $C = 0,95$ pg e $C = 0,44$ pg, respectivamente, o que demonstra que o tamanho do genoma das duas espécies de *Melipona* foi cerca de duas vezes maior que o de *S. xantotricha*. Esta variação pode refletir diferenças na estrutura genômica das espécies analisadas. Entretanto, estudos adicionais deverão ser realizados no sentido de estudar o genoma de outras espécies de *Melipona*, bem como de outros gêneros de abelhas sem ferrão, a fim de verificar os processos envolvidos na expansão e/ou contração de seus genomas.

ABSTRACT

LOPES, Denilce Meneses, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2008.

Molecular analysis in *Melipona rufiventris* and *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae). Adviser: Mara Garcia Tavares. Co-Advisers: Lúcio Antônio de Oliveira Campos and Tânia Maria Fernandes Salomão.

Melipona mondury and *M. rufiventris* are two species of indigenous stingless bees which are very similar morphologically. Studies carried out with those species and different kinds of molecular markers revealed low genetic variability. Besides, populations of some regions revealed patterns which suggest that more than one species are receiving the same scientific name. Today, however, several methodologies make it possible to differentiate species and evaluate the genetic structure and the genic flow, besides supplying the basis for the understanding of other important aspects such as the genome evolution of different groups and organisms. So, in this work, it was tried to optimize tools that could help populational and evolutionary studies of the two mentioned species, which could also be used with other bee species. In order to achieve this, several methodologies were used: (1) the drawing of primers microsatellites for *Melipona mondury* and *M. rufiventris* and the evaluation of their amplification in other stingless bee species; (2) comparison between the polymorphism found with the specific primers and that of the heterologous primers; (3) analysis of the cytochrome B sequence and (4) standardization of the flow cytometry protocol, in order to determine the DNA content of bees and its use on *M. rufiventris*, *M. mondury* and *Scaptotrigona xantroricha*. Using the ISSR technique, it was possible to achieve the drawing of 10 primers microsatellites for *M. rufiventris* and 11 for *M. mondury*, which presented the following genetic diversity values: $H=0,47$ and $H=0,38$, respectively. Those values were higher than those observed in amplifications in which it was used primers drawn for *M. bicolor* ($H=0,16$ and $H=0,18$ for *M. mondury* and *M. rufiventris*, respectively). In the analysis of cytochrome B sequences, eleven haplotypes were found which allowed the separation of three different groups, showing that could there are more than one species in these regions. Finally, the standardized methodology for the determination of the bee DNA content furnished good quality histograms, with

variation coefficient values of 2,87-4,14%. It demonstrates the usefulness of this methodology in studies involving bees. The DNA 1C content values found for females of *M. rufiventris*, *M. mondury* and *S. xantotricha* were C = 0.93 pg, C = 0,95 pg and C = 0,44 pg, respectively, which reveals that the size of the genome of the two species of *Melipona* was about twice the size of the one belonging to *S. xantotricha*. This variation may show differences in the genomic structure of the species analyzed. However, further studies should be carried out to investigate the genome of other species of *Melipona* and other genders of stingless bees, in order to verify the processes involved in the expansion and contraction of their genomes.

Introdução geral

1. Abelhas sem ferrão

As abelhas constituem o principal grupo de polinizadores de plantas floríferas em diversos ecossistemas (Bawa, 1990; Neff e Simpson, 1993), além de terem amplamente reconhecida a sua ação na perpetuação de espécies silvestres, contribuindo assim para a manutenção do equilíbrio ecológico (LaSalle e Gauld, 1993).

Elas formam o grupo mais importante de visitantes florais, pois são inteiramente dependentes das flores para a obtenção de recursos alimentares. Eriksson e Bremer (1992) verificaram que a taxa de diversificação específica é significativamente superior nos vegetais cujas famílias são polinizadas por animais e sugerem que a fidelidade dos polinizadores, especialmente a das abelhas, foi o fator mais importante na diversificação das Angiospermas.

A importância das abelhas para as plantas não se resume ao transporte de grãos de pólen de uma flor para outra, mas, também ao fato de serem vetores bastante ativos e que, muitas vezes, promovem o cruzamento entre plantas separadas por grandes distâncias, o que garante a manutenção do ciclo de reprodução sexuada das plantas e, conseqüentemente, a disponibilidade de alimento para outros animais.

Entre as abelhas sociais brasileiras, as pertencentes à tribo Meliponini, popularmente chamadas de “abelhas indígenas sem ferrão”, são as mais conhecidas e consideradas importantes polinizadores das árvores nativas. Este grupo de abelhas exibe ampla distribuição pelo mundo, sendo encontrado em 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).

Muitas espécies de meliponíneos, entretanto, têm tido suas populações grandemente reduzidas e a perda da diversidade destas abelhas certamente será acompanhada pela perda de muitas espécies de plantas que dependem delas para polinização (LaSalle e Gauld, 1993). A principal causa dessa redução populacional é a destruição dos ambientes naturais, pois, estes insetos formam um grupo isolado e muito especializado, cujos indivíduos dependem das

características climáticas e florísticas de suas regiões de origem. Essa destruição tem sido causada por desmatamento, uso indiscriminado de agrotóxico, ação predatória de meleiros, que derrubam árvores para obter o mel, deixando o ninho aberto e exposto à ação de predadores e pela ação de madeireiros que cortam as árvores mais velhas e mais prováveis de serem utilizadas pelas abelhas para nidificação (Campos, 1998; Kerr *et al.*, 1999).

A transformação de grandes áreas de floresta em pequenas capoeiras, devido ao desmatamento, pode representar várias limitações ao desenvolvimento das populações, como diminuição de locais para nidificação e redução na disponibilidade de alimentos (Viana e Melo, 1987). Além disso, com a degradação ambiental, o número de colônias de meliponíneos na mesma área de reprodução torna-se menor do que na área original e essas populações podem desaparecer com grande rapidez (Menezes *et al.*, 1993; Kerr *et al.*, 1994).

Entre as abelhas que têm sofrido grande redução populacional encontra-se *Melipona rufiventris* Lepelletier 1836, que no estado de Minas Gerais foi considerada como ameaçada de extinção, estando citada na edição de 1998 do “Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna de Minas Gerais” (Machado *et al.*, 1998).

As populações de *M. rufiventris* encontradas no sudeste brasileiro (desde a Bahia até Santa Catarina) foram consideradas como pertencentes a uma única espécie (Moure, 1975). No entanto, nesta extensa distribuição geográfica existem condições ambientais diversas e vários tipos de habitat associados.

Moure e Kerr (1950) e Moure (1975) relataram variações morfológicas com relação ao padrão de coloração das cerdas corbiculares e tíbias para essa espécie quando indivíduos de diferentes regiões geográficas foram analisados. Posteriormente, Melo (2003) reconheceu que as diferenças morfológicas existentes entre a “forma” de *M. rufiventris* encontrada no cerrado e a “forma” encontrada em regiões de mata eram suficientes para que elas fossem consideradas espécies diferentes.

Assim, atualmente, o nome *M. rufiventris* passou a ser utilizado apenas para a espécie encontrada no cerrado e a espécie encontrada nas regiões com vegetação típica de mata Atlântica passou a ser denominada *M. mondury*. Entretanto, como ressaltado por Melo (2003), o reconhecimento destas espécies

com base na morfologia é muito difícil, o que evidencia a necessidade de outros tipos de análises.

Segundo Melo (2003), a espécie *M. rufiventris*, típica de cerrado, ocorre no Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais e Goiás. Pelo menos em Minas Gerais onde essa espécie tem sido bastante estudada, percebe-se uma diminuição dos locais onde é encontrada e ela já não é vista em áreas impactadas (Silveira e Campos, 1995).

Melipona mondury, por sua vez, distribui-se ao longo da mata Atlântica, sendo encontrada nos estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (Melo, 2003). O estado de conservação da espécie não é homogêneo ao longo de sua região original de distribuição e tem sua ocorrência limitada aos fragmentos remanescentes. Entretanto essa abelha parece ser mais exigente quanto ao tamanho e qualidade do fragmento e a densidade dos ninhos parece ser maior, nos fragmentos maiores, enquanto nos remanescentes florestais, que em geral, são fragmentos menores e pouco desenvolvidos, praticamente não se encontra a espécie (Tavares *et al.*, 2008).

A partir de estudos utilizando marcadores moleculares feitos com essas espécies, alguns questionamentos têm surgido quanto à taxonomia das abelhas provenientes das localidades de Brasilândia de Minas e Dom Bosco, no noroeste de Minas Gerais. Estas populações formaram um grupo separado de *M. mondury* e *M. rufiventris* quando foram analisadas por meio de aloenzimas, RAPD e microssatélites (Tavares *et al.*, 2007) e, adicionalmente, se agruparam com amostras provenientes do Maranhão (Silva *et al.*, 2007). Estes dados sugeriram que estas populações podem representar uma outra espécie de meliponíneo, ainda não descrita, (*Melipona* sp) (Tavares *et al.*, 2007) que parece se estender ao norte e a oeste, pelos estados da Bahia e Goiás, até o Maranhão. O noroeste de Minas, portanto, representa o limite sul de sua distribuição. O Cerrado nativo, aí, está melhor preservado do que nas áreas de ocorrência da *M. rufiventris*. Porém, o avanço da agricultura também pode colocar em risco as populações da *Melipona* sp.

2. Análises moleculares

Atualmente, com o avanço das técnicas moleculares genômicas se torna cada vez maior o número de espécies estudadas, visto ser a molécula de DNA, a matéria prima para a diversidade (Sumner, 2006). Várias metodologias têm sido aplicadas para caracterização do genoma, as quais podem envolver o estudo de pequenas regiões, por meio de marcadores moleculares, o sequenciamento de genes e até mesmo do genoma inteiro ou o conhecimento sobre o conteúdo de DNA.

Dentre as vantagens dos marcadores moleculares em relação aos caracteres morfológicos, podemos citar: possibilidade de serem classificados objetivamente, eliminando-se o problema da subjetividade, e o fato dos marcadores moleculares serem obtidos em grandes quantidades e poderem ser utilizados em estudos de relações filogenéticas em diversos níveis (Meyer, 1997).

Como o estudo de todos os alelos presentes na população é impossível, torna-se importante a busca de marcadores genéticos que produzam estimativas da diversidade genética de uma população (Tregenza e Butlin, 1999). Nesse sentido, a biologia molecular é uma ferramenta importante que vem sendo utilizada em diversos estudos na genética de populações, existindo atualmente grande quantidade de marcadores moleculares que são utilizados em vários tipos de estudos.

No início dos anos 80, diferentes experimentos demonstraram que os genomas de eucariotos possuem várias classes de seqüências repetitivas (Hamada *et al.*, 1982; Tautz e Renz, 1984). Os microssatélites são as seqüências mais simples (Litt e Luty, 1989), possuem de 1 a 6 nucleotídeos de comprimento repetidos em tandem, são muito freqüentes e estão distribuídos ao acaso por todo o genoma.

Dentre as características dos microssatélites que os tornam úteis em vários tipos de estudos, destacam-se o fato deles serem caracteres mendelianos, codominantes e altamente polimórficos.

Os microssatélites são considerados uma região “instável” do genoma, no sentido de que estas regiões possuem uma taxa de mutação muito maior do que outros locos no mesmo genoma (Eisen, 1999). Essa “instabilidade” tem

conseqüências importantes como a produção de alelos polimórficos os quais têm sido muito úteis em diversos estudos (Sia *et al.*, 1997).

Locos microssatélites podem ser amplificados via PCR (Reação da polimerase em cadeia), utilizando-se *primers* que flanqueiam a região repetitiva. O polimorfismo encontrado, em geral, será uma diferença no tamanho dos fragmentos. Dessa forma cada elemento amplificado que possua um tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Primers microssatélites já foram desenvolvidos para alguns insetos, tais como abelhas (Estoup *et al.*, 1993; Estoup *et al.*, 1994; Paxton *et al.*, 1996; 1999b; Peters *et al.*, 1998), vespas (Choudhary *et al.*, 1993; Hughes e Queller, 1993), formigas (Evans, 1993; Gertsch *et al.*, 1995) e thrips (Chapman e Crespi, 1998) possibilitando a realização de estudos sobre paternidade, utilização de espermatozoides quando ocorre acasalamento com mais de um macho e genética de populações (Paxton *et al.*, 1999a; Peters *et al.*, 1999; Paxton, 2000).

Choudhary *et al.* (1993) e Hughes e Queller (1993) verificaram que os microssatélites são marcadores que apresentam altos níveis de polimorfismo, até mesmo em insetos onde se havia observado baixos níveis de variabilidade utilizando-se outros marcadores, como as aloenzimas. Em um estudo com a vespa *Polistes annularis*, por exemplo, seis locos microssatélites apresentaram uma heterozigosidade de 0,62 ao passo que 33 locos responsáveis pela codificação de aloenzimas apresentaram heterozigosidade de 0,035 (Hughes e Queller, 1993). Isso sugere que este tipo de marcador é uma poderosa ferramenta que pode ser utilizada em genética populacional.

Devido à grande importância desses marcadores, alguns *primers* microssatélites foram desenvolvidos para os mais diversos fins e para várias espécies. Estoup *et al.* (1993) foram os primeiros a descreverem *primers* microssatélites para abelhas. Mas somente em 1995 os microssatélites começaram a ser utilizados para se verificar a estrutura genética de populações nestes organismos (Estoup *et al.*, 1995). A partir disso, vários estudos têm sido feitos utilizando-se esse marcador molecular.

Tavares *et al.* (2007) analisaram a diversidade genética das espécies *Melipona mondury* e *M. rufiventris* utilizando *primers* microssatélites desenhados especificamente para *M. bicolor*. Esses autores encontraram uma baixa

diversidade genética e muitos locos foram monomórficos. Uma das justificativas seria o uso de *primers* heterólogos visto que estes poderiam levar a não amplificação de alguns alelos (alelos nulos) acarretando uma menor diversidade (Pépin *et al.*, 1995). Dessa forma *primers* específicos poderiam auxiliar nos estudos com essa espécie, visto o baixo polimorfismo encontrado com *primers* heterólogos.

A construção de *primers* microssatélites, entretanto, é a maior dificuldade desta técnica. Tradicionalmente, a estratégia de desenvolvimento de *primers* microssatélites envolve a construção de uma biblioteca genômica, hibridização com sondas contendo microssatélite, seqüenciamento dos clones hibridizados positivamente e desenho de *primers* flanqueando os microssatélites encontrados. Nesta estratégia tradicional, a etapa de seleção é trabalhosa e demorada, devido à baixa freqüência de clones contendo repetições microssatélites. O número de clones positivos obtidos, ou seja, contendo as repetições de interesse, normalmente, varia de 12% a menos de 0,04% do total de clones analisados (Zane *et al.*, 2002).

Assim, outras metodologias vêm sendo sugeridas de modo a superar as limitações impostas pela técnica tradicional. Uma destas envolve a construção e utilização de bibliotecas genômicas enriquecidas para alguns motivos SSR (Ostrander *et al.*, 1992). Esta estratégia envolve um número de etapas relativamente grande. No entanto, a eficiência de seleção dos clones contendo microssatélites é bem maior que no método tradicional, sendo a eficiência de clones positivos obtidos de 40 a 50%. A pesquisa em bancos de dados de DNA de domínio público é outra alternativa utilizada (Yu *et al.*, 1999), mas tal metodologia requer um número relativamente grande de seqüências de DNA publicadas, o que nem sempre acontece para a espécie de interesse. Nest *et al.* (2000), por sua vez, apresentaram uma metodologia, para o desenvolvimento de *primers* microssatélites, a partir da amplificação de seqüências internas simples repetidas (marcadores ISSR - *Inter-simple sequence repeats*). Esse procedimento é mais simples, mais barato e menos demorado quando comparado a outros procedimentos utilizados.

Os marcadores ISSR (*Inter - Simple Sequence Repeats*) surgiram como um sistema de análise molecular, que apresenta a confiabilidade e vantagens dos

marcadores SSR (microsatélites – *Simple Sequence Repeats*), bem como a simplicidade do RAPD. A técnica se baseia na amplificação de seqüências localizadas entre dois microsatélites inversamente orientados. Os *primers* ISSR são seqüências de microsatélites, tais como (CA)_n. As seqüências repetidas no genoma são selecionadas arbitrariamente e o padrão de amplificação de fragmentos observados em géis de eletroforese revela um grande número de fragmentos por *primer* (Wang, 2003). Os marcadores ISSR são dominantes, apresentam herança mendeliana e alta reprodutibilidade por utilizar *primer* de tamanho maior e a temperatura de anelamento mais elevada do que na técnica de RAPD. Além disso, os *primers* podem ser desenhados sem a necessidade de conhecimento prévio de alguma seqüência específica.

Tomando-se como base a metodologia proposta por Nest *et al.* (2000), os *primers* ISSR amplificam regiões compreendidas entre os motivos microsatélites, gerando fragmentos dos mais diversos tamanhos. Como no genoma existem regiões ricas em motivos microsatélites, em que se concentram diferentes repetições, os fragmentos gerados por ISSR-PCR têm alta possibilidade de possuírem microsatélites em seu interior. Além disto, pode-se tentar combinar mais de um *primer* ISSR em uma mesma reação PCR, para obter um maior número de bandas. Os fragmentos obtidos por PCR podem então ser purificados e clonados em vetor apropriado e os clones positivos serem seqüenciados. Posteriormente será feita uma análise da seqüência para verificar a presença de motivos SSR internos. Com esse método relativamente barato, regiões ricas em microsatélites podem ser amplificadas diretamente do DNA genômico e os produtos de PCR serem clonados, seqüenciados e *primers* serem desenhados flanqueando os microsatélites internos.

Essa metodologia permite o desenvolvimento de *primers* SSR quando há poucas seqüências disponíveis em bancos de dados para uma determinada espécie de interesse ou quando não há o acesso a bibliotecas genômicas ou recurso financeiro suficiente para a construção de tais bibliotecas. Atualmente, vários trabalhos utilizando essa metodologia podem ser encontrados demonstrando a eficácia e facilidade desta técnica (Kanchanaprayudh *et al.*, 2002; Francisco-Candeira *et al.*, 2007; Provan e Wilson, 2007).

O sequenciamento de genomas mitocondriais é outra ferramenta que tem se mostrado muito útil para estudos de filogenia molecular, uma vez que o número de haplótipos mitocondriais diferentes entre populações e entre espécies é alto, podendo assim, fornecer dados para o estudo da biologia e filogenia destas populações (Mitton, 1994). O DNAm é uma molécula circular, pequena, com número de genes conservado, apresentando poucas exceções quanto ao número de genes. Normalmente, esta molécula possui genes para as subunidades ribossômicas 12S e 16S, citocromo B, subunidades da citocromo oxidase (CO I, II e III), 22 tRNAs, subunidades 6 e 8 da ATPase e 7 subunidades da NADH desidrogenase (Moritz *et al.*, 1987). Ela apresenta uma herança materna, ausência de recombinação e regiões intergênicas pequenas ou ausentes (Moritz *et al.*, 1987). Além disso, o DNAm apresenta uma taxa de evolução muito maior do que genes nucleares. Esses fatores fazem com que o DNAm seja muito utilizado em estudos filogenéticos e evolutivos (Arias *et al.*, 2006).

