

Ministério da Ciência e Tecnologia  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia  
Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia  
Evolutiva

**Identificação molecular de abelhas sem ferrão da  
Amazônia**

**Mariana Trindade de Souza**

Manaus, Amazonas

Maio, 2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Mariana Trindade de Souza**

**Identificação molecular de abelhas sem ferrão da  
Amazônia**

Orientadora: Dra. Gislene Almeida Carvalho-Zilse

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus, Amazonas

Maio, 2010

## Ficha Catalográfica

S729

Souza, Mariana Trindade de  
Identificação molecular de abelhas sem ferrão da Amazônia /  
Mariana Trindade de Souza. --- Manaus : [s.n.], 2010.  
xiii, 57 f. : il. color.

Dissertação (mestrado)-- INPA, Manaus, 2010  
Orientador : Gislene Almeida Carvalho-Zilse  
Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

1. Meliponini. 2. Abelhas sem ferrão. 3. DNA mitocondrial.  
4. Biologia molecular. I. Título.

CDD 19. ed. 595.7990415

### **Sinopse:**

Comparou-se a eficiência dos genes mitocondriais 16S rRNA e COI em diferenciar nove espécies de abelhas sem ferrão amazônicas pela técnica SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) de detecção de polimorfismo de fita simples de DNA.

**Palavras-chave:** 16S, COI, SSCP, Meliponini

Dedico essa dissertação  
Aos meus pais, Zeidi e Lídio,  
Ao meu irmão Pedro Henrique  
E a minha vó Maria (*In memoriam*)

## Agradecimentos

Agradeço ao INPA, à Coordenação e secretaria do Programa de Pós Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG-GCBEv) pelo apoio durante esses dois anos.

À minha orientadora Gislene Carvalho-Zilse que me aceitou, mesmo eu sendo uma leiga no assunto, me aconselhou, me mostrou o caminho, de puxões de orelha, mas tudo sempre com muito carinho, acreditou a minha capacidade, confiou que no final eu ia conseguir acabar. OBRIGADA MESMO!!!

A minha família (mãemãe, paipai e irmão) pelo amor irrestrito, carinho, atenção, críticas, “discussões” construtivas, respeito, e principalmente pelo financiamento, apoio, compreensão e incentivo no momento que decidi embarcar nessa grande aventura em busca do desconhecido e num lugar tão longe de casa. E em especial pela minha vó Maria José Araújo Trindade, por tudo que ela representa para mim. Sem eles nada seria possível. Amo vocês!!

À família Oliveira Brito, que considero uma segunda família, Neidi, Celso e Candido por serem especiais e me incentivarem a seguir em frente apesar da distancia. Em especial as minhas “irmãs” Carolina por me acompanhar em muitas loucuras e me dar carinho, amizade, força e compreensão e a Clara pelo amor amizade e apoio apesar de não “aceitar” minha escolha em vir para tão longe. Vocês estão sempre comigo, não importa a distância.

Aos amigos da família Margarida, Paulo, Cristina, Ingrid e Adriano, pelo incentivo, carinho, apoio, companhia, mesmo que a distância.

Ao amigo especial, Pedro Wellf Neto, pelo amor, carinho, apoio, amizade, confiança na minha capacidade e por estar sempre torcendo por mim. Te adoro!!

Às amigas: Pri, Paulets, Lu, o que seria de nós se o Nacional não fizesse parte de nossas vidas: obrigada pelo carinho, pelos momentos de alegria e pela amizade “recente”. À Julia Brum, pela amizade, apoio, confiança e compreensão. Adoro vocês!! Débora Barbosa, apesar da grande distancia a nossa amizade nunca “morreu” e sei que a torcida pelo sucesso é mutua. Ainda bem que nossa amizade

não diminuiu com o tempo. À Tatiana Lopes, Flavia Carnelli, Ariele Roseto, amigas de faculdade que foram importantes na minha caminhada e que serão levadas para sempre.

À Gabi, Priscilinha, Carolzinha, Moreninha. À Bricia, cunhada e amiga! Obrigada pelo carinho e amizade, Manguinhos não seria o mesmo sem vocês.

Aos bichos 2003, Dé, Paulim, Be, And, Junim, em especial a Fefs que além de tudo me ajudou na coloração dos meus intermináveis géis, devíamos ter tido aquela conversa antes! rs

Aos Hard Surf Manguinhos, principalmente, Biel, Nobinho, Romim, Beca, Jaquim, vocês são meus irmãos e são muito importantes na minha caminhada. Sem vocês as minhas voltas para casa não seriam tão divertidas.