Seqüências de duas regiões do DNAm (COI e *cyt b*) foram analisadas por Leys (2000) em estudos filogenéticos do gênero *Xylocopa* empregando os métodos de máxima parcimônia e máxima verossimilhança. Costa *et al.* (2003), com base em seqüências da região 16S do rDNA mitocondrial de 34 espécies de abelhas sem ferrão, estimou as relações filogenéticas entre elas. Arias e Sheppard (2005) relacionaram filogeneticamente várias espécies do gênero *Apis*, por análise de máxima parcimônia, sustentado por um estudo morfométrico dessas abelhas utilizando os genes ND2 do genoma mitocondrial e EF1 alfa do genoma nuclear.

Análises filogeográficas preliminares foram relatadas por Pires (2007) que estudou as espécies *M. mondury* e *M. rufiventris*. Os dados obtidos diferenciaram três ramos definidos, sendo um de *M. mondury* e dois dentro da espécie *M. rufiventris*. Um destes dois ramos é formado por abelhas oriundas de Brasilândia de Minas e Maranhão, o que está de acordo com dados morfológicos e moleculares já mencionados. Estes resultados sugerem aproximação evolutiva entre as espécies do noroeste de Minas Gerais e colônias amostradas no Maranhão.

3. Análises do Conteúdo de DNA em insetos

M. rufiventris e *M. mondury* têm sido bastante estudadas do ponto de vista populacional. Entretanto, não existem estudos sobre o tamanho do genoma destas espécies, o que poderia auxiliar na caracterização e diferenciação genética das mesmas. Para estimar o tamanho do genoma nuclear dois métodos são bastante utilizados: a citometria de imagem e a citometria de fluxo (Noirot *et al.*, 2005). A citometria de imagem é mais demorada e é utilizada quando se tem pouca disponibilidade de material. Quando existe material suficiente e disponibilidade de um citômetro a citometria de fluxo é o método mais vantajoso.

A citometria de imagem, conhecida inicialmente como citofotometria, surgiu com os experimentos realizados por Caspersson, em 1936, nos quais foi quantificado o DNA nuclear não corado, por meio do cálculo da absorbância da luz UV pela célula. Com o surgimento dos primeiros microfotômetros, foi possível quantificar vários componentes celulares e atividade enzimática por meio do cálculo da absorbância de células coradas ou não. Posteriormente, núcleos tratados por meio da reação de Feulgen começaram a ser utilizados em estudos de quantificação do DNA nuclear (Chieco e Derenzini, 1999).

Com o advento das vídeo-câmeras digitais e com o aumento da disponibilidade de computadores, passou-se a ter uma instrumentação adequada para os estudos em citometria de imagem com custos mais acessíveis e sem a necessidade de técnicos com grande especialização na aferição física constante do equipamento (Wied *et al.*, 1983). O sistema de análise de imagens passou a substituir os equipamentos anteriormente utilizados, promovendo a disseminação da citometria de imagem como técnica adequada para a quantificação de DNA. Na citometria de imagem, o conteúdo de DNA celular é calculado a partir da medida da absorbância de núcleos intactos (Chieco e Derenzini, 1999) ou cromossomos (Clarindo, 2004 e Rosado, 2004) preparados em lâminas e corados por meio da reação de Feulgen.

A citometria de fluxo é uma metodologia que envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas em suspensão e foi desenvolvida originalmente como um método para rápida contagem e análise de células sanguíneas. No entanto, com a evolução da

técnica, tornou-se importante ferramenta de análise 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 (Vermees *et al.*, 2000).

O citômetro de fluxo avalia a intensidade relativa de fluorescência de núcleos isolados a partir de células obtidas de tecidos não-proliferativos, resultando em um histograma típico, em ciclos celulares normais. Nestes histogramas, o maior pico corresponde ao número de núcleos na fase G0/G1 e o pico menor ao número de núcleos na fase G2, 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).

Para estimar o conteúdo de DNA nuclear por citometria de fluxo, suspensões de núcleos e/ou células permeáveis são coradas com fluorocromos DNA-específicos e a quantidade de luz emitida é quantificada (Dolezel e Bartos, 2005). Segundo Dolezel (1997) a posição do pico G0/G1 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).

Para a realização de análises quantitativas na citometria de fluxo algumas condições devem ser obedecidas: 1 – os núcleos ou células devem ser isolados em quantidade suficiente, devem permanecer intactos, e não deve ocorrer degradação ou modificações na macromolécula de estudo (DNA, RNA ou proteína); 2 – a coloração do DNA ou RNA deve ser específica e estequiométrica tanto para os núcleos da amostra como para o padrão e 3 – o tamanho do genoma do padrão deve ser conhecido (Dolezel e Bartos, 2005).

Para estimar o conteúdo de DNA por meio do citômetro de fluxo cora-se núcleos em suspensão com fluorocromos. Vários fluorocromos são freqüentemente utilizados na citometria de fluxo: iodeto de propídeo, brometo de etídeo, Hoechst 33258, 4',6'-Diamidino-2-feniindole (DAPI), mitramicina e Cromomicina A3.

Dolezel *et al.* (1992) relataram que o uso de fluorocromos que se ligam preferencialmente a regiões do DNA ricas em AT ou GC pode causar erros, e

recomendou o uso de fluorocromos intercalantes para mensurar a quantidade de DNA nuclear de uma espécie. Os valores de conteúdo de DNA obtidos com iodeto de propídeo são estatisticamente mais próximos aos obtidos pela citometria de imagem em comparação com o DAPI. Neste sentido, tem havido um consenso para quantificação do DNA nuclear de uma espécie, recomendando-se a utilização de fluorocromos intercalantes (Noirot *et al.*, 2002; Dolezel e Bartos, 2005).

Essa metodologia introduziu um novo escopo de estudo, principalmente pela possibilidade de aplicação em estudos taxonômicos, filogenéticos, evolutivos e programas de seqüenciamento genômicos. Dentro desta linha de pesquisa, uma ampla fonte de dados pode ser obtida e associada como o número cromossômico, poliploidia, estabilidade genômica em cultura de tecidos e estudo de ciclo celular. Estes dados também podem ser utilizados nas avaliações de variabilidade intra e interespecífica (Volgmayr e Greilhuber, 1998; Schifino e Wittmann, 2001; Noirot *et al.*, 2002) e análises de correlações entre o tamanho do genoma e características fisiológicas, bem como estudar o efeito ambiental no tamanho do genoma (Nardon *et al.*, 2003).

Apesar desta importância, o tamanho do genoma de vários grupos de insetos permanece completamente desconhecido. A falta de informações sobre o tamanho do genoma dos insetos, em particular, é extremamente surpreendente, dada a grande diversidade deste grupo. Das 535 espécies de insetos cujo conteúdo de DNA já foi quantificado (Gregory, 2008), a maioria pertence às ordens Diptera (moscas), Coleoptera (borboletas), Orthoptera (gafanhotos) e Hemiptera (afideos); na maioria dos casos, com poucas famílias incluídas. Várias ordens de insetos são representadas por menos do que cinco espécies e, muitas ordens não têm representantes.

A maioria dos genomas de insetos medidos até agora, estão na faixa de 0,2 - 1,5 pg. Notáveis exceções incluem os grilos e os gafanhotos (1,5 - 16,9 pg), libélulas (1,5 - 2 pg), percevejos (0,2 - 6,2 pg) e baratas (2 - 3 pg). A característica comum destes insetos é o fato deles serem hemimetábolos. Nenhuma das ordens de holometábolos analisadas até agora (Diptera, Coleoptera, Hymenoptera e Lepidoptera) parece apresentar membros com genoma maior do que 2 pg (Gregory, 2008).

No caso específico dos himenópteros, apenas 50 espécies: quatro abelhas (Jordan e Brosemer 1974; Crain *et al.* 1976; Rasch *et al.* 1985; Petitpierre 1996; Gadau *et al.* 2001), cinco vespas (Rasch *et al.* 1975, 1977, 1985; Johnston *et al.* 2004) e quarenta e uma formigas (Li e Heinz 2000; Johnston *et al.* 2004; Tsutsui *et al.*, 2008) tiveram seu conteúdo de DNA determinado e destas, apenas 3 pertencem à família Apidae: *Apis cerana*, *A. mellifera* e *Bombus terrestris*. Nestes casos, o conteúdo de DNA variou de 0,17 pg (espermatozóides e hemócitos de *Apis mellifera*) a 0,42pg (células musculares de *Bombus terrestris*) (Gregory, 2008).

Portanto, considerando-se o pequeno número de espécies de Hymenoptera que tem seu conteúdo de DNA determinado, pode-se dizer que pouco se sabe sobre o tamanho do genoma e a evolução do mesmo, neste grupo. Os dados obtidos poderão ser utilizados o entendimento de aspectos importantes da evolução do genoma, e ainda relacioná-los com características importantes dos himenópteros como a sociabilidade.

Assim, com o presente estudo pretendeu-se desenhar *primers* microssatélites específicos para *M. rufiventris* e *M. mondury*; comparar os níveis de polimorfismo encontrados para estas duas espécies quando se utiliza *primers* específicos e *primers* heterólogos; esclarecer dúvidas a respeito da taxonomia de abelhas do complexo *rufiventris* de algumas regiões brasileiras, por meio do seqüenciamento de um gene mitocondrial (Cyt B) e, padronizar um protocolo de citometria de fluxo para determinação do conteúdo de DNA de abelhas e aplicar o mesmo em *M. rufiventris*, *M. mondury* e *Scaptotrigona xantotricha*.

Referências

- Arias M.C., Brito R.M., Francisco F.O., Moretto G., de Oliveira F.F., Silvestre D., Sheppard W.S. (2006) Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. *Apidologie* 37:259-274.
- Arias M.C., Sheppard W.S. (2005) Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera:Apinae:Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 25–35.
- Bawa K.S. (1990) Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. *An. Rev. Ecol. Syst.* 21:399-422.
- Camargo J.M.F., Pedro S.R.M. (1992) Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hym., Apidae): a mini review. *Apidologie* 23:1-32.
- Campos L.A.O. (1998) *Melipona rufiventris* Lepelletier, 1836. In: Machado A.B.M., Fonseca G.A.B., Machado R.B., Aguiar L.M., Lins, L.V. (eds) Livro Vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais. Belo Horizonte. Fundação Biodiversitas. 608p.,.
- Chapman T.W., Crespi B.J. (1998) High relatedness and inbreeding in two species of haplodiploid eusocial thrips (Insecta: Thysanoptera) revealed by microsatellite analysis. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 43: 301-306.
- Chieco P., Derenzini M. (1999) The Feulgen reaction 75 years on. *Hist. Cell Biol.* 111: 345-358.
- Chodhary M., Strassmann J.E., Solís C.R., Queller D.C. (1993) Microsatellite variation in a social insect. *Biochem.Genet.* 31(1/2).
- Clarindo W.R. (2004) Avaliação de agregados celulares de café (*Coffea* spp.) por técnicas citométricas e citogenéticas. Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa. 83p.
- Costa R.G. (2003) Variabilidade genética em populações de *Melipona rufiventris* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) no estado de Minas Gerais – Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa,
- Crain W.R., Davidson E.H., Britten R.J. (1976) Contrasting patterns of DNA sequence arrangement in *Apis mellifera* (honeybee) and *Musca domestica* (housefly). *Chromosoma* 59: 1-12.
- Dolezel J. (1997) Application of flow cytometry for the study of plant genomics. *J. Appl. Genet.* 38(3): 285-302.

- Dolezel J., Bartos J., Voglmayr H., Greilhuber J. (2003) Nuclear DNA content and genome size of trouts and human. *Cytometry* 51A: 127-128.
- Dolezel J., Bartos J. (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany* 95: 99-110.
- Dolezel J., Sgorbati S., Lucretti S. (1992) Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum* 85: 625-631.
- Eisen J.A. (1999) Mechanistic basis for microsatellite instability,. In Goldstein D.B., Schlötterer C. (eds) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, New York, p.34- 48.
- Erikson O., Bremer B. (1992) Polination systems, dispersal modes, life forms, and diversification rates in angiosperms families. *Evolution* 46:258-266.
- Estoup A., Garnery L., Solignac, M., Cornmuet J.M. (1995) Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics* 140:679-695.
- Estoup A., Solignac M., Harry M., Cornuet J.M. (1993) Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Res.* 21: 1427-1431.
- Estoup A., Solignac M., Cornuet J.M. (1994) Precise assesment of the number of patriline and of genetic relatedness in honeybee colonies. *Proc. R. Soc. Lond. B* 258: 1-7.
- Evans J. (1993) Parentage analysis in ant colonies using simple sequence repeat loci. *Mol. Ecol.* 2: 393-397.
- Ferreira M.E., Gratapaglia, D (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3º ed. Brasília: Embrapa-Cernagen, 220p.
- Francisco-Candeira M., González-Tizón A., Varela M.A., Martínez-Lage A. (2007) Development of microsatellite markers in the razor clam *Solen marginatus* (Bivalvia: Solenidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 87: 977–978.
- Galbraith D. W., Lambert G. M., Grebenok R. J., Sheen J. (1995) Flow cytometric analysis of transgene expression in higher plants: green-fluorescent protein. *Methods in Cell Biology*. [S.I.] Copyright, 120 p.

- Galbraith D.W., Harkins K.R., Maddox J.M., Ayres J.M., Sharma D.P., Firoozabady E. (1983) Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissue. *Science* 220: 1049-1051.
- Gertsch P., Pamilo P., Varvio S. L. (1995) Microsatellites reveal high genetic diversity within colonies of *Camponotus* ants. *Mol. Ecol.* 4: 257-260.
- Gregory T.R. (2008) Animal Genome Size Database, [online] <http://www.genomesize.com> (accessed on 20 May 2008).
- Hamada H., Petrino M.G., Kakunaga T. (1982) A novel repeat element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 6465.
- Hughes C.R., Queller D.C. (1993) Detection of highly polymorphic microsatellite loci a species with little allozyme polymorphism. *Mol. Ecol.* 2.
- Johnston J.S., Ross L.D., Beani L., Hughes D.P., Kathirithamby J. (2004) Tiny genomes and endoreduplication in Strepsiptera. *Insect Mol. Biol.* 13: 581-585.
- Jordan J.R., Brosemer R.W. (1974) Characterization of DNA from three different bee species, *J. Insect Physiol.* 20: 2513-2520.
- Kanchanaprayudh J., Lian C., Zhou Z., Hogetsu T., Sihanonth P. (2002) Polymorphic microsatellite markers of a *Pisolithus* sp. from a *Eucalyptus* plantation. *Molecular Ecology Notes* 2: 263-264.
- Kawara S., Takata M., Takeara K. (1999) High frequency of DNA aneuploidy detected by DNA flow cytometry in Brown's disease. *J. Dermatological Science* 21: 23-26.
- Kerr W.E., Carvalho G.A., Nascimento V.M. (1999) The probable consequences of the destruction of brazilian stingless bees: In: Padoch C., Ayres J.M., Pinedo-Vasquez M., Henderson A. (eds) *Várzea: diversity, development and conservation of Amazonia's whitewater floodplains*. New York Botanical Garden Press, New York, pp. 395-404.
- Kerr W.E. (1994) Progresso na genética de abelhas. *Anais do X Congresso Brasileiro de Apicultura* 10: 264-277.
- La Salle J., Gauld I.D. (1993) Hymenoptera: Their diversity and their impact on the diversity of other organisms. In: La Salle J., Gauld, I.D. (Eds.) *Hymenoptera and Biodiversity*. Wallingford, UK. 348 p.

- Leys R., Cooper S.J.B., Sshwarz M.P. (2000) Molecular phylogeny of large carpenter bees, genus *Xylocopa* (Hymenoptera: Apidae), based on mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 3: 407-418.
- Li J., Heinz K.M. (2000) Genome complexity and organization in the red imported fire ant *Solenopsis invicta* Buren, *Genet. Res. Camb.* 75: 129-135.
- Litt M., Luty J.A. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 398-401.
- Machado A.B.M., Fonseca G.A.B., Machado R.B., Aguiar L.M.S., Lins L.V. (1998) Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna de Minas Gerais. Belo Horizonte, Biodiversitas.
- Melo G.A.R. (2003) Notas sobre meliponíneos neotropicais (Hymenoptera, Apidae), com a descrição de três novas espécies.. *In: Apoidea Neotropica. Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure.* UNESCO, Santa Catarina, Brasil. p. 85-92.
- Menezes A. M. L., Carvalho G. A., Nascimento V. A., Aidar D. S., Kerr W. E. (1993) Transporte de rainhas fisogástricas – novo método para seleção e aumento da população geneticamente ativa de Meliponíneos. *Rev. Bras. Genet.* 16(3): 322.
- Meyer D. (1997) Análise filogenética de seqüências de DNA. *In: AMORIM, D.S. Elementos básicos de sistemática filogenética.* 2ª. ed. Ribeirão Preto, p.187-208.
- Mitton J.B. (1994) Molecular approaches to population biology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25: 45-69.
- Moritz C., Dowling T.E., Brown W.M. (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18:269-292.
- Moure J.S., Kerr W.E. (1950) Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymenoptera – Apoidea). *Dusenya* 1(2):105-129 + 2 estampas.
- Moure J.S. (1975) Notas sobre as espécies de *Melipona* descritas por Lepeletier em 1836 (Hymenoptera: Apidae). *Rev. Brasil. Biol.* 35(4):615-623

- Nardon C., Weiss M., Vieira C., Biéumont C. (2003) Variation of the genome size estimate with environmental conditions in *Drosophila melanogaster*. *Cytometry Part A* 55A: 43-49.
- Neff J.L., Simpson B.B. (1993) Bees, pollination system and plant diversity. In: La Salle J., Gauld I.D. (eds) *Hymenoptera and Biodiversity*. C.A.B. International, Wallingford, UK pp. 143-167.
- Nest M.A.V.D., Steenkamp E.T., Wingfield B.D., Wingfield M.J. (2000) Development of simple sequence repeat (SSR) markers in *Eucalyptus* from amplified inter-simple sequence repeats (ISSR). *Plant Breeding* 119: 433-436.
- Noirot M., Barre P., Duperray C., Hamon S., Kochko A. (2005) Investigation on the causes of stoichiometric error in genome size estimation using heat experiments: consequences on data interpretation. *Annals of Botany* 95: 111-118.
- Noirot M., Barre P., Louarn J., Duperray C., Hamon S. (2002) Consequences of stoichiometric error on nuclear DNA content evaluation in *Coffea liberica* var. *dewevrei* using DAPI and propidium iodide. *Annals of Botany* 89: 385-389.
- Ostrander E.A., Jong P.M., Rine J., Duyk G. (1992). Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proceedings of the National Academy of Science* 89:3419-3423.
- Paxton R.J., Weibschuh N., Engels W., Hartfelder K., Quezada-Euan J.J.G. (1999) Not only single mating in stingless bees. *Naturwissenschaften* 86: 143-146.
- Paxton R.J., Weibschuh N., Quezada-Euán J.J.G. (1999) Characterization of dinucleotide microsatellite loci for stingless bees, *Molecular Ecology* 8, 690-692.
- Paxton R.J. (2000) Genetic structure of colonies and a male aggregation in the stingless bee *Scaptotrigona postica*, as revealed by microsatellites analysis. *Insectes Soc.* 47:63-69.
- Paxton R.J., Thoren P.A., Tengo J., Estoup A., Pamilo P. (1996) Mating structure and nestmate relatedness in a communal bee, *Andrena jacobii* (Hymenoptera, Andrenidae), using microsatellites. *Mol. Ecol.* 5: 511-519.
- Pépin L., Amigues Y., Lepingle A., Berthier J.L., Bensaid A., Vaiman D. (1995) Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra*

hircus (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. *Hereditary* 74, 53-61.