À turma do mestrado de 2008: Alexandre, Bárbara, Daniela, Deyla, Edson, Edvaldo, Gabriela, Graciela, Joel, Mauro, Mellina. Obrigada pela companhia nos momentos de confraternização, nas aulas, nos almoços, enfim...

Aos colegas Rodrigo, Leila, Cacá, Leandra, Carlos, Claudia, Arlisson, pelo apoio, conversas, ajudas e companhia.

Ao Mauro, amigo muito especial e eterno, pelo carinho, compreensão, conselhos, amizade, e que me ajuda desde o começo com seu conhecimento. Obrigada pela grande ajuda, principalmente nessa reta final!!! Adoro você!!!

Ao menino mais lindo de todos os lindos, que me inspira com sua dedicação e capacidade de aprender coisas novas, que me incentiva a ir as festas e ficar até amanhecer! Adoro!!!

Às minhas amigas irmãs Leila e Bárbara! Sem palavras para descrever como vocês são importantes na minha estada nessa cidade e por eu manter a sanidade. Bom.... obrigada por tudo, por tudo mesmo! Pelo carinho, amizade, amor, companherismo, lágrimas, risadas, danças.... todos os momentos que dividimos são perfeitos! AMO VOCÊS!!!!

Aos amigos Ramon, Lucy, Heidi, Jaque, Adriel, Galileu, Marcelo, Talita, Milene, Manaus não seria a mesma coisa sem vocês! Adorei encontrar vocês nessa caminhada e dividir momentos tão alegres.

Ao pessoal do Grupo de Pesquisas em Abelhas (GPA): Aline, Diana, Fátima, Izaura, Kemilla, Klilton, Luciana, Raquel, Romison. Em especial, a Fátima que me ajudou a ingressar nesse maravilhoso mundo da genética, a Li que foi meu braço direito e esquerdo dentro do laboratório, tornando a caminhada menos sofrida, e a Quel e ao Romison, por tornar o dia a dia no labs uma eterna risada!!!

À banca julgadora, pela disponibilidade em avaliar minha dissertação e participar da minha defesa pública.

À todos os amigos, colegas, professores, profissionais da área, que de alguma forma me incentivaram a seguir em frente e lutar para realizar meus sonhos profissionais e pessoais.

“A única maneira de salvar a diversidade da vida e ficar em paz com a natureza é mediante o conhecimento, amplamente compartilhado, da biologia e do que as descobertas dessa ciência acarretam para a condição humana”

Edward O. Wilson

## RESUMO

No Brasil estima-se a ocorrência de 192 espécies de abelhas sem ferrão ou indígenas dentre as quase 400 que pertencem a Tribo Meliponini. Estas abelhas, além de produzirem mel, são importantes polinizadoras da flora nativa e dispersoras de sementes. Apesar disto, estão em acelerado processo de desaparecimento, principalmente por causa da destruição dos seus habitats naturais. Ainda é necessário muito trabalho para conhecer a real diversidade dessas abelhas indígenas da região amazônica visto que a maioria das coletas restringe-se às calhas dos dois principais rios do Amazonas (Solimões e Negro). Atualmente, com o advento de estudos moleculares, a caracterização de espécies vem avançando, pois tais técnicas permitem a comparação de seqüências de DNA. Especialmente, o DNA mitocondrial (DNAmt) vem sendo utilizado em estudos intra e inter-específicos e evolutivos por ser pequeno, transmitido matematicamente e altamente conservado. Tal sensibilidade culminou na proposição de uma tecnologia nova e rápida para identificação das espécies com base na região COI (Citocromo oxidase I) para identificação das espécies em geral, denominada DNA Barcode. Entretanto, para *Melipona compressipes*, foi detectado que a região 16S foi mais polimórfica do que COI. Diante disto, este estudo teve por objetivo comparar a eficiência das regiões 16S rRNA e COI do DNA mitocondrial para diferenciar nove espécies de abelhas sem ferrão da Amazônia (*Melipona interrupta*, *M. seminigra*, *M. rufiventris*, *M. dubia*, *M. nebulosa*, *M. eburnea*, *Scaptotrigona sp.*, *S. polysticta* e *Trigona williana*) com base em polimorfismo de DNA de fita simples pela técnica SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*). Foram coletados cinco indivíduos adultos de 10 colméias de cada espécie para extração individual de DNA pelo protocolo de Paxton *et al.* (1996). As seqüências alvo foram amplificadas pela técnica PCR (*Polimerase Chain Reaction*), desnaturadas em tampão SSCP, submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e corado com nitrato de prata. Observou-se 23 haplótipos (16SH1-16SH23) para a região 16S, sendo dois compartilhados (16SH1 entre *M. interrupta* e *M. seminigra*, 16SH5 entre *S. polysticta*, *M. interrupta* e *M. eburnea*). O número de haplótipos exclusivos por espécie variou de um (*M. dubia*) a cinco (*M. seminigra* e *M. eburnea*). Para COI foram encontrados 23 haplótipos (COIH1-COIH23), sendo três compartilhados (COIH10 e COIH11 entre *M. eburnea* e *M. rufiventris* e COIH16 entre *Scaptotrigona sp.* e *S. polysticta*). O número de haplótipos exclusivos variou de um (*M. dubia* e *Trigona williana*) a seis (*M. interrupta*). A distância genética de Nei, tanto para 16S quanto para COI, foi de 100% para as espécies que não tiveram haplótipos compartilhados. Para 16S as distâncias entre *M. interrupta* e *M. seminigra* foi de 80%, entre *M. interrupta* e *M. eburnea* e entre *S. polysticta* e *M. eburnea* de 70%, e entre *S. polysticta* e *M. interrupta* de 58%. Para COI as distâncias encontradas foram de 1,4% entre *M. eburnea* e *M. rufiventris* e 58% entre *Scaptotrigona sp.* e *S. polysticta*. Com base nestes resultados, pode-se inferir que tanto a região 16S quanto a COI são eficientes para diferenciar as espécies de abelhas sem ferrão estudadas.

## ABSTRACT

In Brazil it is estimated the occurrence of 192 species of native stingless bees or out of the nearly 400 who belong to the Tribe Meliponini. They also produce honey bees are important pollinators of native plants and seed dispersers. Despite this, they are undergoing rapid demise, mainly because of the destruction of their natural habitats. Much work is needed to know the real diversity of these indigenous bees in the Amazon region once the majority of the collections are restricted to the troughs of the two main rivers of the Amazon (Solimões and Negro). Currently, the advent of molecular characterization of species has been advancing, because such techniques allow the comparison of DNA sequences. Particularly, the mitochondrial DNA (mtDNA) has been used for studying intra-and inter-specific evolution because it is small, maternally inherited and highly conserved. This sensitivity leads to the proposition of using a region called COI (Cytochrome oxidase I) to identify species in general. Thus, this study aims to differentiate nine species of stingless bee Amazon (*Melipona interrupta*, *M. seminigra*, *M. rufiventris*, *M. dubia*, *M. nebula*, *M. eburnea*, *Scaptotrigona* sp. *Polysticta* S., *Trigona williana*), based on polymorphism of the 16S and COI regions of mtDNA using the technique of SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism). Five adults were collected from 10 hives of each species for extraction of DNA using Paxton *et al.* (1996) protocol. The target sequences were amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction) and subjected to SSCP gel electrophoresis in 12% acrylamide stained with silver nitrate. We observed 23 haplotypes (16SH1-16SH23) for 16S, and only two are shared 16SH1 between *M. interrupta* and *M. seminigra*, 16SH5 between *S. polysticta*, *M. interrupta* and *M. eburnea*. 23 haplotypes were found for COI (COIH1-COIH23), and three were shared: COIH10 and COIH11 between *M. eburnea* and *M. rufiventris*; COIH16 between *Scaptotrigona* sp. and *S. polysticta*. Nei's genetic distances, both for 16S and COI were 100% for species that did not share haplotypes. For 16S, the distances between *M. interrupta* and *M. seminigra* was 80%; for *M. interrupta*, *M. eburnea* and for *S. polysticta* and *M. eburnea* was 70%; and between *S. polysticta* and *M. interrupta* was 58%. For COI, the distances found were 1,4% between *M. eburnea* and *M. rufiventris* and 58% between *Scaptotrigona* sp. and *S. polysticta*. This demonstrates that both genes are good markers for identify species of stingless bees.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	14
OBJETIVO.....	22
MATERIAL E MÉTODOS .....	23
<i>Material biológico</i> .....	23
<i>Extração de DNA</i> .....	27
<i>Amplificação das seqüências alvo</i> .....	28
<i>SSCP (Single strand Conformation Polymorphism)</i> .....	28
<i>Análises genéticas</i> .....	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
CONCLUSÕES .....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Subfamílias da Família Apidae segundo Michener (2007) e Moure <i>et al.</i> (2007), com destaque em negrito para única subfamília em comum. ....	15
<b>Tabela 2.</b> Tribos da subfamília Apinae segundo Michener (2007) e Camargo e Pedro (2008), com destaque em negrito para as tribos não comuns na classificação. ....	15
<b>Tabela 3.</b> Gêneros e número de espécies (entre parênteses) da tribo Meliponini segundo Michener (2007) e Camargo e Pedro (2008), com destaque em negrito para os gêneros em comum. ....	16
<b>Tabela 4:</b> Número amostral de colônias de cada espécie e sua origem (M - meliponário, N - ninho da natureza), locais de coleta e respectivas coordenadas geográficas. ....	25
<b>Tabela 5:</b> Número total de colônias (NC) e de indivíduos (NI) com DNA extraído e suas respectivas ampliações positivas para as regiões COI e 16S em todas as espécies analisadas. ....	33
<b>Tabela 6.</b> Haplótipos encontrados em cada espécie correspondentes as regiões 16S e COI do DNA mitocondrial, com destaque em negrito para os haplótipos compartilhados. ....	37
<b>Tabela 7.</b> Distribuição de haplótipos 16S e COI nas populações de cada espécie de abelhas, com destaque em negrito para os haplótipos exclusivos. ....	39
<b>Tabela 8.</b> Matrizes de distância genética (Nei 1978) entre as populações de <i>Melipona interrupta</i> com base no polimorfismo haplotípico das regiões 16S ( <b>A</b> ) e COI ( <b>B</b> ). ....	40
<b>Tabela 9.</b> Matrizes de distância genética (Nei 1978) entre as populações de <i>Melipona seminigra</i> com base no polimorfismo haplotípico da região 16S ( <b>A</b> ) e COI ( <b>B</b> ). ....	41
<b>Tabela 10.</b> Matrizes de distância genética (Nei 1978) entre as populações de <i>Melipona rufiventris</i> com base no polimorfismo haplotípico da região 16S ( <b>A</b> ) e COI ( <b>B</b> ). ....	42
<b>Tabela 11.</b> Matriz de distância genética (Nei 1978) entre as espécies estudadas com base no polimorfismo haplotípico da região 16S. ....	44
<b>Tabela 12.</b> Matriz de distância de Nei (1978) para o gene COI entre as espécies estudadas. ....	45