Peters J.M., Queller D.C., Imperatriz-Fonseca V.L., Strassmann J.E. (1998) Microsatellite loci for stingless bees. *Mol. Ecol.* 7: 784-787.

Peters J.M., Queller D.C., Imperatriz-Fonseca V.L., Roubik D.W., Strassmann J.E. (1999) Mate number, kin selection and social conflicts in stingless bees and honeybees. *Proc. R. Soc. London B* 266: 379-384.

Pires C. V. (2007) Comparação entre algumas populações de abelhas do complexo *Rufiventris* com base em seqüências do DNA mitocondrial. Monografia (Curso de Biologia) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG.

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

Provan J., Wilson P.J. (2007) Development of microsatellites for the peat moss *Sphagnum capillifolium* using ISSR cloning. *Molecular Ecology Notes* 7: 254–256.

Rabinovitch P.S. (1994) 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.

Rasch E.L., Cassidy J.D., King R. (1977) Evidence for dosage compensation in parthenogenetic Hymenoptera, *Chromosoma* 59: 323-340.

Rasch E.M. (1985) DNA “standards” and the range of accurate DNA estimates by Feulgen absorption microspectrophotometry, In: Cowden R.R., Harrison S.H. (eds) *Advances in Microscopy. Progress in Clinical and Biological Research*, New York, 196: 137-166.

Rasch E.M., Cassidy J.D., King R.C. (1975) Somatic cell DNA content in haploid, diploid, and triploid adults of *Mormoniella vitripennis*, *Journal of Cell Biology* 67, 353A.

Rosado T.B. (2004) Análise citogenética de cromossomos B de milho (*Zea mays* L.) associada às citometrias de fluxo e de imagem. Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa, 71 p.

Schifino-Wittmann M.T. (2001) Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. *Ciência Rural* 31 (5): 897-902.

- Sia E.A., Jinks-Robertson S., Petes T.D. (1997) Genetic control of microsatellite stability. *Mutation Research* 383: 61-70.
- Silva F.O., Tavares M.G., Batalha-Filho H., Waldschmidt A.M., Fernandes-Salomão T.M., Campos L.A.O. (2007) Variabilidade genética em populações de abelhas do complexo *rufiventris* (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) no Brasil. 53º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia, SP, Brasil.
- Sumner S. (2006) Determining the molecular basis of sociality in insects: progress, prospects and potential in sociogenomics. *Ann. Zool. Fennici* 43: 423-442.
- Tautz D., Renz M. (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 12: 4127.
- Tavares M.G., Salomão T.M.F., Borges A.A., Campos L.A.O. 2008. Uso de biologia molecular como subsidio para preservação de abelhas: espécies do grupo *rufiventris* (Meliponini) em Minas Gerais. In: *Insetos Sociais: da biologia a aplicação* (Vilela E.F., Santos I.A., Schoereder J.H., Serrao J.E., Campos L.A.O. Eds) pp 128-141
- Tavares M.G., Dias L.A.S., Borges A.A., Lopes D.M., Busse A.H.P., Costa R.G., Salomão T.M.F., Campos L.A.O. (2007) Genetic divergence between populations of the stingless bee uruçú amarela (*Melipona rufiventris* group, Hymenoptera, Meliponini): Is there a new *Melipona* species in the Brazilian state of Minas Gerais?. *Genetics and Molecular Biology* 30: 667-675.
- Tregenza T., Butlin R.K. (1999) Genetic diversity: do marker genes tell us the whole story? In: Magurran A.E., May R.M. (eds) *Evolution of Biological Diversity*. Oxford University press, Oxford, UK, pp. 37-55.
- Tsutsui N.D., Suarez A.V., Spagna J.C., Johnston J.S. (2008) The evolution of genome size in ants, *BMC Evolutionary Biology* 8(64): 1-9.
- Vermes I., Haanen C., Reutelingsperger C. (2000) Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunological Methods* 243: 167-190.
- Viana B.V., Melo G.A.R. (1987) Conservação de Abelhas. *Informativo Agropecuário* 13(149).
- Volgmayr H., Greilhuber J. (1998) Genome size determination in *Peronosporales* (Oomycota) by Feulgen Image Analysis. *Fungal Genet Biol.* 25: 181-195.
- Wang J.B. (2003) ISSR markers and their applications in plant genetics 24(5): 613-6.

- Wied G.L., Bartels P.H., Dytch H.E., Bibbo M. (1983) Rapid DNA evaluation in clinical diagnosis. *Acta Cytol.* 27: 33-37.
- Yu K., Park S.J., Poysa V. (1999). Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). *Genome* 42: 27-34.
- Zane L., Bargelloni L., Patarnello T (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11:1-16.

Capítulo 1

Caracterização de Locos microssatélites para a abelha sem ferrão *Melipona rufiventris* (Hymenoptera: Apidae)*

Palavras-chave: Hymenoptera, *Melipona*, microssatélite, ISSR, variabilidade genética

* Artigo escrito de acordo com as normas da Revista *Molecular Ecology Notes*.

**Caracterização de locos microssatélites para a abelha sem ferrão
Melipona rufiventris (Hymenoptera: Apidae)**

Resumo: Dez *primers* microssatélites foram desenvolvidos, a partir de seqüências de marcadores ISSR (*Inter-simple Sequence Repeats*), para a abelha sem ferrão *Melipona rufiventris*. Esses *primers* foram testados em 20 indivíduos de 10 colônias. O número de alelos por loco variou de 2 a 5 (média=3,2) e a diversidade genética variou de 0,10 a 0,76 (média=0,47). Diversos locos estudados com o auxílio desses *primers* também foram polimórficos em *M. quadrifasciata*, *M. bicolor*, *M. mandacaia* e *Partamona helleri*, o que mostra que estes *primers* microssatélites são úteis em estudos populacionais de abelhas sem ferrão.

Melipona rufiventris faz parte de um grupo de abelhas nativas do Brasil, conhecido como “abelhas indígenas sem ferrão”. Devido à ação de meleiros, queimadas e destruição do habitat natural, as populações destas abelhas têm sido drasticamente reduzidas e muitas delas se encontram ameaçadas de extinção em algumas regiões do país. Assim, existe um interesse crescente no desenvolvimento de marcadores genéticos que auxiliem no estudo da diversidade genética destas abelhas e que, portanto, possam ser utilizados no intuito de obter dados que permitam estabelecer estratégias para sua preservação. Microsatélites são marcadores moleculares muito úteis em estudos populacionais devido ao seu alto grau de polimorfismo, codominância e multialelismo. Peters *et al.* (1998) caracterizaram *primers* microsatélites para a espécie *M. bicolor*. Estes *primers* foram utilizados em estudos populacionais em algumas espécies de abelhas, incluindo *M. rufiventris* (Tavares *et al.*, 2007). A análise populacional de *M. rufiventris*, no entanto, evidenciou que muitos locos foram monomórficos e que a diversidade genética encontrada foi baixa ($H = 0,07$) (Tavares *et al.*, 2007). Segundo Pépin *et al.* (1995), este fato poderia ser explicado pelo uso de *primers* heterólogos, que subestimam a variabilidade genética.

Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar microsatélites para a espécie *M. rufiventris*, a partir de ISSR (*inter-simple sequence repeats*), uma metodologia que vem sendo aplicada em estudos populacionais com diversos organismos (Kanchanaprayudh, *et al.*, 2002; Francisco-Candeira *et al.*, 2007; Provan e Wilson, 2007).

A técnica de ISSR baseia-se na amplificação de regiões presentes entre seqüências microsatélites por um único *primer* que se ancora na região microsatélite. No presente estudo, as amplificações foram realizadas em um termociclador PTC-100® (MJ Research) utilizando o DNA extraído de um indivíduo de *M. rufiventris* e os seguintes *primers* ISSR: (CA)₈G, (GA)₈YG, (TG)₈RC, (GATA)₂(GACA)₂ e DVD(TC)₇. O programa de amplificação consistiu de um passo inicial de desnaturação a 94°C (3 min), seguido por 40 ciclos a 92°C (1min), 55°C (2min) e 72°C (2 min) com uma extensão final a 72°C (7 min). As amplificações foram conduzidas em volumes de 25 µl consistindo de 0,2 µM *primer*, 8 µM de dNTP, 0,5 U *Taq* DNA polimerase (Phoneutria), 1X do tampão de PCR e 20 ng de DNA genômico. Os fragmentos ISSR foram purificados e ligados

no vetor pGEM T-Easy (Promega) segundo instruções do fabricante. Após transformação em *E.coli* DH5 α , 32 clones positivos foram seqüenciados. As análises mostraram que os fragmentos seqüenciados apresentavam microssatélites correspondentes aos *primers* ISSR. Além disso, 12 clones apresentaram algum tipo de seqüência interna correspondente a um ou mais microssatélites. A análise destas seqüências permitiu o desenho de 10 *primers* microssatélites a partir do programa OligoExplorer 1.2 (Tabela 1). Estes *primers* foram testados em 20 indivíduos de *M. rufiventris*, provenientes de 10 colônias. As amplificações de PCR foram conduzidas em reações de 10 μ L contendo 12,5 ng de DNA genômico, 1X Promega *Taq* tampão de PCR, 0,5 ou 0,25 μ M de cada *primer forward* e *reverse*, 0,1 mM de dNTP, 1,5 ou 1,0 mM MgCl₂, e 1 U *Taq* DNA polimerase (Promega). As condições para o PCR foram: 94°C (3 min), seguido por 40 ciclos a 92°C (30 s), temperatura de pareamento específica para cada *primer* (1 min) e 72°C (30 s) com um passo de extensão final a 72°C (5 min). Os produtos foram separados em gel de poliacrilamida não desnaturante 8%. Valores para a diversidade genética de Nei (*H*) e testes para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) foram calculados utilizando o programa Popgene 1.31. Os 10 locos foram polimórficos com um número de alelos variando de 2 a 5 (média=3,2) e valores de diversidade genética variando de 0 a 0,76 (média=0,47). Apenas o loco Mru04 estava em equilíbrio HW. Os locos Mru08, Mru09 e Mru10 foram obtidos da mesma seqüência. Vários destes locos também foram polimórficos em *M. quadrifasciata*, *M. bicolor*, *M. mandacaia* e *Partamona helleri* (Tabela 2), o que demonstra que os mesmos podem ser utilizados em estudos genéticos de outras espécies de abelhas sem ferrão.

Agradecimentos: Os autores agradecem a FAPEMIG pelo apoio concedido ao projeto EDT 245/05; CNPq; UFV e CAPES pela bolsa concedida a D. M. Lopes.

Referências:

Francisco-Candeira M, González-Tizón A, Varela MA, Martínez-Lage A (2007) Development of microsatellite markers in the razor clam *Solen marginatus* (Bivalvia: Solenidae). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 87, 977–978.

Kanchanaprayudh J, Lian C, Zhou Z, Hogetsu T, Sihanonth P (2002) Polymorphic microsatellite markers of a *Pisolithus* sp. from a *Eucalyptus* plantation. *Molecular Ecology Notes*, 2, 263-264.

Pépin L, Amigues Y, Lepingle A, Berthier JL, Bensaid A, Vaiman D (1995) Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. *Hereditary*, 74, 53-61.

Petters JM, Queller DC, Imperatriz-Fonseca VL, Strassmann JE (1998) Microsatellite loci for stingless bees. *Molecular Ecology*, 7, 783-792.

Provan J, Wilson PJ (2007) Development of microsatellites for the peat moss *Sphagnum capillifolium* using ISSR cloning. *Molecular Ecology Notes*, 7, 254–256.

Tavares MG, Dias LAS, Borges AA, Lopes DM, Busse AHP, Costa RG, Salomão TMF, Campos LAO (2007) Genetic divergence between populations of the stingless bee urucu amarela (*Melipona rufiventris* group, Hymenoptera, Meliponini): Is there a new *Melipona* species in the Brazilian state of Minas Gerais?. *Genetics and Molecular Biology*, 30, 667-675.

Tabela 1: Caracterização dos 10 locos microssatélites desenvolvidos para *Melipona rufiventris*. Entre parênteses o número de acesso no GenBank.

Loco	Repetição	Tamanho (pb)	Ta (°C)	Sequencia do Primer (5' - 3')	A	H
Mru03 (EU678247)	(AG) ₆ e (CGTT) ₆	120	63°	F: AGAGAGAGAGAGAGACGC R: GGTGAAAGGAGAACGAAC	4	0,72
Mru04 (EU678248)	(AG) ₄ GG(AG) ₂ G(GA) ₅	115	62°	F: TTATCCTTGGCTCGACTC R: GATGTTCTCCACCTTCGT	2	0,10
Mru05 (EU678249)	(TA) ₈	103	52°	F: CAGAGATGGAAAGAACGG R: AAGAGATTTGCTGGAACG	2	0,26
Mru06 (EU678250)	(AC) ₅	109	57°	F: GGCGAAATTAGCGATACT R: TAACAGCGTAGAGAAAGG	2	0,18
Mru08 (EU678251)	(CGAG) ₆	143	62°	F: ATAAATCACGCACACTTG R: TCGAAAATTGCACTCTCG	2	0,26
Mru09 (EU678253)	(GA) ₇ AA(GA) ₃	139	64°	F: GTGATACCTCCGTGGAAC R: CTTCCGACAGACATCGC	4	0,71
Mru10 (EU678253)	(GAA) ₉	109	62°	F: GTTATCGCGTTTCGTCTG R: CTCTGGTTTCTCTCACA	4	0,56
Mru11 (EU678253)	(GA) ₁₁ e (AAG) ₄	121	60°	F: ACGATTAGACTGTGAGAG R: CGCTCTTATTCCATCCA	5	0,76
Mru12 (EU678252)	(GA) ₈ GG(GA) ₄	121	58,5°	F: GATAGATAGACAGACAGG R: GTGTAATCCGTTTAAGGG	4	0,58
Mru14 (EU678254)	(TCG) ₈ TT(GTC) ₄	136	62,5°	F: GCTGTTTCCCTGTTCGAG R: CCCCTATCTTTTATGCCG	3	0,64
Média					3,2	0,47

A, número de alelos, H, diversidade genética.

Tabela 2: Número de alelos microssatélites observados em cinco espécies de meliponíneos, utilizando *primers* microssatélites desenhados para *Melipona rufiventris*.

Loco	Espécies				
	<i>M. rufiventris</i>	<i>M. quadrifasciata</i>	<i>M. bicolor</i>	<i>M. mandacaia</i>	<i>P. helleri</i>
Mru03	4	5	2	4	1
Mru04	2	-	-	-	-
Mru05	2	3	3	2	-
Mru06	2	1	2	1	3
Mru08	2	1	2	-	-
Mru09	4	4	3	3	1
Mru10	4	2	3	-	-
Mru11	5	-	-	-	-
Mru12	4	1	5	1	-
Mru14	3	3	2	3	3

Capítulo 2

Nota científica sobre a caracterização de locos microssatélites para *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae)*

Palavras-chave: Hymenoptera, *Melipona*, microssatélite, ISSR, variabilidade genética

* Nota científica escrita de acordo com as normas da Revista *Apidologie*.

Caracterização de Locus Microssatélite para *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae)

Os microssatélites constituem uma classe de marcadores muito utilizada em estudos populacionais, filogenéticos e de parentesco em virtude do seu alto grau de polimorfismo, co-dominância e alta reprodutibilidade (De la Rúa *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2006). Seqüências microssatélites são amplificadas por PCR utilizando-se *primers* que flanqueiam as regiões de repetições, sendo o desenvolvimento destes *primers*, a etapa limitante no uso desses marcadores. Considerando esta dificuldade, existem *primers* microssatélites desenvolvidos para apenas três espécies de abelhas sem ferrão, *Melipona bicolor* (Peters *et al.*, 1998), *Scaptotrigona postica* (Paxton *et al.*, 1999) e *Trigona carbonaria* (Green *et al.*, 2001). Entretanto, considerando-se a diversidade de espécies de abelhas sem ferrão existente e a importância das mesmas como agentes polinizadores em ambientes naturais e cultivados (Kerr *et al.*, 1994, 1996; Heard 1999), torna-se urgente o desenho de outros *primers* espécie-específicos para meliponíneos.

Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar *primers* microssatélites específicos para *M. mondury*, espécie de abelha sem ferrão que se distribui ao longo da mata Atlântica dos estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (Melo, 2003). Os *primers* foram desenvolvidos por metodologia proposta por Nest *et al.* (2000), que se baseia na amplificação de seqüências localizadas entre dois microssatélites inversamente orientados (ISSR - *Inter-simple sequence repeats*). Por ser um procedimento mais simples e menos demorado quando comparado a outros procedimentos utilizados para este objetivo, esta metodologia vem sendo bastante empregada para o desenho de *primers* microssatélites.

Para o desenvolvimento dos *primers*, o DNA extraído de um indivíduo de *M. mondury* foi amplificado utilizando os seguintes *primers* ISSR: (GA)₈C, (CT)₈T, (CA)₈G, (AC)₈T, (AC)₈G, (AG)₈YC, (GA)₈YG, CCGACTCGAG(N)₆ATGTGG, (AC)₈RG, (AC)₈YA, (TG)₈RC, (CCG)₆, (CTC)₆ e CATGGTGGTTCATTGTTCCA. O programa de amplificação consistiu de um passo inicial de desnaturação a 94°C (3 min), seguido por 40 ciclos a 92°C (1min), 55°C (2min) e 72°C (2 min) com uma extensão final a 72°C (7 min). As amplificações foram conduzidas em volumes de 25 µl consistindo 0,2 µM primer, 8 µM de dNTP, 0,5 U *Taq* DNA polimerase

(Phoneutria), 1X do tampão de PCR e 20 ng de DNA genômico. Os fragmentos ISSR foram purificados e ligados no vetor pGEM T-Easy (Promega) segundo instruções do fabricante. Após transformação em *E.coli* DH5 α , 55 clones positivos foram seqüenciados.

Os resultados mostraram que alguns fragmentos seqüenciados apresentavam microssatélites correspondentes aos *primers* ISSR nas extremidades 5' e 3', bem como microssatélites internos. As análises destas seqüências permitiram o desenho de onze pares de *primers* microssatélites para *M. mondury*.

Estes *primers* foram testados amplificando-se o DNA de 20 indivíduos de 10 colônias de *M. mondury* e 20 indivíduos em cada uma das seguintes espécies: *M. quadrifasciata*, *M. bicolor*, *M. rufiventris* e *Partamona helleri*. As amplificações foram conduzidas em reações de 10 μ L contendo 12,5 ng de DNA genômico, 1X Promega *Taq* tampão de PCR, 0.5 ou 0.25 μ M de cada *primer* forward e reverse, 0.1 mM de dNTP, 1.5 ou 1.0 mM MgCl₂, and 1 U *Taq* DNA polimerase (Promega). As condições para o PCR foram: 94°C (3 min), seguido por 40 ciclos a 92°C (30s), temperatura de pareamento específica para cada *primer* (Tabela 1) (1 min) e 72°C (30 s) com um passo de extensão final a 72°C (5 min). Os produtos da amplificação foram separados em gel de poliacrilamida 8% e o programa POPGENE 1.32 (Yeh *et al.*, 1999) foi utilizado para calcular a diversidade genética de Nei (H), testar o desvio dos locos quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação.