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição mundial dos Meliponini, com destaque para a região neotropical, de acordo com Kerr *et al.* (2001). .....17
- Figura 2.** Mapa com a distribuição geográfica das espécies de abelhas sem ferrão utilizadas nesse estudo. Fonte: <http://moure.cria.org.br/catalogue>. .....23
- Figura 3:** Espécies de abelhas sem ferrão utilizadas neste trabalho.....24
- Figura 4.** Municípios de coleta de amostras de abelhas sem ferrão do estado do Amazonas, da esquerda para direita: **1** – São Gabriel da Cachoeira, **2** – Manaus, **3** – Rio Preto da Eva, **4** - Iranduba, **5** - Manacapuru, **6** - Manaquiri, **7** – Careiro Castanho, **8** - Autazes, **9** - Parintins, **10** – Maués. ....26
- Figura 5.** Cubas de eletroforese verticais mantidas em gelo para evitar o superaquecimento durante a corrida do gel de poliacrilamida.....29
- Figura 6:** Perfil de extração de DNA em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etideo de 10 indivíduos de *Melipona interrupta*. **M** = marcador de fago lambda (125 ng/ $\mu$ L). .....31
- Figura 7:** Produtos de amplificação do DNA das regiões COI (em **A** com indivíduos de *Melipona eburnea*) e 16S (em **B** com indivíduos de *Scaptotrigona polysticta*). **M** = marcador Ladder de peso molecular de 100pb (Invitrogen). .....31
- Figura 8.** Eficiência dos métodos de coloração de gel de poliacrilamida com nitrato de prata. **A** – Coloração 1 (nitrato de prata a 0,2% com tempo de exposição de 20 minutos); **B** – Coloração 2 (nitrato de prata a 0,1% com tempo de exposição de 10 minutos).....32
- Figura 9.** Perfil de polimorfismo de DNA de fita simples em gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata, exemplificando as situações de uma única banda (A) e de várias bandas (B) por amostra. ....36
- Figura 10.** Polimorfismo haplotípico da região 16S entre populações de *M. interrupta* em gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata. **A** - Barreirinha (haplótipo H1) e Parintins (H2). **B** - Parintins (H3) e Autazes (H4). ....38

## INTRODUÇÃO

Os insetos divergiram espetacularmente no Permiano e depois no Jurássico, com uma alta relação entre a quantidade de tempo que decorreu desde as divergências orreram e o intervalo de tempo que elas ocorreram (Whitfield & Kjer, 2008).

Considera-se que as abelhas tenham divergido das vespas no Cretáceo mediano, há cerca de 100 milhões de anos. Entretanto, os fósseis mais antigos datam do Eoceno, há aproximadamente 40 milhões de anos (Winston, 2003). Hoje as abelhas, classificadas juntamente com quatro grandes grupos de vespas na superfamília Apoidea, formam um só grupo, juntamente com todas as vespas e as formigas: a ordem Hymenoptera (Silveira *et al.*, 2002).

As abelhas corbiculadas são um clado composto de quatro tribos em Apidae: Apini, Bombini, Euglossini e Meliponini. Essas abelhas datam de linhagens do cretácio superior, mas a diversificação ocorreu no terciário. Apesar da monofilia do clado ser geralmente bem suportada e amplamente aceita pelos sistematas de abelhas, a relação entre essas quatro tribos é extraordinariamente controversa (Whitfield & Kjer, 2008).

A classificação taxonômica das abelhas não está completamente estabelecida. Grande diferença pode ser vista na classificação destes insetos segundo os dois principais grupos de taxonomistas nas suas últimas publicações: *The bees of the world* de Michener em 2007 e *Catalogue of Bees in the Neotropical Region* organizado por Moure *et al.* em 2007.

Moure *et al.* em 2007 dividem a família Apidae em cinco subfamílias: Apinae, Andreninae, Colletinae, Halictinae e Megachilinae (Tabela 1). A subfamília Apinae compreende 20 tribos (Tabela 2), incluindo as abelhas sociais Meliponini, onde são encontrados 33 gêneros com um total de 397 espécies (Tabela 3).

Michener (2007) divide a família Apidae em três subfamílias: Apinae, Nomadinae e Xylocopinae (Tabela 1). A subfamília Apinae é dividida em 19 tribos (Tabela 2), incluindo Meliponini com 24 gêneros e um total de 423 espécies (Tabela 3). Apenas Apinae é compartilhada em ambas as classificações.

**Tabela 1.** Subfamílias da Família Apidae segundo Michener (2007) e Moure *et al.* (2007), com destaque em negrito para única subfamília em comum.

Michener (2007)	Moure <i>et al.</i> (2007)
<b>Apinae</b>	Adreninae
Nomadinae	<b>Apinae</b>
Xylocopinae	Colletinae
	Halictinae
	Megachilinae

**Tabela 2.** Tribos da subfamília Apinae segundo Michener (2007) e Camargo e Pedro (2008), com destaque em negrito para as tribos não comuns na classificação.

Michener (2007)	Moure <i>et al.</i> (2007)
<b>Ancylini</b>	Anthophorini
Anthophorini	Apini
Apini	Bombini
Bombini	Centridini
Centridini	Emphorini
<i>Ctenoplectrini</i>	Ericrocidini
Emphorini	Eucerini
Ericrocidini	Euglossini
Eucerini	Exomalopsini
Euglossini	Isepeolini
Exomalopsini	Melectini
Iseopeolini	Meliponini
Melectini	Nomadini
Meliponini	Osirini
Osirini	Protepeolini
Protepeolini	Rhathymini
Rhathymini	Tapinotaspidini
Tapinotaspidini	<b>Teratognathini</b>
Tetrapediini	Tetrapediini
	<b>Xylocopini</b>

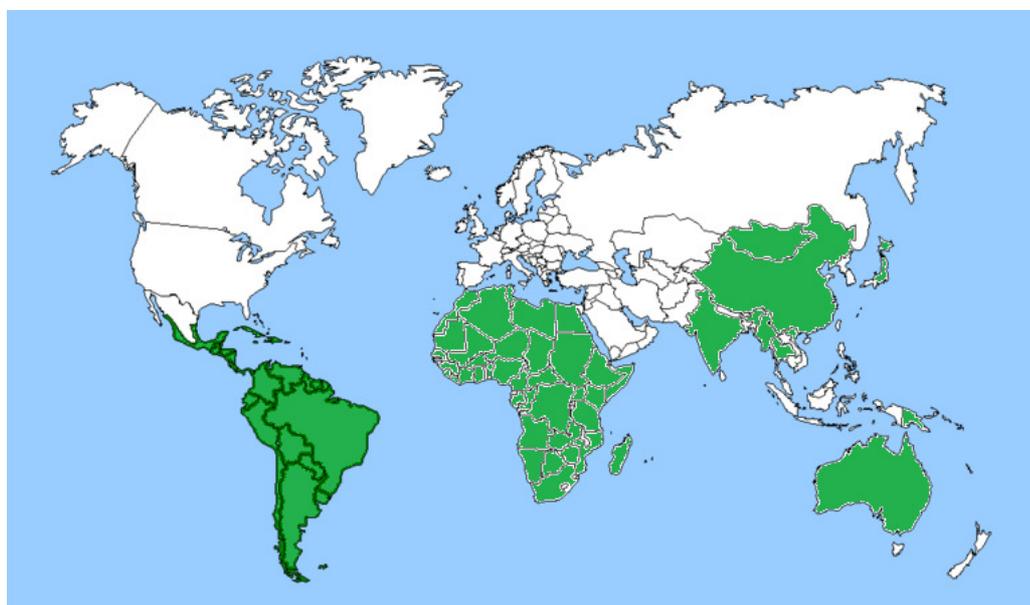
**Tabela 3.** Gêneros e número de espécies (entre parênteses) da tribo Meliponini segundo Michener (2007) e Camargo e Pedro (2008), com destaque em negrito para os gêneros em comum.