Dentre os 11 locos testados nove foram polimórficos (81,8%) com um número de alelos variando de 1 a 6 (Tabela 1). Os valores de diversidade genética variaram de 0,0 a 0,78 (média: 0,38). Apenas o loco Mmo15 não estava no equilíbrio de HW ao nível de 5% e nenhum loco apresentou desequilíbrio de ligação.

Estes onze *primers* microssatélites foram testados em *M. quadrifasciata*, *M. bicolor*, *M. rufiventris* e *Partamona helleri* (Tabela 2) e, o sucesso nos resultados obtidos demonstra a utilidade dos mesmos em estudos genéticos com outras espécies de meliponíneos.

Referências

De la Rúa P., Galián J., Serrano J., Moritz R.F.A. (2001) Molecular characterization and population structure of the honeybees from the Balearic Islands, *Apidologie* 32, 417–427.

Green C.L., Franck P., Oldroyd B.P. (2001) Characterization of microsatellite loci for *Trigona carbonaria*, a stingless bee endemic to Australia, *Molecular Ecology Notes* 1, 89-92.

Heard T.A. (1999) The role of stingless bees in crop pollination, *Annual Review of Entomology* 44, 183-206.

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

Kerr W.E., Nascimento V.A., Carvalho G.A. (1994) Há salvação para os meliponíneos? *Anais II Encontro sobre abelhas, Ribeirão Preto*, pp. 60-65.

Melo G.A.R. (2003) Notas sobre meliponíneos neotropicais (Hymenoptera, Apidae), com a descrição de três novas espécies, in: Melo G.A.R., Alves-dos-Santos I. (Eds), *Apoidea Neotropica. Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure*, UNESCO, Santa Catarina, Brasil, p. 85-92.

Nest M.A.V.D., Steenkamp E. T., Wingfield B. D., Wingfield M. J (2000) Development of simple sequence repeat (SSR) markers in *Eucalyptus* from amplified inter-simple sequence repeats (ISSR), *Plant Breeding*, 119, 433-436.

Oliveira E.J., Pádua J.G., Zucchi M.I., Vencovsky R., Vieira M.LC. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites, *Genetics and Molecular Biology* 29(2), 294-307.

Paxton R.J., Weibschuh N., Quezada-Euán J.J.G. (1999) Characterization of dinucleotide microsatellite loci for stingless bees, *Molecular Ecology* 8, 690-692.

Peters J.M., Queller D.C., Imperatriz-Fonseca V.L., Strassmann J.E. (1998) Microsatellite locos for stingless bees, *Molecular Ecology*, 7, 783-792.

Yeh F.C., Yang R., Boyle T. (1999) POPGENE version 1.32: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Quick User Guide.

Tabela 1: Caracterização dos 11 locos microssatélites desenvolvidos para *Melipona mondury*. Entre parênteses o número de acesso no GenBank.

Loco	Repetição	Tamanho (pb)	T °C	Seqüência do <i>primer</i> (5'-3')	A	H
Mmo03 (EU735180)	(TAAA) ₃	133	50°	F: GGTGAAAAGGGGATGAAG R: ACTGCGTAAAACGAAGAC	1	0,0
Mmo06 (EU735181)	(GA) ₃ (AG) ₃	147	60°	F: AAAGGGTGGAAACGATGT R: CCCCATAGATTAACACG	1	0,0
Mmo08 (EU735182)	(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₃	104	59°	F: CGAGCTGAAAGGGCGTT R: TCCTCTCTTTGGTGGTC	2	0,18
Mmo10 (EU735182)	(GAA) ₅	106	60,5°	F: AGAGAGACGAAGCGAAG R: ATGACAACCGATCACGA	2	0,18
Mmo11 (EU735183)	(AG) ₃ GG(AG) ₆	116	57°	F: AGAGAGAGACAGAGAGAA R: CGACCCATATTTCCGAG	2	0,38
Mmo15 (EU735184)	(GAAC) ₅	100	54°	F: GCAAAATGAGCAAACGGACA R: GAGAGAGAGGGAGGTTTC	2	0,49
Mmo19 (EU735185)	(GT) ₁₇	107	62°	F: AGCGATTTAACTGAACGAT R: TATTCCTCTCTTCTACAC	6	0,78
Mmo20 (EU735186)	(TCG) ₆	121	60,5°	F: GAGGGCGACGATTACGAC R: AACGGCATTGTGTAACAGA	2	0,26
Mmo21 (EU735187)	(GA) ₅	168	57°	F: AACGTGGAACAGTCGGAC R: AGCGATTCGTTCAATTCCG	5	0,65
Mmo22 (EU735188)	(AG) ₁₆	191	61,5°	F: TGTAATCCTAACCCGATT R: CTTTGCAGTTTTCACACG	6	0,74
Mmo24 (EU735189)	(AG) ₄ e (AG) ₃ (GAAAA) ₂	180	52°	F: TCAGCGATTAATGAACAC R: TGGAATGTTTTACCTGT	3	0,50
Média					2,9	0,38

A, número de alelos, H, diversidade genética.

Tabela 2: Amplificação dos microssatélites de *M. mondury* em cinco espécies de abelhas sem ferrão mostrando o número de alelos observados.

Loco	Espécies				
	<i>M. mondury</i>	<i>M. quadrifasciata</i>	<i>M. bicolor</i>	<i>M. rufiventris</i>	<i>P. helleri</i>
Mmo03	1	1	2	2	-
Mmo06	1	2	3	2	1
Mmo08	2	2	3	1	-
Mmo10	2	1	1	1	3
Mmo11	2	1	4	2	-
Mmo15	2	-	1	3	2
Mmo19	6	-	-	4	-
Mmo20	2	1	1	1	1
Mmo21	5	-	-	3	1
Mmo22	6	6	3	6	-
Mmo24	3	-	2	2	1

Capítulo 3

Estudo comparativo do uso de *primers* microssatélites específicos e heterólogos em *M. rufiventris* e *M. mondury* (Hymenoptera: Meliponini)

Palavras-chave: Hymenoptera, *Melipona*, microssatélite, heterozigosidade, transferibilidade.

* Artigo escrito de acordo com as normas da revista *Genetics and Molecular Biology*.

Estudo comparativo do uso de *primers* microssatélites específicos e heterólogos em *M. mondury* e *M. rufiventris* (Hymenoptera: Meliponini)

Resumo

Microssatélites são considerados ferramentas úteis em estudos de genética de populações devido ao seu alto grau de polimorfismo. Apesar disso, estudos de diversidade genética utilizando-se marcadores microssatélites em meliponíneos têm mostrado um nível baixo de polimorfismo o que pode ter sido causado pelo uso de *primers* heterólogos, já que na maioria desses trabalhos os *primers* utilizados não haviam sido desenhados para a espécie em estudo. Diante disso, nesse trabalho comparou-se estimadores de diversidade genética em populações de *Melipona rufiventris* e *M. mondury* no estado de Minas Gerais utilizando *primers* específicos e heterólogos, para verificar se haviam alterações nos resultados utilizando os dois tipos de *primers*. O uso de *primers* específicos resultou em um aumento expressivo nos valores de heterozigosidade esperada e observada para *Melipona rufiventris* e *M. mondury*, bem como no número médio de alelos e ainda alterações no agrupamento das localidades analisadas. Assim, esse estudo mostra que *primers* heterólogos podem ser usados mas com cautela, e que outros fatores como o tamanho amostral, possibilidade de homoplasia e o sistema de separação (poliacrilamida, seqüenciador automático) também devem ser considerados na realização dos trabalhos com microssatélites, seja utilizando *primers* específicos ou heterólogos.

Introdução

Microssatélites ou seqüências de repetições simples (SSR) são regiões do genoma compostas por pequenas seqüências de 1 a 6 nucleotídeos repetidas várias vezes (Hancock, 1999). Microssatélites têm sido amplamente utilizados em estudos com variados organismos devido ao seu alto grau de polimorfismo e codominância. Uma das etapas limitantes no uso desses marcadores é o desenvolvimento de *primers* específicos. No entanto, vários trabalhos têm demonstrado que as regiões que flanqueiam os microssatélites são muito conservadas e assim, os *primers* podem ser utilizados entre espécies, até mesmo de diferentes gêneros (Ferreira e Gratapaglia, 1998). Desta forma o uso de *primers* heterólogos, com resultados satisfatórios, tem sido reportado em vários trabalhos (Francisco *et al.*, 2006, Carvalho-Zilse e Kerr, 2006, Insuan *et al.*, 2007).

Entretanto, sabe-se que, com o uso de *primers* heterólogos, o nível de informação difere entre as espécies e, em geral, o sucesso nas ampliações diminui à medida que aumenta a distância genética entre as mesmas (Francisco *et al.*, 2006), o que pode causar uma diminuição no polimorfismo observado. Mas até que ponto essa perda de informação pode acarretar em conclusões equivocadas sobre a estrutura genética da população?

Em abelhas, *primers* microssatélites foram primeiramente descritos para *Apis mellifera* e *Bombus terrestris* (Estoup *et al.*, 1993) e atualmente existem *primers* descritos para outras espécies inclusive para as abelhas nativas (meliponíneos) *Melipona bicolor* (Peters *et al.*, 1998) *Scaptotrigona postica* (Paxton *et al.*, 1999) e *Trigona carbonaria* (Green *et al.*, 2001).

Lopes (2004) estimou, por meio de microssatélites, a diversidade genética de populações de *Melipona mondury* e *M. rufiventris* que são duas espécies de abelhas sem ferrão, importantes polinizadores das matas nativas brasileiras. Essa autora utilizou *primers* microssatélites desenhados especificamente para *M. bicolor* para analisar amostras provenientes de regiões de mata e cerrado no estado de Minas Gerais e encontrou valores baixos de diversidade genética para essas espécies, em comparação com aqueles encontrados para a espécie para a qual os microssatélites foram descritos. No entanto, não se sabe se esses valores foram causados pelo uso de *primers* heterólogos, visto que alguns autores têm

relatado a presença de alelos nulos quando se utiliza *primers* heterólogos (Pépin *et al.*, 1995) ou porque as populações dessas abelhas têm sido reduzidas (Campos, 1998) e isto estaria levando a uma diminuição na variabilidade genética.

Assim, o presente estudo teve como objetivo analisar as populações de *M. mondury* e *M. rufiventris* com *primers* microsatélites recentemente descritos para essas espécies e comparar esses valores com aqueles obtidos com os *primers* de *M. bicolor*.

Material e métodos

1. Material biológico

Foram analisados indivíduos *M. mondury* e *M. rufiventris* coletadas em 7 e 8 localidades do estado de Minas Gerais, respectivamente (Tabela 1). A extração do DNA total das operárias foi realizada conforme o protocolo recomendado por Waldschmidt *et al.* (1997), utilizando-se o tórax de operárias adultas.

2. Análise molecular

As abelhas foram analisadas utilizando-se 9 *primers* heterólogos (Mbi32, Mbi215, Mbi218, Mbi232, Mbi233, Mbi254, Mbi256, Mbi259 e Mbi278) desenhados para *M. bicolor* (Peters *et al.*, 1998) e 9 *primers* específicos para *M. mondury* (Mmo08, Mmo10, Mmo11, Mmo15, Mmo19, Mmo20, Mmo21, Mmo22 e Mmo24) e *M. rufiventris* (Mru03, Mru04, Mru05, Mru06, Mru09, Mru10, Mru11, Mru12 e Mru14) (Lopes, 2008).

As amplificações de PCR foram conduzidas em reações de 10 μ L contendo 12,5 ng de DNA genômico, 1X Promega *Taq* tampão de PCR, 0,5 ou 0,25 μ M de cada *primer forward* e *reverse*, 0,1 mM de dNTP, 1,5 ou 1,0 mM MgCl₂, and 1 U *Taq* DNA polimerase (Promega). As condições para o PCR incluíam: 94°C (3 min), seguido por 40 ciclos a 92°C (30s), temperatura de pareamento específica para cada *primer* (Tabela 1) (1 min) e 72°C (30 s) com um passo de extensão final

a 72°C (5 min). Os produtos PCR foram resolvidos em gel de poliacrilamida não desnaturante 8% e visualizados por coloração com nitrato de prata 0,2%.

O desvio dos locos microssatélites quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado pelo teste χ^2 . O nível de polimorfismo foi verificado pelos valores de diversidade genética de Nei (H) e número médio de alelos por locos (A). Todas essas análises foram realizadas utilizando-se os programas Popgene versão 1.32 (Yeh *et al.*, 1999) e TFPGA (Miller, 1997).

Resultados e discussão

Atualmente microssatélites são aplicados a diversos tipos de estudos e o seu poder discriminante é uma importante característica que justifica seu uso em estudos de genética de populações. No entanto, sua eficiência depende dos valores de heterozigosidade, pois as inferências evolutivas, de diversidade genética são feitas com base nesses valores (Oliveira, 2006).

A Tabela 2 evidencia o número de alelos e os valores de heterozigosidade obtidos com os *primers* específicos para *M. mondury* e *M. rufiventris*. Os valores encontrados foram claramente superiores aqueles observados quando se utilizou *primers* heterólogos (Tabela 3). A Tabela 2 evidencia também que apenas três e quatro dos nove *primers* microssatélites de *M. bicolor* foram polimórficos em *M. mondury* e *M. rufiventris*, respectivamente, e que dois locos apresentaram índices de heterozigosidade maiores do que o verificado em *M. bicolor*. Alguns locos amplificados com os *primers* heterólogos em *M. rufiventris* e *M. mondury* foram seqüenciados e confirmaram que se tratavam de regiões de microssatélites.

Estudos de diversidade genética utilizando-se marcadores microssatélites em meliponíneos têm revelado um baixo polimorfismo, sendo que muitas vezes a maioria dos locos são monomórficos, apesar de ser essa uma classe de marcadores que apresenta alto grau de polimorfismo. Muitos destes trabalhos, no entanto, foram realizados utilizando *primers* desenhados para outra espécie (Francisco *et al.*, 2006; Borges, 2007; Silva, 2007; Tavares *et al.*, 2007).

Dentre as espécies de meliponíneos estudadas, até o momento, cujos locos foram amplificados com *primers* heterólogos de *M. bicolor*, todos os índices de H_0 se mostraram menores do que na espécie de origem dos *primers* ($H_0=0,37$, valor médio para todos os locos). Por exemplo, Francisco *et al.* (2006)

encontraram para *Partamona helleri* e *Plebeia remota* valores de $H_o = 0,11$ e $0,24$ respectivamente. Silva (2007) analisando populações de *Melipona quadrifasciata* encontrou $H_o=0,05$.

O fenômeno de amplificação utilizando *primers* heterólogos em outras espécies é conhecido como transferibilidade. Sabe-se que os índices de polimorfismo não são idênticos entre as espécies após o processo de transferibilidade de *primers* (Francisco *et al.*, 2006). Uma das principais causas para tal fato é a presença de alelos nulos que não são amplificados devido a mutações na seqüência de pareamento do *primer* (Callen *et al.*, 1993). Em geral, o número de alelos e os valores de diversidade genética são maiores para as espécies para as quais os *primers* microssatélites foram desenhados e o sucesso na transferibilidade diminui à medida que as espécies se tornam mais distantes geneticamente (Primmer e Merilä, 2000).

Carvalho-Zilse e Kerr (2006) observaram esse fenômeno em *M. scutellaris*. Esses autores verificaram que havia maior sucesso no uso dos *primers* feitos para *M. bicolor*, uma espécie do mesmo gênero, do que com os *primers* de *Apis mellifera*. Da mesma forma Lopes (2008) verificou que havia maior transferibilidade dos *primers* desenhados para *Melipona rufiventris* e *M. mondury* em espécies de *Melipona* do que em *Partamona*.

Nas análises com *primers* heterólogos, alguns alelos estavam presentes em todas ou na maioria das colônias analisadas mesmo em locos mais polimórficos. Carvalho-Zilse e Kerr (2006) também encontraram alelos com alta freqüência em todas as colméias de *M. scutellaris* analisadas. Segundo esses autores esses dados sugerem que estes locos podem estar ligados a genes importantes à sobrevivência das espécies, como genes de adaptação ao meio ambiente ou ao metabolismo. Em geral tem sido dito que os microssatélites são encontrados em regiões não-codificantes, no entanto alguns trabalhos têm relatado a associação destes com regiões de genes, sendo verificada a relação de alterações no número de repetições com algumas doenças humanas (Oliveira *et al.*, 2006).

Quando se compara as freqüências alélicas obtidas com *primers* heterólogos com aquelas obtidas com os *primers* específicos, a proporção de alelos que estão presentes em todas as colônias diminui. Isso mostra que a alta freqüência de alguns alelos pode estar relacionada com alelos nulos que não

foram detectados. Foi feita uma análise comparando as seqüências obtidas para esses locos com seqüências depositadas no GenBank a fim de verificar se havia similaridade com alguma região gênica, mas não foi encontrado nenhuma similaridade.

Outro fator que deve ser levado em consideração, e que é pouco comentado nos trabalhos com microssatélites, se refere ao método de separação dos fragmentos amplificados. Dependendo do suporte utilizado na separação dos mesmos, diferenças de poucos pares de bases podem não ser detectadas e os alelos não detectados podem levar a alterações nos padrões de agrupamento ou valores baixos de heterozigidade. Carvalho-Zilse e Kerr (2006), por exemplo, encontraram uma $H_o=0,32$ média em *M. scutellaris* com o uso de microssatélites, um valor alto comparado a outros meliponíneos. No entanto, esses autores utilizaram gel de sequenciamento, um método que consegue detectar diferenças de até um par de bases, para separar os produtos das ampliações. Medeiros (2007) encontrou diferenças no número de alelos e nos valores de heterozigidade comparando a utilização de prata em poliacríamida e fluorescência em sequenciador. Assim, diferenças no nível de heterozigidade também podem ser observadas de acordo com o método de separação.

Outro mecanismo que poderia dificultar a detecção de heterozigotos é a ampliação preferencial de um dos alelos durante o PCR. Neste caso, a enzima utilizada para a amplificação teria uma maior atividade na ampliação do alelo de menor tamanho gerando um aumento na concentração deste em detrimento do alelo maior (Waïtier, et al. 1998).

Assim, a deficiência de heterozigotos pode ser consequência de uma série de fatores como homoplasia, alelos nulos, método de separação e ainda amplificação preferencial.

É importante ressaltar que, embora *primers* heterólogos possam ser utilizados com sucesso em estudos com espécies filogeneticamente próximas, os resultados devem ser analisados com cuidado, já que o número de alelos e os valores de heterozigidade encontrados em cada caso podem variar devido à influência de diferentes fatores. Dessa forma o uso de *primers* específicos pode auxiliar em tais questões, pois, como observado neste estudo, o nível de poliformismo aumenta quando se utiliza *primers* específicos, tanto em relação ao número de alelos quanto à freqüência de heterozigotos, o que permite obter mais

informações sobre as populações analisadas visto que ocorre um aumento no número de locos informativos. Estes resultados mostram que os valores de heteroziguidade nessas espécies de *Melipona* são baixos mesmo com *primers* específicos, o que pode ser consequência do tipo de reprodução destes organismos.

Referências

Borges AA (2007) Variabilidade genética de *Partamona helleri* Friese, 1900 (Hymenoptera, Apidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 48pp.

Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Phillips HA, Richards RI, Mulley JC e Sutherland GR (1993) Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellites markers. Am. J. Hum. Genet. 52: 922-927.

Campos LAO (1998) *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836 . In: Machado ABM, Fonseca GAB, Machado RB, Aguiar LM e Lins LV (eds) Livro Vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 608pp.

Carvalho-Zilse GA and Kerr WE (2006) Utilização de marcadores microsatelites para estudos populacionais em *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). Magistra 18: 213-220.

Estoup A, Solignac M, Harry M e Cornuet JM (1993) Characterization of (GT)_n e (CT)_n microsatelites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. Nucl. Ac. Res. 21: 1427-1431.

Estoup A, Tailliez C, Cournet J.M e Solignac M (1995) Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatelites in two species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). Mol. Biol. Evol. 12: 1074-1084.

Ferreira ME e Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 ed, Ed. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, DF. 220 pp.

Francisco FO, Brito RM e Arias MC (2006) Allele number and heterozygosity for microsatellite loci in different stingless bee species (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). Neotrop. Entomol. 35(5): 638-643.

Green CL, Franck P e Oldroyd BP (2001) Characterization of microsatellite loci for *Trigona carbonaria*, a stingless bee endemic to Australia. Mol. Ecol. Notes 1: 89-92.

Hancock JM (1999) Microsatellites and other simple sequences: Genomic context and mutational mechanisms. In Goldstein DB e Schlotterer C (eds.) Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press, New York, 1-9 pp.

Insuan S, Deowanish S, Klinbunga S, Suttipraneed S, Sylvester HA e Wongsiri S (2007) Genetic differentiation of the giant honey bee (*Apis dorsata*) in Thailand analyzed by mitochondrial genes and microsatellites. Bioch. Gen. 45: 345-361.

Lopes DM (2004) Diversidade e estrutura genética em populações de *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae) por análise de microssatélites Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 55p.

Lopes DM (2008) Análises moleculares em *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.

Medeiros ACB (2006) Desenvolvimento, caracterização e estimativas de erros de genotipagem de locos microssatélites de *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Católica de Brasília, 108pp.

Miller MP (1997) Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.

Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R e Vieira MLC (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Gen. Mol. Biol.* 29(2): 294-307.

Paxton RJ, Weibschuh N e Quezada-Euán JJG (1999) Characterization of dinucleotide microsatellite loci for stingless bees. *Mol. Ecol.* 8: 690-692.

Pépin L, Amigues Y, Léplinge A, Berthier JL, Bensaid A e Vaiman D (1995) Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. *Heredity* 74: 53-61.

Peters JM, Queller DC, Imperatriz-Fonseca VL e Strassmann JE (1998) Microsatellite locos for stingless bees. *Mol. Ecol.* 7: 783-792.

Primmer CR e Merila J (2000) A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. *Conservation Gen.* 3: 445-449.

Silva RR (2007) Variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponina). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 41pp.

Silva FO, Tavares MG, Batalha-Filho H, Waldschmidt AM, Fernandes-Salomão TM e Campos LAO (2007) Variabilidade genética em populações de abelhas do complexo *rufiventris* (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) no Brasil. 53º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia, SP, Brasil.

Tavares MG, Dias LAS, Borges AA, Lopes DM, Busse AHP, Costa RG, Fernandes-Salomão TM e Campos LAO (2007) Genetics divergence between population of the stingless bee uruçú amarela (*Melipona rufiventris* group,

Hymenoptera, Meliponini): Is there a new *Melipona* sepecies in the Brazilian state of Minas Gerais? Gen. Mol. Biol. 30: 667-675.

Waldschmidt AM, Salomão TMF, Barros EG e Campos LAO (1997). Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). Braz. J. Gen. 20: 421-423.

Yeh FC, Yang R e Boyle T (1999) Popgene version 1.32: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Quick User Guide.

Tabela 1: Localidade e número de colônias analisadas em cada espécie.

Espécie	Localidade	N ° de Colônias
<i>M. rufiventris</i>	Guimarânia	9
	Patos de Minas	4
	Patrocínio	2
	Arcos	2
	Uberaba	2
	Córrego Danta	3
	Pequi	1
	Formiga	2
	Total	25
<i>M. mondury</i>	Coluna	1
	Itamarandiba	3
	Resende Costa	6
	Rio Vermelho	5
	Poté	4
	Diogo Vasconcelos	3
	Marliéria	1
	Total	23

Tabela 2: Número de alelos (A), heterozigosidades observada (H_o) e esperada de Nei (H_e) para os nove locos microssatélites específicos de *M. rufiventris* e *M. mondury*.

<i>Melipona rufiventris</i>				<i>Melipona mondury</i>			
Loco	A	H_o	H_e	Loco	A	H_o	H_e
Mru03	3	0,43	0,62	Mmo08	1	0,00	0,00
Mru04	5	0,32	0,43	Mmo10	2	0,00	0,23
Mru05	2	0,00	0,15	Mmo11	2	0,17	0,16
Mru06	4	0,13	0,16	Mmo15	2	0,43	0,48
Mru09	4	0,08	0,49	Mmo19	8	0,60	0,80
Mru10	3	0,26	0,57	Mmo20	2	0,00	0,23
Mru11	4	0,21	0,54	Mmo21	5	0,27	0,64
Mru12	3	0,00	0,63	Mmo22	6	0,45	0,81
Mru14	2	0,00	0,32	Mmo24	2	0,09	0,08
Média	3,3	0,16	0,43	Média	3,3	0,22	0,38

Tabela 3: Número de alelos (A) e heterozigosidades observada (H_o) para os nove locos microssatélites amplificados com *primers* de *M. bicolor*.

Loco	<i>Melipona rufiventris</i>		<i>Melipona mondury</i>		<i>Melipona bicolor</i>	
	A	H_o	A	H_o	A	H_o
Mbi32	1	0,00	1	0,00	4	0,63
Mbi215	1	0,00	1	0,00	3	0,50
Mbi218	4	0,28	4	0,09	3	0,12
Mbi232	2	0,00	3	0,09	4	0,88
Mbi233	1	0,00	5	0,43	6	0,88
Mbi254	3	0,48	4	0,57	3	0,38
Mbi256	1	0,00	1	0,00	4	0,50
Mbi259	1	0,00	1	0,00	2	0,12
Mbi278	1	0,00	1	0,00	5	0,86
Média	1,67	0,09	2,33	0,13	3,78	0,54

Capítulo 4

Diferenciação genética de espécies de *Melipona* do grupo *rufiventris* por análise de DNA mitocondrial

Palavras-chave: Hymenoptera, *Melipona*, cytB, diferenciação genética, complexo *rufiventris*

* Artigo escrito de acordo com as normas da revista *Insectes Sociaux*.

Diferenciação genética de espécies de *Melipona* do grupo *rufiventris* por análise de DNA mitocondrial

Resumo

Análises morfológicas e moleculares têm sugerido que populações de abelhas de algumas regiões, apesar de terem sido classificadas como *Melipona rufiventris*, podem, na verdade, representar um complexo de espécies. Nesse sentido, parte da seqüência do gene citocromo B do DNAm de abelhas do complexo *rufiventris* foi utilizada para determinar o nível de diferenciação genética entre essas abelhas e se as diferenças encontradas permitiam classificar as amostras analisadas como espécies distintas. *M. mondury* foi utilizada como grupo externo. A partir de seqüências de 490pb foram encontrados um total de 11 haplótipos com uma diversidade nucleotídica (π) de 0,0236 e uma diversidade haplotípica (H_d) de 0,862. As árvores filogenéticas, inferidas por meio de análises de Máxima Verossimilhança, Bayesiana e *Neighbor-Joining*, apresentaram a mesma topologia, exceto para uma colônia de São Luís (Maranhão), que agrupou-se de maneira diferente pela Máxima Verossimilhança e pela inferência Bayesiana, demonstrando a existência de três grupos. O primeiro grupo reuniu abelhas provenientes de Minas Gerais e Goiás e, já identificadas como *M. rufiventris*, o segundo representado por São Luís e o terceiro formado por abelhas provenientes do noroeste de Minas Gerais, Maranhão, Ceará, Tocantins e Piauí, que devido ao nível de diferenciação encontrado, poderia representar outra espécie de *Melipona* do grupo *rufiventris*, ainda não identificada.

Introdução

A abelha urucu – amarela pertencente ao grupo *rufiventris* apresenta ampla distribuição no território nacional, sendo encontrada em vários estados. Atualmente existem seis espécies que podem ser agrupadas dentro do complexo *rufiventris*: *Melipona rufiventris* (presente em Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e São Paulo); *M. flavolineata* (Amazonas, Maranhão, Pará e Tocantins), *M. brachychaeta* (Mato Grosso), *M. paraensis* (Amapá e Pará), *M. dubia* (Acre, Amazonas e Rondônia) e *M. mondury* (Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo, Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina) (Silveira *et al.*, 2002; Melo, 2003).

Dentre estas, em *M. rufiventris* foram encontradas variações morfológicas e moleculares que indicaram a presença de mais de uma espécie sendo chamada de *M. rufiventris* em Minas Gerais. Melo (2003) fez a primeira separação destas espécies, relatando que os indivíduos de Mata eram diferentes daqueles encontrados no cerrado. Assim, os nomes *M. rufiventris* e *M. mondury* passaram a ser utilizados para as espécies presente em regiões de cerrado e Mata Atlântica, respectivamente.

Tavares *et al.* (2008) mencionam que a extensa distribuição geográfica apresentada por estas espécies abrange condições ambientais diversas e que é possível a existência de vários ecótipos adaptados localmente. Além disso, vários trabalhos realizados com estas espécies levaram à questionamentos quanto à taxonomia das mesmas (Tavares *et al.*, 2007). Populações provenientes de localidades como Brasilândia de Minas e Dom Bosco, no noroeste de Minas Gerais, formaram um grupo separado de *M. mondury* e *M. rufiventris* quando foram analisadas por meio de aloenzimas, RAPD, microssatélites e RFLP (Schetino, 2005; Tavares *et al.*, 2007), se agrupando com amostras provenientes do Maranhão (Silva *et al.*, 2007). Estes dados sugeriram que estas populações poderiam representar uma outra espécie de *Melipona*, ainda não descrita, (*Melipona* sp) que parece se estender ao norte e a oeste de Minas Gerais, até o Maranhão.

Como a identificação das espécies do complexo *rufiventris* baseada apenas na morfologia é difícil, outras ferramentas como estudos moleculares tem

sido utilizadas para tentar esclarecer o *status* taxonômico de populações das mesmas. Neste trabalho, analisou-se seqüências parciais do gene citocromo B do DNAm_t buscando informações que pudessem contribuir para esclarecer dúvidas a respeito da taxonomia de abelhas do complexo *rufiventris* de algumas regiões brasileiras.

Material e Métodos

Material Biológico

Operárias de abelhas do complexo *rufiventris* foram amostradas em diferentes localidades dos estados de Minas Gerais, Goiás, Maranhão, Ceará, Piauí e Tocantins (Tabela 1 e Figura 1). Um indivíduo por colônia foi utilizado nas análises. As amostras foram classificadas em dois grupos *Melipona rufiventris* e *Melipona* sp, conforme resultados de outros marcadores moleculares e identificações de Gabriel A.R. Melo.

Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento

O DNA total foi extraído do tórax de operárias adultas conforme Waldschmidt *et al.* (1997).

Os *primers* Mb2 e Mb4 utilizados nas amplificações foram desenhados a partir do genoma mitocondrial de *M. bicolor* (Silvestre *et al.*, 2008) utilizando o programa OligoExplorer 1.2TM. Para as amplificações, amostras de 50 ng de DNA total de um indivíduo foram adicionadas à mistura de reação num volume final de 25 µL contendo 5 µL do tampão 5X (Promega), 1,5 µL de MgCl₂ a 25 mM, 0,5 µL de cada *primer* Mb2 (5' ACTATCAGCATTACCTTATATTGGTC 3') e Mb4 (5' GTGTTTTAGCTCGAATTCGGTATG 3') a 20 µM, 2,5 µL da mistura de dNTPs a 100 mM e 1 U de *Taq*® DNA polimerase (Promega). As condições de amplificação consistiram de um passo de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; seguido de 35 ciclos com 94°C por 1 minuto, 52°C por 1:20 minutos e 64°C por 2 minutos; e um passo de extensão final a 64°C por 10 minutos.

O DNA amplificado foi purificado com enzima ExoSap-IT[®] e submetido a sequenciamento direto pelo seqüenciador automatizado MegaBace DNA Analysis System 500 (Amershan Biosciences Corp.)

Análise dos dados

As seqüências do *cytB* obtidas foram editadas utilizando-se o pacote de programas PhredPhrap Consed (Ewing *et al.* 1998; Ewing & Green 1998; Gordon *et al.* 1998) e alinhadas com CLUSTAL W (Higgins *et al.* 1994) utilizando-se o programa MEGA4 (Tamura *et al.* 2007). As seqüências foram alinhadas em comparação com a seqüência do *cytB* de *M. bicolor* (Silvestre *et al.*, 2008).

O programa DNAsp 4 (Rozas *et al.* 2003) foi utilizado para calcular a diversidade haplotípica (H_d) e nucleotídica (π).

As árvores filogenéticas foram construídas por *Neighbor-Joining*, Máxima Verossimilhança e inferência Bayesiana. Para o *Neighbor-Joining* foi utilizada a distância P com 500 bootstrap. O modelo de substituição usado para reconstrução da filogenia de Máxima Verossimilhança foi estimado pelo Model Test 3.06 (Huelsensbeck e Crandall 1997; Posada e Crandall 1998). Foi realizada uma busca heurística, utilizando-se o algoritmo TBR (tree-bisection-reconnection) e 100 replicatas para calcular os valores de bootstrap.

O programa MrModelTest (Nylander *et al.* 2004) foi utilizado para selecionar o modelo de substituição nucleotídica para inferência Bayesiana que foi realizada pelo programa MrBayes 3.1 (Huelsenbech & Ronquist 2001). Para a análise Bayesiana foi utilizado 1.000.000 de gerações para cadeia de Markov e Monte Carlo (MCMC) e *burn-in* de 100.000.

O modelo selecionado para construção da árvore de verossimilhança foi TrN+I, sendo I=0,7909, enquanto que para a inferência Bayesiana o modelo estimado foi o HKY+I, sendo I = 0,8143. A espécie *Melipona mondury* foi utilizada como grupo externo.

A rede de haplótipos foi obtida pelo programa Network 4.5.0.0 (www.fluxus-engineering.com) pelo método do *median-joining network* (Bandelt *et al.* 1999). Para a construção desta foi desconsiderado o grupo externo.

Resultados

A partir das 39 amostras seqüenciadas um fragmento de 490 pb foi obtido, excluindo-se os *gaps*. Um total de 13 haplótipos foram obtidos, sendo dois provenientes de *M. mondury* (grupo externo). A Tabela 1 apresenta a distribuição dos haplótipos em cada localidade. No alinhamento obtido, 30 sítios foram variáveis, sendo 7 *singletons* e 23 parcimoniamente informativos. A diversidade haplotípica foi $Hd=0.863$ e a diversidade nucleotídica $\pi=0,0236$. A composição nucleotídica foi: A=37,2%, C=11,0%, G=4,3% e T=47,5%.

Os diferentes métodos utilizados para a reconstrução da filogenia convergiram para árvores idênticas. A Figura 2 mostra, como exemplo, a árvore obtida através da inferência Bayesiana. Nesta árvore, observa-se a formação de dois clados bem definidos, com suporte de probabilidade a posteriori de 1,0. O primeiro clado (Clado *rufiventris*) reuniu as amostras de *M. rufiventris* provenientes de Goiás, Brasília e algumas localidades de Minas Gerais. O segundo clado (Clado sp), por sua vez, incluiu as amostras provenientes do Maranhão, Piauí, Ceará, Tocantins e Noroeste de Minas Gerais, que, provavelmente, representam populações de *Melipona* sp (Figura 3).

A amostra proveniente de São Luís do Maranhão, na análise Bayesiana, formou um grupo a parte (Clado sp2), mais próximo do Clado sp do que do Clado *rufiventris*. Na análise de Máxima Verossimilhança, entretanto, o Clado sp2 não foi observado e o indivíduo proveniente de São Luís do Maranhão agrupou-se com *Melipona* sp.

A inferência Bayesiana é suportada pela rede de haplótipos obtida por *median-joining*, que demonstrou a existência de três clados (*rufiventris*, sp e sp2), excluindo-se o grupo externo. O clado sp separa-se do clado *rufiventris* por 21 passos mutacionais e do clado sp2 por 10 passos. O clado *rufiventris* está separado do clado sp2 por 18 passos mutacionais (Figura 3).

Os clados *rufiventris* e sp apresentaram haplótipos mutuamente exclusivos, ou seja, não foi encontrado nenhum haplótipo comum aos dois grupos.

No clado *rufiventris* foram observados três haplótipos (H1, H2, H3) e as colônias de Minas, exceto, aquela proveniente de Córrego Danta, apresentaram o mesmo haplótipo (H1). Neste clado, parece não haver uma estruturação geográfica já que o haplótipo H1 é compartilhado por localidades distantes (Minas

Gerais e Brasília). Os três haplótipos observados neste clado diferem por apenas um ou dois passos mutacionais.

No clado sp, o estado do Maranhão apresentou uma maior proporção de haplótipos (H5, H6, H7) que o de Minas Gerais, onde foi encontrado um único haplótipo (H10). O haplótipo 6 foi encontrado no Ceará, Piauí e Maranhão. O haplótipo 4 foi o mais distante, apresentando mais passos mutacionais em relação a todos os outros haplótipos deste clado. Esse haplótipo foi encontrado apenas em Novo Acordo, no Tocantins.

A rede de haplótipos mostra uma separação evidente da amostra proveniente de São Luís no Maranhão (Clado sp2). Este clado está separado do clado *rufiventris* por 18 passos mutacionais e por 10 passos mutacionais do clado sp. Entretanto, somente uma colônia desta localidade foi utilizada para análise, o que não permite interpretações mais conclusivas sobre essa separação.

Discussão

A composição de bases da seqüência parcial do gene *cytB* nas abelhas do grupo *rufiventris* analisadas mostrou uma alta proporção de A+T (87,7%), o que está de acordo com o observado para o *cytB* de *M. bicolor* e no DNA mitocondrial de outros insetos (Simon *et al.* 1994, Silvestre, 2008).

A análise filogenética e a rede de haplótipos mostraram a formação de três clados, confirmando a separação de *M. rufiventris* e *Melipona* sp, além da separação de São Luís, que devido ao número de passos mutacionais pode representar uma terceira espécie.

O clado *rufiventris* formado exclusivamente por amostras de *M. rufiventris*, apresenta pouca diferenciação e poucos passos mutacionais entre os haplótipos, o que pode indicar uma dispersão recente ou ser devido à distribuição um pouco mais restrita apresentada por essa espécie. Por outro lado, o clado sp apresentou uma maior variação de haplótipos e estes se diferenciam por um maior número de passos mutacionais do que o observado no clado *rufiventris*. Da mesma forma que no clado *rufiventris* a diversificação haplotípica observada no clado sp pode estar relacionada com a distribuição geográfica. Nesse caso a distribuição mais

ampla, abrangendo pelo menos regiões de Minas Gerais, Tocantins, Maranhão, Ceará e Piauí favoreceu uma maior diversificação.