Michener (2007)	Camargo e Pedro (2007)
<i>Austroplebeia</i> (9)	<i>AparaTrigona</i> (2)
<b>CephaloTrigona</b> (3)	<i>Camargoia</i> (3)
<i>CleptoTrigona</i> (2)	<i>CeleTrigona</i> (1)
<i>Dactylurina</i> (2)	<b>CephaloTrigona</b> (5)
<i>HypoTrigona</i> (2)	<i>DolichoTrigona</i> (10)
<b>Lestrimelita</b> (6)	<i>Duckeola</i> (2)
<i>LioTrigona</i> (8)	<i>Friesella</i> (1)
<i>LisoTrigona</i> (3)	<i>Frieseomelitta</i> (16)
<b>Melipona</b> (40)	<i>GeoTrigona</i> (21)
<i>Meliponula</i> (25)	<b>Lestrimelitta</b> (19)
<b>Meliwillea</b> (1)	<i>LeuroTrigona</i> (2)
<b>NannoTrigona</b> (9)	<b>Melipona</b> (69)
<b>Nogueirapis</b> (3)	<b>Meliwillea</b> (1)
<b>OxyTrigona</b> (8)	<i>Mourella</i> (1)
<b>ParaTrigona</b> (28)	<b>NannoTrigona</b> (10)
<i>ParioTrigona</i> (1)	<b>Nogueirapis</b> (3)
<b>Paratrigonoides</b> (1)	<b>OxyTrigona</b> (11)
<b>Partamona</b> (41)	<i>Parapartamona</i> (7)
<b>Plebeia</b> (34)	<b>ParaTrigona</b> (30)
<i>Plebeina</i> (1)	<b>Paratrigonoides</b> (1)
<b>Scaptotrigona</b> (24)	<b>Partamona</b> (32)
<b>TrichoTrigona</b> (1)	<b>Plebeia</b> (38)
<b>Trigona</b> (148)	<i>Proplebeia</i> (4)
<b>Trigonisca</b> (23)	<i>PtiloTrigona</i> (3)
	<b>Scaptotrigona</b> (21)
	<i>Scaura</i> (5)
	<i>Schwarziana</i> (2)
	<i>Schwarzula</i> (2)
	<i>Tetragona</i> (13)
	<i>Tetragonisca</i> (4)
	<b>TrichoTrigona</b> (1)
	<b>Trigona</b> (32)
	<b>Trigonisca</b> (25)

Hoje são conhecidas 397 espécies de abelhas sem ferrão (Camargo e Pedro, 2008), sendo que o número real de meliponíneos é difícil de ser estimado devido a falta de revisão do gênero e o grande número de espécies crípticas (Michener, 2007). Sendo assim, há necessidade de uma revisão da subfamília Apinae em virtude do número elevado de espécies e da pequena representatividade das

extensas áreas amazônicas (Silveira *et al.*, 2002). Os táxons reconhecidos são incertos devido aos caracteres conflitantes e complexos ou a existência de intermediários entre táxons largamente separados. Apesar de estudos filogenéticos serem realizados eles não são totalmente confiáveis e devem-se unir os dados morfológicos e genéticos para tentar solucionar esses problemas (Michener, 2007).

Os Meliponini distribuem-se por toda região tropical, sendo que algumas espécies são restritas à região neotropical (Kerr *et al.*, 2001)(Figura 1).



**Figura 1.** Distribuição mundial dos Meliponini, com destaque para a região neotropical, de acordo com Kerr *et al.* (2001).

No Brasil, essas abelhas são encontradas em todos os Estados, em alguns deles há poucas espécies ou uma apenas. Sua grande maioria se encontra nos Estados da Amazônia (Nogueira-Neto, 1997). Silveira *et al.* (2002) consideram a ocorrência de 88 espécies na Amazônia, sendo que muitas não foram descritas e várias das classificadas como subespécies e variedades são, na verdade, espécies. Nessa tribo, *Melipona* é o gênero mais numeroso (das 35 espécies presentes no Brasil, 15 ocorrem na Amazônia e no Amazonas), no entanto, suas espécies foram revisadas pela última vez por Schwarz (1932), e Moure & Kerr (1950) consideram

que ele foi extremamente conservador ao reconhecer subespécies e variedades que claramente representam unidades naturais e que merecem o status de espécie.

Os Meliponini, popularmente conhecidos como abelhas indígenas ou sem ferrão, apresentam grande diversidade genética, morfológica e comportamental (Kerr *et al.*, 2001), mas podem ser facilmente diferenciadas das outras tribos principalmente pela reduzida venação da asa e ferrão residual (Costa *et al.*, 2003). Além disso, apresentam morfologia e desenvolvimento diferenciado quando comparados com outras abelhas sociais, sendo que tal diferença fica evidenciada na organização, nos sistemas de comunicação, arquitetura do ninho e desenvolvimento (Costa *et al.*, 2003). Mesmo dentro de uma mesma tribo, no caso Meliponini, as espécies apresentam variação na elaboração da entrada dos ninhos, geralmente espécie específica; as colônias podem conter de algumas centenas até milhares de operárias e, usualmente, apenas uma rainha (Rasmussen e Cameron, 2007).

Os meliponíneos possuem grande importância ecológica sendo considerados os principais responsáveis pela polinização da flora nativa e também importantes na polinização de plantas domesticadas e usadas em grandes plantações (Kerr *et al.*, 2001).

Slaa *et al.* (2006) estimam que este serviço prestado pelas abelhas movimenta, globalmente, 200 bilhões de dólares por ano e que 30% dos alimentos de origem vegetal consumidos pelo homem dependem da polinização das abelhas, dentre os quais pode-se citar o tomate, pepino, café, morango, laranja, comuns na mesa dos brasileiros, e o camu-camu, cupuaçu e rambutam, que são mais utilizados na região Norte.

Com a expectativa de crescimento populacional mundial chegando a nove bilhões de pessoas até o ano de 2050, e conseqüente aumento nas áreas de agricultura as abelhas se tornam cada vez mais importantes para a sobrevivência humana e manutenção de biodiversidade, apesar disso evidências do declínio desses animais vêm se tornando cada vez maiores (Brown e Paxton, 2009). A despeito de sua importância ecológica as abelhas nativas estão seriamente ameaçadas pela destruição de seu habitat (devido a queimadas e desmatamentos), dos ninhos pelos meleiros e pelo uso de agrotóxicos nas lavouras (Kerr, 2002). A maioria das abelhas depende das árvores para nidificação e alimentação, sendo assim, qualquer agressão ao meio ambiente que cause prejuízo às árvores significa redução no número de colônias (Slaa *et al.*, 2006).

Sem conhecer quantas espécies de abelhas existem e o quão abundante elas são é impossível mensurar seu declínio e elaborar estratégias de conservação prioritárias e significativas (Brown e Paxton, 2009).

No entanto, uma estratégia atual para a conservação destes polinizadores é a criação de abelhas sem ferrão, Meliponicultura. Esta é uma atividade de agricultura familiar comum no Brasil, iniciada pelos índios (Kerr *et al.*, 1996). A etnobiologia Kayapó possuía amplo conhecimento sobre o comportamento, distribuição, estrutura do ninho e zonas ecológicas de abelhas, chegando a nomear e classificar 34 tipos de abelhas, sendo nove cultivadas artesanalmente, e usar a resina e a cera para fabricar artefatos e para uso medicinal (Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006).

Em geral, essa atividade é realizada por comunidades tradicionais e os produtos mais conhecidos resultantes dessa atividade são o mel e o cerume (cera e resina de plantas), mas outros produtos podem ser comercializados e as colônias podem ser alugadas para serviços de polinização (Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006).

A expansão da Meliponicultura é um grande desafio, mas pode-se considerar que está aliada a um desenvolvimento sustentável (Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006), ou seja, a criação comercial dessas abelhas pode contribuir para a conservação das mesmas, incluindo as mais de 100 espécies ameaçadas de extinção, pois possui uma forma de consumo, produção e reprodução que respeitam a natureza (Kerr, 2002a). Também é indispensável que o meliponicultor receba instruções adequadas para o manejo das colônias, dê preferência às espécies locais, plantio de plantas nativas para a alimentação das abelhas e devolva algumas colônias para a natureza (Kerr *et al.*, 2001).

As abelhas apresentam grande capacidade de adaptação, o que fornece ricas fontes de pesquisas. Recentemente, estudos têm sido realizados sob diferentes perspectivas, desde a dos apicultores e meliponicultores até a do biólogo molecular (Winston, 2003).

A diminuição da variabilidade genética das populações como consequência da degradação do meio ambiente e suas implicações para a conservação dos meliponíneos devem ser mais bem estudadas, e, para que isso seja possível, é necessária a caracterização molecular das espécies (Souza *et al.*, 2008).