Outro ponto a ser levantado se refere justamente à distribuição geográfica apresentada por *Melipona* sp segundo os resultados obtidos. Silveira *et al.* (2002), não menciona a presença de nenhuma espécie do grupo *rufiventris* nos estados do Ceará e Piauí, como o observado neste trabalho. Dessa forma, o agrupamento de abelhas desses estados com aquelas do noroeste mineiro, pertencentes ao grupo *rufiventris*, sugere uma maior abrangência das abelhas desse grupo. Além disso, de acordo com Silveira *et al.* (2002), a espécie do grupo *rufiventris* encontrada em Tocantins seria *M. flavolineata*, que também ocorre no Pará, Amazonas e Maranhão. Nestes estados, o bioma amazônico é encontrado em todos eles e provavelmente, esta espécie esteja associada a este bioma (ver Fig. 1). Pela distribuição geográfica das abelhas analisadas verifica-se que elas são encontradas em regiões de cerrado e também de caatinga como no estado do Ceará. Assim, considerando-se que a amostra coletada em Novo Acordo/TO se encontra em uma região de cerrado, que apresenta características muito distintas do bioma amazônico, sugere-se que outra espécie do complexo *rufiventris* além de *M. flavolineata* esteja presente neste estado.

Quando se observa as amostras provenientes do noroeste de Minas Gerais verifica-se que as localidades de Brasilândia de Minas, Januária, Urucuia e Dom Bosco apresentam um único haplótipo (H10). Isso pode ser explicado por efeito fundador, indicando que a espécie *Melipona* sp possa estar se dispersando do Norte do país em direção ao sul. No entanto, não se encontrou um haplótipo compartilhado entre essas regiões (Norte e Noroeste) e, portanto, um estudo mais detalhado precisa ser feito com o intuito de verificar como tem ocorrido a expansão destas abelhas, bem como o local de origem das mesmas. Diferente do observado neste trabalho, Pires (2007), encontrou variação de haplótipos no noroeste mineiro, para estas mesmas populações. Esta autora, entretanto, analisou seqüências de COI/COII, as quais parecem apresentar uma taxa de mutação maior que *cytB*, como verificado em *M. quadrifasciata* (Batalha-Filho, comunicação pessoal), o que faz com que seja possível detectar uma maior diversidade de haplótipos.

A separação observada entre *M. rufiventris* e *Melipona* sp já foi relatada em trabalhos com microssatélites (Silva *et al.*, 2007) e por análise de seqüências de

COI/COII (Pires, 2007) que mostram o agrupamento de abelhas do Maranhão com abelhas do noroeste de Minas Gerais (Brasilândia de Minas, Dom Bosco, Januária e Uruçuia). Schetino (2005) em estudo preliminar de filogeografia com estas abelhas, também mostrou que abelhas do Maranhão e do Ceará se agrupavam com as abelhas do noroeste de Minas Gerais (Brasilândia de Minas). Estes dados reforçam a hipótese de que as abelhas dessa região realmente correspondam a outra espécie.

O clado sp2, formado pela amostra proveniente de São Luís, também apresentou um haplótipo exclusivo e divergente dos demais clados por muitos passos mutacionais. A grande divergência entre a seqüência desta localidade com as demais localidades do grupo sugere que a amostra analisada pode ser representante de uma outra espécie do complexo *rufiventris*, próxima à *Melipona* sp. Quando se observa a distribuição das localidades dos clados *rufiventris* e sp, (ver Fig. 1) percebe-se que as espécies representantes desses clados são espécies típicas de vegetação de cerrado, sendo que *Melipona* sp. também se encontra presente em regiões de caatinga, talvez por esta apresentar certa semelhança com cerrado, o que é ainda mais acentuado no limite entre esses dois biomas. No entanto São Luís está localizado no bioma amazônico que é uma vegetação muito diferente do cerrado. Este fato fortalece a sugestão de que a espécie encontrada em São Luís seja uma espécie diferente de *Melipona* sp e de *M. rufiventris*. Entretanto essa variação não foi detectada em análises com COI/COII (Pires, 2007). Além disto, apenas uma colônia foi amostrada o que demonstra que essa região precisa ser melhor estudada.

Nos estudos feitos em Minas Gerais observa-se que as espécies do grupo *rufiventris* ocupam espaços geográficos bem definidos e com pouca sobreposição. Por exemplo, *M. mondury* é encontrada em regiões de Mata Atlântica, enquanto *M. rufiventris* em áreas de cerrado. *Melipona* sp, também ocupa regiões de cerrado mas numa área geográfica diferente de *M. rufiventris* (Melo 2003, Tavares *et al.*, 2007). Essa possível separação das espécies por biomas implica que cada uma delas deva ser considerada em separado, dentro de suas áreas de distribuição e seus ambientes próprios.

Por meio da análise da seqüência parcial do gene do citocromo B de *M. rufiventris* e *Melipona* sp, pode se perceber que esta última provavelmente represente uma espécie distinta de *M. rufiventris*, apesar de sua distribuição típica

em regiões de cerrado, semelhante à *M. rufiventris*. No entanto, as questões levantadas, como a presença de haplótipos exclusivos em Novo Acordo/TO e São Luís/MA, assim como a formação do clado sp2, composto exclusivamente pela amostra proveniente de São Luís/MA, indicam que outros trabalhos precisam ser realizados a fim de continuar o entendimento a respeito do *status* taxonômico das espécies do complexo *rufiventris*.

Referências

Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16, 37-48

Ewing B., Green P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research* 8, 186–194

Ewing B., Hillier L., Wendl M.C., Green P. 1998 Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8, 175–185

Gordon D., Abajian C., Green P. 1998. Consed: A graphical tool for sequence finishing. *Genome Research* 8, 195–202

Higgins D., Thompson J., Gibson T., Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673–4680

Huelsenbech J.P., Ronquist F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic tree. *Bioinformatics* 17, 754–755

Huelsenbeck J., Crandall K.A. 1997. Phylogeny estimations and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28:437-466

Melo G.A.R. 2003. Notas sobre meliponíneos neotropicais, com a descrição de três novas espécies (Hymenoptera, Apidea). In: Apoidea Neotropica: Homenagem aos noventa anos de Jesus Santiago Moure (Melo G.A.R, Alves-dos-Santos I. Eds). UNESCO, Criciúma pp 85-91

Nylander J.A.A., Ronquist F., Huelsenbeck, J.P., Nieves-Aldrey J.L. 2004. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology* 53, 47–67

Pires C. V. 2007. Comparação entre algumas populações de abelhas do complexo *rufiventris* com base em seqüências do DNA mitocondrial. Monografia (Curso de Biologia) Universidade Federal de Vicosa. Viçosa-MG.

Posada D., Crandall K.A. 1998. Modeltest: Testing the model DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818

Rozas J., Sánchez-DelBarrio J.C., Messeguer X., Rozas R. 2003. DNASP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496–2497

Schetino, M.A.A. 2005. Filogeografia de *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury*: Contribuição para a elucidação do padrão de distribuição geográfico, inferências taxonômicas e preservação. Viçosa, MG: UFV. Monografia (Curso de Biologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Silva F.O., Tavares M.G., Batalha-Filho H., Waldschmidt A.M., Fernandes-Salomão T.M, Campos L.A.O. 2007. Variabilidade genética em populações de abelhas do complexo *rufiventris* (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) no Brasil. 53º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia, SP, Brasil.

Silveira F.A., Melo G.A.R., Almeida E.A.B. 2002. *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*. Fundação Araucária, Minas Gerais, Belo Horizonte.

Silvestre D., Downton M., Arias M.C. 2008. The mitochondrial genome of the stingless bee *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Sequence, gene organization and a unique tRNA translocation event conserved across the tribe Meliponini. *Genetics and Molecular Biology* 31, 2, 451-460 (2008)

Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction *primers*. *Annals of the Entomological Society of America* 87, 651–701

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24,1596–1599

Tavares M.G., Salomão T.M.F., Borges A.A., Campos L.A.O. 2008. Uso de biologia molecular como subsidio para preservação de abelhas: espécies do grupo *rufiventris* (Meliponini) em Minas Gerais. In: *Insetos Sociais: da biologia a aplicação* (Vilela E.F., Santos I.A., Schoereder J.H., Serrao J.E., Campos L.A.O. Eds) pp 128-141

Tavares M.G., Dias L.A.S., Borges A.A., Lopes D.M., Busse A.H.P., Costa R.G., Fernandes-Salomão T.M., Campos L.A.O. 2007. Genetics divergence between population of the stingless bee uruçú amarela (*Melipona rufiventris* group, Hymenoptera, Meliponini): Is there a new *Melipona* species in the Brazilian state of Minas Gerais? *Genetics and Molecular Biology* 30: 667-675

Waldschmidt, A.M., Salomão T.M.F., Barros E.G., Campos L.A.O. 1997. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Brazilian Journal of Genetics* 20: 421-423

Tabela 1: Localidades amostradas de cada espécie, coordenadas (decimais), número de colônias e haplótipo encontrado.

Espécie	Localidade	Longitude	Latitude	Colônias	Haplótipo
<i>Melipona</i>	Araguari – MG	-48,1872	-18,6472	2	H1
<i>rufiventris</i>	Guimarânia – MG	-46,7931	-18,8439	2	H1
	Patos de Minas – MG	-46,5181	-18,5789	2	H1
	Uberaba – MG	-47,9319	-19,7483	2	H1
	Córrego Dantas – MG	-45,9044	-19,8236	1	H2
	Luziânia – GO	-47,9503	-16,2525	5	H3
	Brasília – DF	-47,9297	-15,7797	2	H1
<i>Melipona sp</i>	Brasilândia de Minas - MG	-46,0094	-17,0097	2	H10
	Dom Bosco – MG	-46,2708	-16,6519	2	H10
	Januária – MG	-44,3617	-15,4881	2	H10
	Urucuia – MG	-45,7422	-16,1325	2	H10
	Urbano Santos –MA	-43,4036	-3,2078	3	H5, H6
	São Luís – MA	-44,3028	-2,5297	1	H11
	Barreirinhas- MA	-42,8264	-2,7469	1	H7
	Ubajara-CE	-40,9211	-3,8544	1	H6
	Pacoti – CE	-38,9233	-4,225	1	H6
	Guaramiranga – CE	-38,9331	-4,2633	1	H8
	Novo Acordo – TO	-47,6772	-9,9628	1	H4
	Teresina – PI	-42,8019	-5,0892	6	H6, H9
<i>Melipona</i>	Poté-MG	-41,7864	-17,8067	1	H12
<i>mondury</i>	Rio Vermelho-MG	-43,0092	-18,2936	1	H13

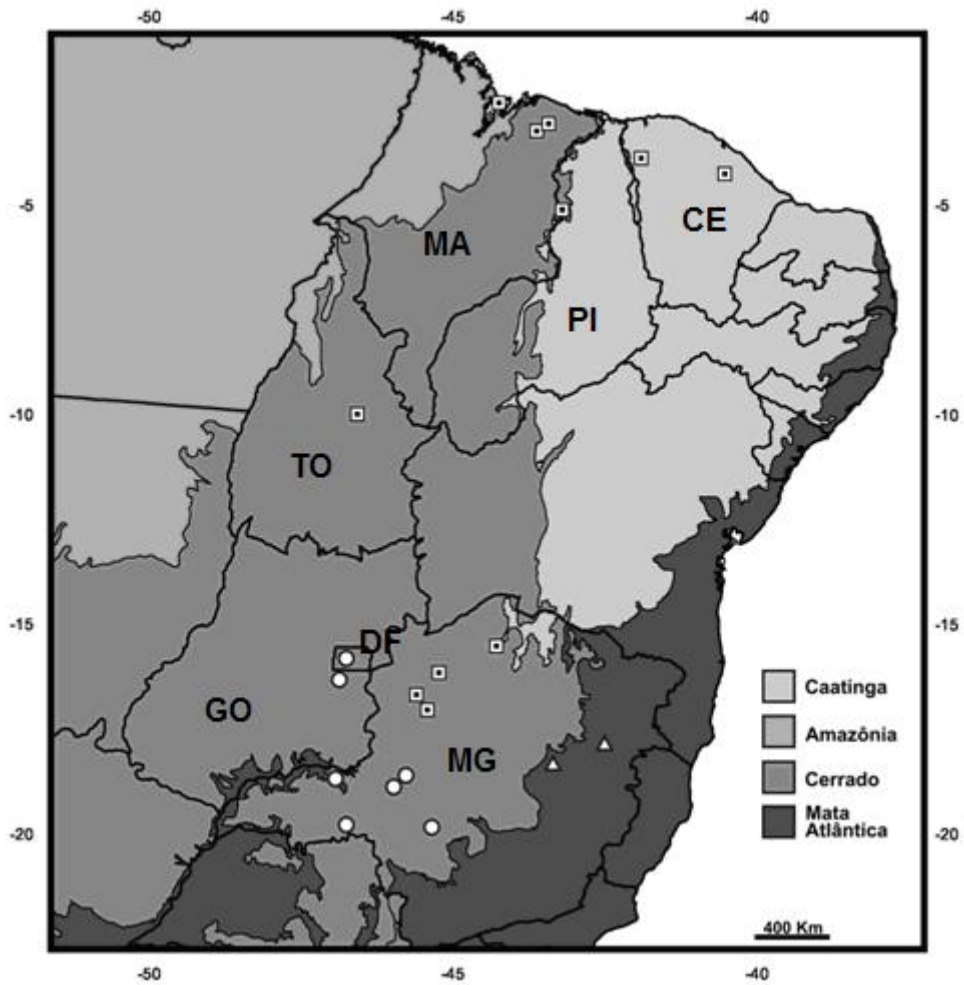


Figura 1: Mapa da distribuição geográfica das 21 localidades de amostragem das abelhas do grupo *rufiventris* analisadas. □ - *Melipona* sp; □ - *M. rufiventris* e □ - *M. mondury*.

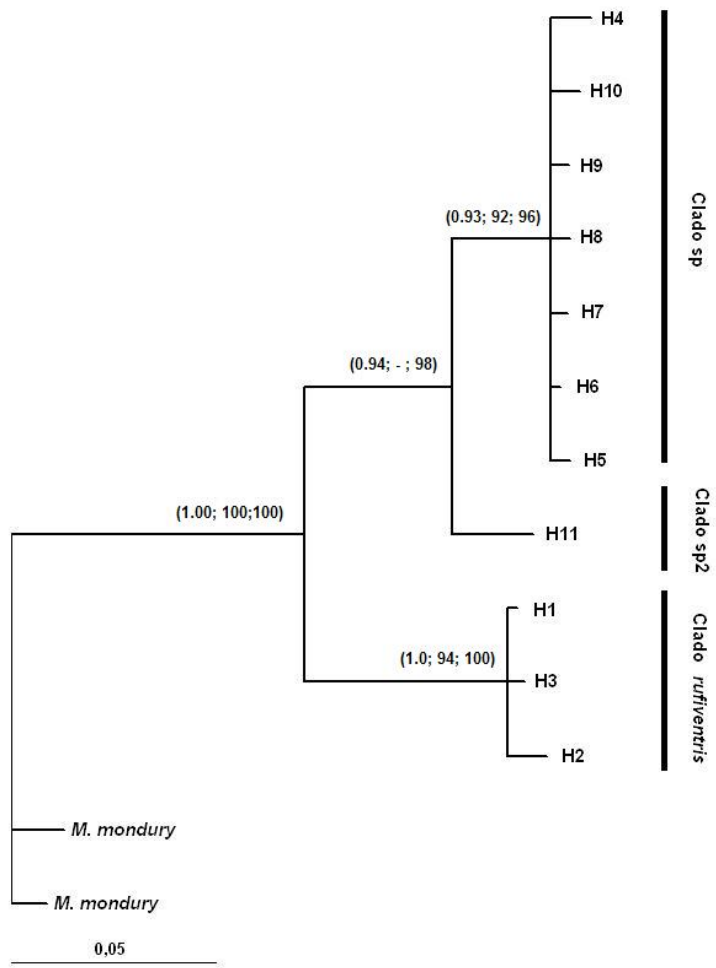


Figura 2. Inferência Bayesiana com o modelo HKY +I para o gene *cytB* em espécies do grupo *rufiventris*. Entre parênteses os valores de probabilidades Bayesiana, bootstrap para Máxima Verossimilhança e *Neighbor-Joining*, respectivamente.

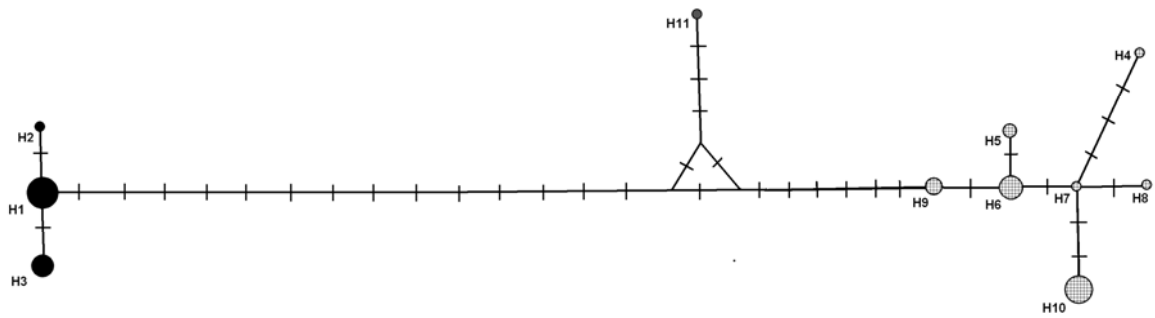


Figura 3. Rede de haplótipos do gene *cytB* nas espécies de *Melipona* analisadas. Na rede de haplótipos cada círculo corresponde a um haplótipo e o seu tamanho é proporcional a sua freqüência, as cores dos círculos representam grupos de haplótipos. A cor preta representa os haplótipos do clado *rufiventris.*, a cor cinza o clado sp2 e o círculo quadriculado o clado sp. Cada traço na linha que conecta os haplótipos representa um passo mutacional.

Capítulo 5

Quantificação do tamanho do genoma de três espécies de abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Meliponini)*

Palavras-chave: citometria de fluxo, tamanho do genoma, Hymenoptera, abelhas sem ferrão

* Artigo escrito de acordo com as normas da Revista Apidologie.

Resumo:

O conhecimento do tamanho do genoma tem importantes implicações em estudos comparativos de diferentes grupos taxonômicos e no planejamento de projetos de sequenciamento. Entretanto, o tamanho do genoma de vários grupos de insetos, incluindo as abelhas sem ferrão, permanece completamente desconhecido, apesar da relevância ecológica das mesmas. O presente estudo padroniza um protocolo reproduzível de citometria de fluxo para estimar o conteúdo de DNA de espécies de abelhas e o aplica nas espécies *Scaptotrigona xantotricha*, *Melipona rufiventris* e *M. mondury*. A metodologia apresentada aqui forneceu histogramas com coeficiente de variação variando de 2,87 a 4,14%. O valor médio do conteúdo de DNA de macho e fêmea de *S. xantotricha* foi 0,42 pg (410,8 Mpb) e 0,44 pg (430,3 Mpb), respectivamente. O tamanho do genoma foi determinado como 0,93 pg (909,5 Mpb) para *M. rufiventris* e 0,95 pg (929,1 Mpb) para *M. mondury*. A variação observada neste estudo, embora de modo preliminar, pode estar relacionada com a variação no conteúdo de heterocromatina nos cromossomos das espécies analisadas. Os dados encontrados no presente estudo são também discutidos em associação com os diferentes níveis de sociabilidade presente em Hymenoptera. Os resultados fornecem o ponto inicial para análises comparativas nos padrões de variações do tamanho do genoma das abelhas sem ferrão e sua relação com a evolução da sociabilidade.

Introdução

O tamanho do genoma haplóide dos insetos varia de 0,09 picogramas (pg) (*Mayetiola destructor* - Diptera) a 16,93 pg (*Podisma pedestris* - Orthoptera), com uma média de 1,36 pg \pm 0,11 (Gregory, 2008). A maioria dos 535 C-valores de insetos até o momento, diz respeito a representantes das ordens Diptera, Coleoptera, Orthoptera e Hemiptera (Gregory, 2008). Especificamente em Hymenoptera, uma das maiores ordens de insetos, com aproximadamente 115.000 espécies descritas (La Salle e Gauld, 1993), o tamanho do genoma foi medido em 50 espécies: quatro abelhas (Jordan e Brosemer 1974; Crain *et al.* 1976; Rasch *et al.* 1985; Petitpierre 1996; Gadau *et al.* 2001), cinco vespas (Rasch *et al.* 1975, 1977, 1985; Johnston *et al.* 2004) e quarenta e uma formigas (Li e Heinz 2000; Johnston *et al.* 2004; Tsutsui *et al.*, 2008).

O conhecimento do tamanho do genoma fornece dados para estudos comparativos em uma variedade de grupos e níveis taxonômicos, para associações filogenéticas e para o planejamento de projetos de sequenciamento. Devido a essa relevância, é surpreendente a ausência de dados relacionados ao tamanho do genoma das abelhas sem ferrão, um grupo de abelhas altamente sociais, particularmente devido a sua abundância, diversidade e importante papel na polinização de matas nativas no Brasil.

Assim, considerando que a determinação do tamanho do genoma de uma espécie facilita o planejamento de posteriores estudos moleculares e fornecem um ponto inicial para estudos comparativos da evolução do genoma em grupos de insetos, o objetivo deste trabalho foi: (1) padronizar um protocolo para obter uma suspensão de núcleos adequada para análises de citometria de fluxo (FCM) em abelhas e (2) medir o conteúdo C de DNA de *Scaptotrigona xantotricha*, *Melipona rufiventris* e *M. mondury*, a fim de realizar análises comparativas do padrão de variação do tamanho do genoma destas abelhas e verificar sua relação com a evolução da sociabilidade neste e em outros grupos de insetos.

Especificamente, escolheu-se *S. xantotricha* porque as colônias desta espécie produzem ovos que irão desenvolver machos haplóides ao longo de todo o ano, fato que a torna ideal para ser utilizada como padrão interno na FCM. *M. rufiventris* e *M. mondury*, por outro lado, foram escolhidas porque até recentemente elas eram consideradas como uma única espécie nos estado de

Minas Gerais (Melo, 2003), além de constituírem material biológico de estudo de nosso laboratório.

Materiais e Métodos

Material biológico

Amostras de larvas de macho e fêmeas de *Scaptotrigona xantotricha* e fêmeas de *Melipona rufiventris* e *M. mondury* foram coletadas de colônias das regiões de Viçosa/MG, Guimarães/MG e Itamarandiba/MG, respectivamente. As análises FCM foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Citometria, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Delineamento experimental

A fim de determinar um padrão interno apropriado para medidas de FCM de abelhas e para evitar problemas de linearidade, inicialmente o valor médio do conteúdo C de DNA do macho haplóide de *S. xantotricha* foi medido usando uma fêmea adulta selvagem de *Drosophila melanogaster* (padrão interno – C = 0,18 pg – Adams *et al.* 2000; Bennett *et al.* 2003). O conteúdo de DNA das outras espécies de abelhas foi medido utilizando-se os padrões internos mostrados na Tabela 1.

Análises de Citometria de Fluxo

As suspensões de núcleos foram preparadas como descrita por Bennett *et al.* (2003) e Johnston *et al.* (2004), com algumas modificações. O gânglio cerebral do padrão e da amostra foram retirados em solução fisiológica (Arboreto[®]) e esmagados no mesmo recipiente 10 vezes com um pistilo em um “*tissue grinder*” (Kontes Glass Company[®]) com 100 µL do tampão de lise OTTO-I (Otto, 1990) contendo ácido cítrico 0,1 M (Merck KGaA[®]), Tween 20 0,5% (Merck KGaA[®]) e 50 µg mL⁻¹ RNase (Sigma-Aldrich[®]), pH = 2,3. A suspensão foi completada para 1,0

mL com o mesmo tampão, filtrada em filtro de nylon (Partec GmbH[®]) e centrifugada a 100 g em tubos do tipo Eppendorf por 5 minutos.

O *pellet* foi então incubado por 10 min em 100 µL do tampão de lise OTTO-I e corado com 1,5 mL da solução OTTO-I:OTTO-II (1:2) (Loureiro *et al.* 2006a, b) acrescida com 75 µM de iodeto de propídio (PI) (Sigma[®]) e 50 µg mL⁻¹ de RNase (Sigma-Aldrich[®]), pH = 7.8. A suspensão nuclear foi, novamente, filtrada em filtro de nylon (Partec GmbH[®]) e mantida no escuro por 5 – 40 minutos.

A suspensão foi analisada com citômetro de fluxo Partec PAS[®] (Partec[®] GmbH, Munster, Germany) equipado com Laser (488 nm). A fluorescência PI emitida a partir dos núcleos foi coletada através de filtro RG 610 nm e convertido para 1024 canais. O software FlowMax[®] (Partec[®]) foi usado para análise dos dados. O pico do núcleo padrão foi ajustado para o canal 100 e mais de 10.000 núcleos eram analisados em três medidas independentes.

O tamanho médio do genoma de cada amostra foi medida de acordo com a fórmula adaptada de Doležel e Bartos (2005):

$$\text{Conteúdo de DNA 2C da amostra (pg)} = \frac{\text{Pico } G_0/G_1 \text{ médio da amostra} \times \text{Conteúdo de DNA 2C do padrão}}{\text{Pico } G_0/G_1 \text{ médio do padrão}}$$

Para os valores dos machos, o conteúdo de DNA 2C da amostra, na fórmula acima, foi substituído por 1C. O tamanho do genoma médio será apresentado aqui como valores C em picogramas (pg) e mega pares de bases (1 pg = 978 Mbp) (Doležel *et al.* 2003).

Resultados

Neste estudo, o tamanho do genoma de *S. xantotricha*, *M. mondury* e *M. rufiventris* foi medido por FCM. As análises das suspensões de núcleos corados com PI geraram histogramas com picos correspondentes ao conteúdo de DNA relativo médio de núcleos G_0/G_1 de *S. xantotricha* (macho e fêmea), *M. rufiventris* (fêmea), *M. mondury* (fêmea) e do padrão interno comparativo (Figura 1). Os

histogramas mostraram bons níveis de resolução (Fig. 1 a – e) e coeficientes de variação (CV) de 2,87-4,14%.

Os valores médios do tamanho do genoma do macho e fêmea de *S. xantotricha* foram 410,8 Mbp (C = 0,42 pg) e 430,3 Mbp (C = 0,44 pg), respectivamente (Fig. 1 a – b, Tabela 2). As análises FCM mostraram, portanto, que a fêmea de *S. xantotricha* possui 19,5 Mbp de DNA a mais que o macho.

As análises de FCM também mostraram que o tamanho médio do genoma de *M. rufiventris* e *M. mondury* foi 909,5 Mbp (C = 0,93 pg) e 929,1 Mbp (C = 0,95 pg), respectivamente (Fig. 1 c – d, Tabela 2). A similaridade do tamanho dos dois genomas pode ser confirmada no histograma da suspensão de núcleos de *M. rufiventris* e *M. mondury*, no qual os picos G₀/G₁ das duas espécies não foram distinguidos (Fig. 1 e).

Discussão

Os procedimentos de preparo de núcleos empregados neste estudo produziram uma suspensão com poucos artefatos, tais como *debris* citoplasmáticos e agregados nucleares. Esmagamento em um “*tissue grinder*” foi também aplicado por Bennett *et al.* (2003) e Johnston *et al.* (2004), mas esses autores utilizaram o tampão Galbraith (Galbraith *et al.* 1983) para obter as suspensões de núcleos. Neste estudo, os tampões OTTO (Otto 1990) foram aplicados para o mesmo propósito.

Optou-se por este tampão porque, na rotina de nosso laboratório, histogramas com alta resolução e baixos CVs têm sido obtidos como resultado do uso do mesmo, como confirmado pelos resultados deste estudo. Doležel e Bartoš (2005) e Loureiro *et al.* (2006a, b) recomendaram os tampões OTTO, porque o ácido cítrico (OTTO-I) evita diferenças na intensidade de coloração dos núcleos. Além disso, em concordância com Loureiro *et al.* (2006a, b), esses tampões fornecem melhores resultados em espécies com baixo conteúdo de DNA, como as abelhas.

Aron *et al.* (2003) utilizou o procedimento de “*chopping*” e solução tampão detergente-tripsina (Vindelov *et al.* 1983) para preparar núcleos de larvas da

formiga *Linepithema humile*. Os autores obtiveram histogramas FCM com CVs de 4,2 a 7,3%. No presente estudo, o CV mais alto foi 4,14%, valor que é considerado aceitável em medidas de FCM (Galbraith *et al.*, 2002) e, indica que os métodos e tampões utilizados forneceram adequadas suspensões de núcleos.

Adicionalmente, a metodologia desenvolvida aqui discriminou núcleos de machos haplóides e fêmeas diplóides de *S. xantotricha*, permitindo a utilização desta espécie, ao invés de organismos distantemente relacionados, como padrão interno para análises de FCM de abelhas.

As análises de FCM também demonstraram que o tamanho do genoma de *M. rufiventris* e *M. mondury* diferiram por apenas 19.6 Mbp, mas foram ~ 2.1-vezes maior que o de *S. xantotricha* (Fig. 1 c – d, Tabela 2). Os outros poucos Apidae estudados até o momento também mostraram tamanho do genoma menores que aqueles de *M. rufiventris* e *M. mondury*. Por exemplo, *Apis cerana*, *A. mellifera* e *Bombus terrestris* possuem o valor-C estimado de 185,8 Mbp (0,19 pg) (Jordan e Brosemer 1974), 262 Mbp (0,268 pg) (Weinstock *et al.*, 2006) e 625 Mbp (0,639 pg) (Wilfert *et al.*, 2006). O tamanho do genoma dessas duas espécies de *Melipona* é ainda maior que o tamanho médio estimado para as espécies de himenópteros (352 Mbp; C = 0,36 pg – Gregory, 2008) analisadas até o momento.

Um mecanismo que poderia ter promovido o aumento do conteúdo de DNA em *M. rufiventris* e *M. mondury* é a maior quantidade de heterocromatina nos cromossomos destas espécies (Lopes *et al.* 2008) comparada à de *S. xantotricha* (Rocha *et al.* 2003). Estudos citogenéticos, com base no conteúdo de heterocromatina, possibilitaram uma divisão das espécies de *Melipona* em dois grupos. O Grupo I compreende espécies com baixo conteúdo de heterocromatina (*M. bicolor*, *M. quadrisfasciata*, *M. asilvai*, *M. marginata* e *M. subnitida*), enquanto que as espécies do Grupo II (*M. capixaba*, *M. compressipes*, *M. crinita*, *M. seminigra*, *M. captiosa*, *M. scutellaris*, *M. rufiventris* e *M. mondury*) apresentam alto conteúdo de heterocromatina (Rocha e Pompolo, 1998; 2002, Lopes *et al.*, 2008).

Neste contexto, a alta proporção de heterocromatina nos cromossomos das espécies do Grupo II poderia explicar as diferenças no tamanho do genoma evidenciado neste estudo. Boulesteix *et al.* (2006) também mencionaram que a grande quantidade de heterocromatina presente nos cromossomos de *Drosophila*

orena, poderia ser o principal fator responsável pelo grande aumento no tamanho do genoma desta espécie, em comparação com as demais espécies do subgrupo *Drosophila melanogaster*.

O aumento no tamanho do genoma, no entanto, também tem sido associado com a presença de elementos transponíveis (TEs) (SanMiguel e Bennetzen, 1998; Vieira *et al.*, 2002), sequências repetitivas (Uozu *et al.*, 1997; Ullmann *et al.*, 2005), introns (Moriyama *et al.*, 1998) e microssatélites (Warner e Noor, 2000).

A variação entre o tamanho do genoma das espécies analisadas aqui pode, então, refletir diferenças na estrutura genômica das mesmas. Contudo, nenhuma extrapolação deve ser feita sobre a importância evolutiva das diferenças observadas desde que nós estimamos o tamanho do genoma para somente três abelhas sem ferrão. Assim, somente uma análise mais cuidadosa de características como o número de TEs, tamanho e número de íntrons e microssatélites poderia elucidar os mecanismos específicos pelos quais o genoma destas espécies expandiram ou contraíram. Esses estudos deverão ajudar a entender a ligação entre estrutura da cromatina, tamanho e evolução do genoma nas abelhas sem ferrão.

Apesar do elevado tamanho do genoma de *M. rufiventris* e *M. mondury* em comparação ao tamanho do genoma de *S. xanthotricha* e outras espécies de Hymenoptera, estas espécies ainda compartilham o padrão verificado em organismos que sofrem metamorfose completa, apresentando genomas que são menores que $C = 2pg$ (Gregory, 2002, 2005). Logo, nossos dados representam um passo significativo em direção a um melhor entendimento do genoma das abelhas sem ferrão.

Outro ponto interessante relacionado com o valor C é como o mesmo genoma produz a diversidade morfológica, comportamental e social verificada nas abelhas e outros organismos sociais. Koshikawa *et al.* (2008), por exemplo, determinaram o tamanho do genoma de cupins e baratas e analisaram a relação deste com a sociabilidade, levantando a possibilidade de associação entre a evolução social e a redução no tamanho do genoma destes organismos.

Na ordem Hymenoptera, no entanto, o conteúdo de DNA de espécies não parece estar relacionado como seu espectro de sociabilidade. O tamanho do genoma de espécies altamente eusociais, por exemplo, varia de 185 Mbp (*Apis*

cerana; Jordan e Brosemer, 1974) a 920,1 Mbp (*M. mondury*, neste trabalho), enquanto o valor C estimado para duas espécies de Hymenoptera primitivamente eusociais, *Bombus terrestris* e *Polistes dominulus* foi 625 Mbp (Gadau et al., 2001) e 303,1 Mbp (Johnston et al., 2004), respectivamente. Por outro lado, vespas parasíticas como *Trichogramma brassicae* (244,5 Mbp, Johnston et al., 2004) tem um tamanho do genoma similar ao de *Apis mellifera* (262 Mbp, Weinstock et al., 2006), uma espécie altamente eusocial.

Esta falta de associação, entretanto, não é surpreendente considerando o pequeno número de espécies de himenópteros que tem seu conteúdo de DNA determinado (Gregory, 2008). Assim, como o tamanho do genoma influencia diretamente o custo e dificuldade dos projetos de sequenciamento, aumentar o conhecimento sobre o tamanho do genoma de abelhas pode auxiliar na escolha de organismos para sequenciamento parcial ou completo, o que, por sua vez, auxiliará no entendimento da evolução do genoma e sociabilidade na ordem Hymenoptera.

Assim, estudos com insetos sociais de diferentes níveis de sociabilidade poderão ajudar no entendimento de como sistemas sociais complexos e altamente derivados evoluíram a partir de sistemas simples e ancestrais. Esta área de pesquisa, tão pouco estudada, vai se tornando mais acessível conforme técnicas moleculares facilitam o estudo do genoma de diversos organismos (Robinson, 1999, 2002; Evans e Wheeler, 2001). Um bom exemplo são os esforços direcionados para o sequenciamento do genoma de *Apis mellifera* (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006), o qual poderá contribuir para o conhecimento de diversos aspectos relacionados à sociabilidade desta espécie.

Em resumo, nossos dados sugerem que esforços adicionais deverão ser dirigidos no sentido de estudar o genoma de outras espécies de *Melipona* do Grupo I e II (Rocha e Pompolo, 1998; 2002) e outros gêneros e subfamílias de abelhas sem ferrão, a fim de obter dados que possam contribuir para o entendimento dos processos envolvidos na expansão e contração de seus genomas. Além disso, para um claro entendimento das alterações genômicas que ocorreram na transição entre os diferentes estilos de vida em Hymenoptera, será necessário comparar os genomas de organismos de famílias e subfamílias de diferentes categorias sociais (solitários, primitivos e altamente sociais).

Agradecimentos:

Os autores agradecem a FAPEMIG pelo apoio financeiro dado aos projetos EDT 245/05 e CBB APQ-0858-3.12/07 e a CAPES pela bolsa cedida a D.M. Lopes.

Referências:

Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P. G., Scherer S.E., Li P.W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George R. A., Lewis S. E., Richards S., Ashburner, M., Henderson S.N., Sutton G. G., Wortman J. R., Yandell M. D., Zhang Q., Chen L. X., Brandon R. C., Rogers Y. C., Blazej R. G., Champe M., Pfeiffer B. D., Wan K. H., Doyle C., Baxter E. G., Helt G., Nelson C. R., Miklos G. L. G., Abril J. F., Agbayani A., An H., Andrews-Pfannkoch C., Baldwin D., Ballew R. M., Basu A., Baxendale J., Bayraktaroglu L., Beasley E. M., Beeson K. Y., Benos P. V., Berman B. P., Bhandari D., Bolshakov S., Borkova D., Botchan M. R., Bouck J., Brokstein P., Brottier P., Burtis K. C., Busam D. A., Butler H., Cadieu E., Center A., Chandra I., Cherry J. M., Cawley S., Dahlke C., Davenport L. B., Davies P., Pablos B., Delcher A., Deng Z., Mays A. D., Dew I., Dietz S. M., Dodson K., Doup L. E., Downes M., Shannon Dugan-Rocha S., Dunkov B. C., Dunn P., Durbin K. J., Evangelista C. C., Ferraz C., Ferriera S., Fleischmann W., Fosler C., Gabrielian A. E., Garg N. S., Gelbart W. M., Glasser K., Glodek A., Gong F., Gorrell J. H., Gu Z., Guan P., Harris M., Harris N. L., Harvey D., Heiman T. J., Hernandez J. R., Houck J., Hostin D., Houston K. A., Howland T. J., Wei M., Ibegwam C., Jalali M., Kalush F., Karpen G. H., Ke Z., Kennison J. A., Ketchum K. A., Kimmel B. E., Kodira C. D., Kraft C., Kravitz S., Kulp D., Lai Z., Lasko P., Lei Y., Levitsky A. A., Li J., Li Z., Liang Y., Lin X., Liu X., Mattei B., McIntosh T. C., McLeod M. P., McPherson D., Merkulov G., Milshina, N. V., Mobarry C., Morris J., Moshreβ A., Mount S. M., Moy M., Murphy B., Murphy L., Muzny D. M., Nelson D. L., Nelson D. R., Nelson K. A., Nixon K., Nusskern D. R., Pacleb J. M., Palazzolo M., Pittman G. S., Pan S., Pollard J., Puri V., Reese M. G., Reinert K., Remington K., Saunders R. D. C., Scheeler F., Shen H., Shue B. C., Siden-Kiamos I., Simpson M., Skupski M. P., Smith T., Spier E., Spradling A.

C., Stapleton M., Strong R., Sun E., Svirskas R., Tector C., Turner R., Venter E., Wang A. H., Wang X., Wang Z., Wassarman D. A., Weinstock G. M., Weissenbach J., Williams S. M., Woodage T., Worley K. C., Wu D., Yang S., Yao Q. A., Ye J., Ru-Fang Yeh, Zaveri J. S., Zhan M., Zhang G., Zhao Q., Zheng L., Zheng X. H., Zhong F. N., Zhong W., Zhou X., Zhu S., Zhu X., Smith H. O., Gibbs R. A., Myers E. W., Rubin G. M., Venter J. C. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster* The genome sequence of *Drosophila melanogaster*, Science 287, 2185-2195.

Arnosti D.N. (2003) Analysis and function of transcriptional regulatory elements: Insights from *Drosophila*, Annu. Rev. Entomol. 48, 579-602.

Aron S., de Menten L., Van Bockstaele D.R. (2003) Brood sex ratio determination by flow cytometry in ants, Mol. Ecol. Notes 3, 471-475.

Bennett M.D., Leitch I.J., Price H.J., Johnston J.S. (2003) Comparisons with *Caenorhabditis* (~100Mb) and *Drosophila* (~175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be ~157 Mb and thus ~25% larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of ~125 Mb, Ann. Botany 91, 547-557.

Boulesteix M., Weiss M., Biémont C. (2006) Differences in genome size between closely related species: the *Drosophila melanogaster* species subgroup, Mol. Biol. Evol. 23, 162-167.

Campos, L.A.O. (1998) *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836, in: Machado, A.B.M., Fonseca G.A.B., Machado R.B., Aguiar L.M., Lins L.V. (Eds), Livro Vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais, Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas.

Crain W.R., Davidson E.H., Britten R.J. (1976) Contrasting patterns of DNA sequence arrangement in *Apis mellifera* (honeybee) and *Musca domestica* (housefly), Chromosoma 59, 1-12.

Dolezel J., Bartos J. (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size, *Ann. Botany* 95, 99-110.

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

Evans J.D., Wheeler D.E. (2001) Gene expression and the evolution of insect polyphenisms, *Bioessays* 23, 62-68.

Gadau J., Gerloff C.U., Krügers N., Chan H., Schmid-Hempel P., Wille A., Page R.E.J. (2001) A linkage analysis of sex determination in *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae), *Heredity* 87, 234-242.

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

Galbraith D.W., Lambert G.M., Macas J., Dolezel J. (2002) Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants, in: Robinson J.P., Darzynkiewicz Z., Dean P.N., Dressler L.G., Rabinovitch P.S., Stewart C.V., Tanke H.J., Wheelless L.L. (Eds), *Current protocols in cytometry*, John Wiley & Sons, New York, pp. 761-862.

Gregory T.R. (2002) Genome size and developmental complexity, *Genetica*, 115, 131-146.

Gregory T.R. (2008) Animal Genome Size Database, [online] <http://www.genomesize.com> (accessed on 20 May 2008).

Gregory, T.R., 2005b. The C-value enigma in plants and animals: a review of parallels and an appeal for partnership, *Ann. Bot.* 95, 133–146.

Johnston J.S., Ross L.D., Beani L., Hughes D.P., Kathirithamby J. (2004) Tiny genomes and endoreduplication in Strepsiptera, *Insect Mol. Biol.* 13, 581-585.

Jordan J.R., Brosemer R.W. (1974) Characterization of DNA from three different bee species, *J. Insect Physiol.* 20, 2513-2520.

Koshikawa S., Miyazaki S., Cornette R., Matsumoto T., Miura T. (2008) Genome size of termites (Insecta, Dictyoptera, Isoptera) and wood roaches (Insecta, Dictyoptera, Cryptocercidae), *Naturwissenschaften* : _____ in press [doi: 10.1007/s00114-008-0395-7] (online)
<http://www.springerlink.com/content/h1411km76170467v/fulltext.pdf>.

La Salle, J., Gauld, I.D. (1993) *Hymenoptera and Biodiversity*, Leaper and Gard Ltda, Bristol.

Li J., Heinz K.M. (2000) Genome complexity and organization in the red imported fire ant *Solenopsis invicta* Buren, *Genet. Res. Camb.* 75, 129-135.

Lopes D.M., Pompolo S.G., Tavares M.G., Campos L.A.O. (2008) Cytogenetic characterization of *Melipona rufiventris* Lepeletier 1836 and *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera: Apidae) by C banding and fluorochromes, *Genet. Mol. Biol.* 31, 49-52.

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

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

Melo G.A.R. (2003) Notas sobre meliponíneos neotropicais (Hymenoptera, Apidae), com a descrição de três novas espécies, in: Melo G.A.R., Alves-dos-Santos I. (Eds), *Apoidea Neotropica. Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure*, UNESCO, Santa Catarina, Brasil, p. 85-92.

Moriyama E.N., Petrov D.A., Hartl D.L. (1998) Genome size and intron size in *Drosophila*, *Mol. Biol. Evol.* 15, 770-773.

Mulligan P.K., Rasch E.M. (1980) The determination of genome size in male and female germ cells of *Drosophila melanogaster* by DNA-Feulgen cytophotometry, *Histochemistry* 66, 11-18.

Otto F.J. (1990) DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA, in: Darzynkiewicz Z., Crissman H.A., Robinson J.P. (Eds), *Methods in Cell Biology*, vol 33, Academic Press, San Diego, pp.105-110.

Petitpierre E. (1996) Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the coleopteran, *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 25, 115-134.

Rasch E.L., Cassidy J.D., King R. (1977) Evidence for dosage compensation in parthenogenetic Hymenoptera, *Chromosoma* 59: 323-340.

Rasch E.M. (1985) DNA "standards" and the range of accurate DNA estimates by Feulgen absorption microspectrophotometry, in: Cowden R.R., Harrison S.H., (Eds), *Advances in Microscopy. Progress in Clinical and Biological Research*, vol 196, New York, pp. 137-166.

Rasch E.M., Barr H.J. e Rasch R.W. (1971) DNA content of sperm of *Drosophila melanogaster*, *Chromosoma* 33: 1-18.

Rasch E.M., Cassidy J.D., King R.C. (1975) Somatic cell DNA content in haploid, diploid, and triploid adults of *Mormoniella vitripennis*, *Journal of Cell Biology* 67, 353A.

Robinson G.E. (1999) Integrative animal behavior and sociogenomics, *Trends Ecol.Evol.* 14, 202-205.

- Robinson G.E. (2002) Sociogenomics takes flight, *Science* 297, 204-205.
- Rocha M.P., Pompolo S.G. (1998) Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae), *Gen. Mol. Biol.* 21, 41-45.
- Rocha M.P., Pompolo S.G., Campos L.A.O. (2003) Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae), in: Melo G.A.R., Santos I.A. (Eds), *Apoidea Neotropica. Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure*, UNESCO, Santa Catarina, Brasil, pp 311-320.
- Rocha M.P., Pompolo S.G., Dergam J.A., Fernandes A., Campos L.A.O. (2002) DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera Meliponini), *Hereditas* 136, 19-27.
- SanMiguel P., Gaut B.S., Tikhonov A., Nakajima Y., Bennetzen J.L. (1998) The paleontology of intergene retrotransposons of maize, *Nature Genetics*, 20, 43-45.
- Tsutsui N.D., Suarez A.V., Spagna J.C., Johnston J.S. (2008) The evolution of genome size in ants, *BMC Evolutionary Biology* 8(64), 1-9.
- Ullmann A.J., Lima C.M.R., Guerrerot F.D., Piesman J., Black W.C. (2005) Genome size and organization in the blacklegged tick, *Ixodes scapularis*, and the Southern cattle tick, *Boophilus microplus*, *Insect Mol. Biol.* 14, 217–222.
- Uozu S., Ikehashi H., Ohmido N., Ohtsubo H., Ohtsubo E., Fukui K. (1997) Repetitive sequences: cause for variation in genome size and chromosome morphology in the genus *Oryza*, *Plant Mol. Biol.* 35, 791–799.
- Vieira C., Nardon C., Arpin C., Lepetit D., Biemont C. (2002) Evolution of genome size in *Drosophila*. Is the invader's genome being invaded by transposable elements? *Mol. Biol. Evol.* 19, 1154–1161.

Vindelov L.L., Christensen I.J., Keiding N., Nissen N.I. (1983) A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis, *Cytometry* 3, 323-327.

Warner R.D., Noor M.A. (2000) High frequency of microsatellites in *Drosophila pseudoobscura*, *Genes Gent. Syst.* 75,115-118.

Weinstock G.M., Robinson G.E., Gibbs R.A., Worley K.C., Evans J.D., Maleszka R., Robertson H.M., Weaver D.B., Beye M., Bork P., Elsik C.G., Hartfelder K., Hunt G.J., Zdobnov E.M., Amdam G.V., Bitondi M.M.G., Collins A.M., Cristino A.S., Lattorff H.M.G., Lobo C.H., Moritz R.F.A., Nunes F.M.F., Page R.E., Simoes Z.L.P., Wheeler D., Carninci P., Fukuda S., Hayashizaki Y., Kai C., Kawai J., Sakazume N., Sasaki D., Tagami M., Albert S., Baggerman G., Beggs K.T., Bloch G., Cazzamali G., Cohen M., Drapeau M.D., Eisenhardt D., Emore C., Ewing M.A., Fahrbach S.E., Foret S., Grimmelikhuijzen C.J.P., Hauser F., Hummon A.B., Huybrechts J., Jones A.K., Kadowaki T., Kaplan N., Kucharski R., Lebouille G., Linial M., Littleton J.T., Mercer A.R., Richmond T.A., Rodriguez-Zas S.L., Rubin E.B., Sattelle D.B., Schlipalius D., Schoofs L., Shemesh Y., Sweedler J.V., Velarde R., Verleyen P., Vierstraete E., Williamson M.R., Ament S.A., Brown S.J., Corona M., Dearden P.K., Dunn W.A., Elekonich M.M., Fujiyuki T., Gattermeier I., Gempe T., Hasselmann M., Kadowaki T., Kage E., Kamikouchi A., Kubo T., Kucharski R., Kunieda T., Lorenzen M., Milshina N.V., Morioka M., Ohashi K., Overbeek R., Ross C.A., Schioett M., Shippy T., Takeuchi H., Toth A.L., Willis J.H., Wilson M.J., Gordon K.H.J., Letunic I., Hackett K., Peterson J., Solignac M., Agarwala R., Cornuet J.M., Monnerot M., Mougel F., Reese J.T., Vautrin D., Gillespie J.J., Cannone J.J., Gutell R.R., Johnston J.S., Eisen M.B., Iyer V.N., Iyer V., Kosarev P., Mackey A.J., Solovyev V., Souvorov A., Aronstein K.A., Bilikova K., Chen Y.P., Clark A.G., Decanini L.I., Gelbart W.M., Hetru C., Hultmark D., Imler J.L., Jiang H.B., Kanost M., Kimura K., Lazzaro B.P., Lopez D.L., Simuth J., Thompson G.J., Zou Z., De Jong P., Sodergren E., Csuros M., Milosavljevic A., Osoegawa K., Richards S., Shu C.L., Duret L., Elhaik E., Graur D., Anzola J.M., Campbell K.S., Childs K.L., Collinge D., Crosby M.A., Dickens C.M., Grametes

L.S., Grozinger C.M., Jones P.L., Jorda M., Ling X., Matthews B.B., Miller J., Mizzen C., Peinado M.A., Reid J.G., Russo S.M., Schroeder A.J., St Pierre S.E., Wang Y., Zhou P.L., Jiang H.Y., Kitts P., Ruef B., Venkatraman A., Zhang L., Aquino-Perez G., Whitfield C.W., Behura S.K., Berlocher S.H., Sheppard W.S., Smith D.R., Suarez A.V., Tsutsui N.D., Wei X.H., Wheeler D., Havlak P., Li B.S., Liu Y., Sodergren E., Jolivet A., Lee S., Nazareth L.V., Pu L.L., Thorn R., Stolc V., Newman T., Samanta M., Tongprasit W.A., Claudianos C., Berenbaum M.R., Biswas S., de Graaf D.C., Feyereisen R., Johnson R.M., Oakeshott J.G., Ranson H., Schuler M.A., Muzny D., Chacko J., Davis C., Dinh H., Gill R. (2006) Consort HGS: Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*, Nature, 443, 931-949.

Wilfert L., Gadau J., Schmid-Hempel P. (2006) A core linkage map of the bumblebee *Bombus terrestris*, Genome 49(10), 1215-1226.

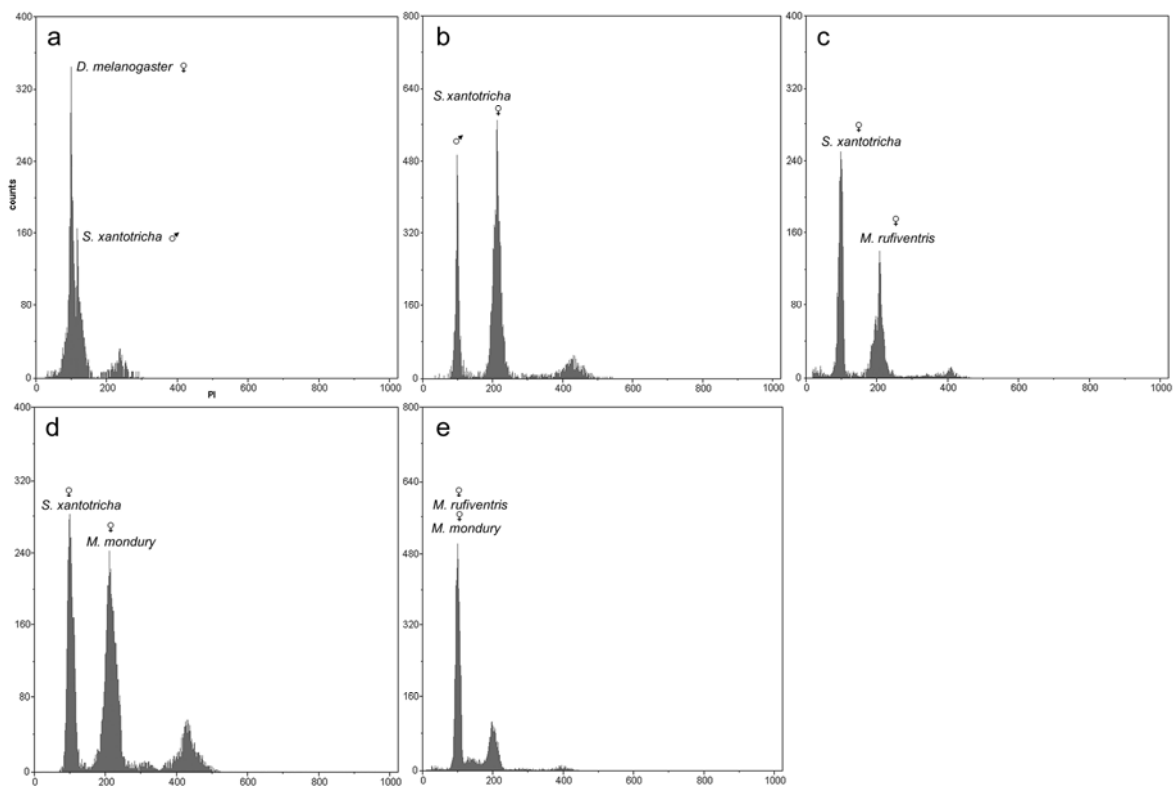
Tabela 1 – Padrão interno utilizado nas medições FCM de núcleos de *S. xantotricha*, *M. rufiventris* e *M. mondury*. O planejamento experimental foi utilizado a fim de evitar problemas de linearidade.

Espécie	Espécie-Padrão Interno
Macho <i>S. xantotricha</i>	Fêmea <i>D. melanogaster</i>
Fêmea <i>S. xantotricha</i>	Macho <i>S. xantotricha</i>
Fêmea <i>M. rufiventris</i>	Fêmea <i>S. xantotricha</i>
Fêmea <i>M. mondury</i>	Fêmea <i>S. xantotricha</i>

Tabela 2 – Estimativa do tamanho do genoma das espécies *S. xantotricha*, *M. rufiventris* e *M. mondury*. O tamanho do genoma (pg e Mbp) foi demonstrado para cada espécie.

Espécies	Tamanho médio do genoma (1C) (pg e Mbp)	Tamanho médio do genoma /núcleo (G ₁) (Mbp)
Macho <i>S. xantotricha</i>	0.42 - 410.8	410.8
Fêmea <i>S. xantotricha</i>	0.44 - 430.3	860.6
Fêmea <i>M. rufiventris</i>	0.93 - 909.5	1819.0
Fêmea <i>M. mondury</i>	0.95 - 929.1	1858.2

Figura 1 – Histogramas do tamanho do genoma de *S. xantotricha*, *M. rufiventris* e *M. mondury* através da análise de suspensões de núcleos do gânglio cerebral, corados com PI. a) Fêmea *D. melanogaster* (padrão interno 2C = 0.36 pg, canal 100) e macho *S. xantotricha* (1C = 0.42 pg, canal 117). b) Macho *S. xantotricha* (1C = 0.42 pg, canal 100) e fêmea *S. xantotricha* (2C = 0.88 pg, canal 210). c) Fêmea *S. xantotricha* (2C = 0.88 pg, canal 100) e fêmea *M. rufiventris* (2C = 1.85 pg, canal 210). d) Fêmea *S. xantotricha* (2C = 0.88 pg, canal 100) e fêmea *M. mondury* (2C = 1.89 pg, canal 215). e) Fêmea *M. mondury* (canal 100) e fêmea *M. rufiventris* (canal 100).



Conclusões gerais

- A partir da técnica de ISSR 10 *primers* microssatélites foram obtidos para *M. rufiventris* e 11 para *M. mondury*. Vários desses locos foram polimórficos em outras espécies de meliponíneos, demonstrando que os mesmos podem ser utilizados em estudos com outras espécies de abelhas.
- A comparação entre *primers* heterólogos e específicos demonstrou um aumento no nível de polimorfismo tanto no que se refere ao número de locos polimórficos quanto à quantidade de heterozigotos observada.
- A análise de seqüências do gene citocromo B de abelhas do complexo *rufiventris* permitiu a separação em três grupos, os quais podem estar relacionados com os biomas onde são encontrados. Os resultados obtidos confirmam a existência da espécie *Melipona* sp no noroeste mineiro, Maranhão, Piauí, Ceará e Tocantins. Além disso, sugere a existência de uma espécie diferente no estado do Maranhão, indicando a necessidade de outros trabalhos que ajudem esclarecer o *status* taxonômico das espécies do complexo *rufiventris*.
- A metodologia apresentada aqui para análises de citometria de fluxo forneceu histogramas com baixos valores de coeficiente de variação indicando a eficiência do protocolo estabelecido. O conteúdo de DNA foi semelhante para as duas espécies de *Melipona* não sendo possível separá-las, enquanto apresentou grande diferença em relação ao tamanho do genoma de *Scaptotrigona xantotricha*. Esses dados sugerem que esforços adicionais deverão ser dirigidos no sentido de estudar o genoma de outras espécies de abelhas, a fim de verificar os processos envolvidos na expansão e contração de seus genomas.