Ferramentas moleculares tornaram-se indispensáveis nos estudos de sistemática e conservação (Hillis *et al.*, 1996), fornecendo informações que abrangem desde herança diferencial dos genes dentro do mesmo indivíduo (Avisé,

2004) até relações em nível de espécie e biologia de população (Holland & Hadfield, 2002).

O DNA mitocondrial (DNAmt) é usado em estudos genéticos devido a sua herança materna (em sua maioria), possuir tanto regiões conservadas quanto regiões com alta taxas de substituição de nucleotídeos e tamanho reduzido (Weinlich *et al.*, 2004), além disso, não possui modelos complexos de DNA repetitivo, elementos de transposição, pseudogenes, introns, recombinação ou rearranjos (Sousa *et al.*, 2003). Uma característica interessante dessa molécula é a mistura de regiões conservadas com regiões com altas taxas de substituição (Francisco *et al.*, 2001).

A análise do DNAmt é usada em estudos de dinâmica populacional, biogeografia e relações genéticas entre espécies, sendo que esses dados podem ser usados para propostas de conservação (Souza *et al.*, 2008).

Em abelhas, pesquisas com as espécies do gênero *Apis* são mais comuns, sendo escassos em abelhas sem ferrão (Brito e Arias, 2005; Carvalho-Zilse e Kerr, 2006), mas, ainda que em poucos estudos, os marcadores de DNAmt têm sido usados para estudos de variabilidade genética e caracterização de espécies e subespécies de Meliponini (Barni *et al.*, 2007).

O DNAmt tem sido utilizado na identificação de organismos com base na premissa de que a diversidade de um pequeno fragmento localizado no genoma pode ser usada como um código de barras (DNA Barcode) para identificar os organismos em nível de espécies (Hajibabaei *et al.*, 2006). Essa tecnologia tem como objetivo a identificação rápida, exata e automática das espécies (Hebert e Gregory, 2005).

Para o DNA Barcode é usado um segmento de cerca de 600 pares de base do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) (Hebert *et al.*, 2003b), e esta porção da sequência é comparada utilizando distância (Will e Rubinoff, 2004), sendo que uma distância de 3% permite a separação de espécies de insetos (Hebert *et al.*, 2003a).

Entretanto a utilização de fragmentos inferiores ao original (os mini-barcode) amplia o alcance do barcoding, tornando possível obter informações a partir de amostras de arquivos ou com DNA degradado. Além disso, a universalidade dos *primers* permite a recuperação de informações do código de barras a partir da mistura ambiental, sendo também ideal para a caracterização de seqüências por

meio das novas tecnologias de seqüenciamento de alta performance, permitindo exaustivos estudos da biodiversidade (Meusnier *et al.*, 2008).

Em pássaros, peixes e borboletas, pesquisas revelam mais de 95% de resolução na identificação de espécies usando essa região do COI (Hajibabaei *et al.*, 2006). Essa região apresenta como vantagem possuir *primers* universais, e, em comum com outros genes codificadores de proteínas, apresentam alto índice de substituição de nucleotídeos, o que conduz a uma táxons de evolução molecular que é aproximadamente três vezes maior do que a região 16S ou 12S (Hebert *et al.*, 2003). A evolução desse gene é rápida o bastante para permitir a discriminação de espécies próximas e de grupos filogenéticos dentro de uma única espécie (Cox e Hebert, 2001).

Apesar de desde seu surgimento estar sendo usado em insetos (Hebert *et al.*, 2004; Whiteman *et al.*, 2004; Cywinska *et al.*, 2006; Pfenninger *et al.*, 2007), para abelhas sem ferrão, ainda são escassos os estudos com DNA Barcode. Utilizando DNA Barcode Sheffield *et al.* (2009) em estudo com abelhas observaram que as seqüências de COI foram taxonomicamente informativas. No entanto, Bezerra (1999), usando a técnica de polimorfismo de conformação de fita simples do DNA (SSCP- *Single Strand Conformation Polymorphism*), demonstrou que a região 16S é mais polimórfica do que a região COI em *Melipona compressipes fasciculata*, o que despertou nosso interesse para análises em outras espécies de meliponíneos.

Estudos comparativos entre os indivíduos inevitavelmente lidam com um grande número de amostras e, portanto, a escolha de métodos empregados tem que ser simples, como é o caso da técnica SSCP (Hayashi, 1991). Essa técnica foi desenvolvida por Orita *et al.* (1989) para analisar mutações pontuais por eletroforese em gel baseando-se na detecção de diferentes conformações na fita simples de DNA resultantes de mutações. Nessa análise um fragmento de DNA com uma seqüência diferente do tipo selvagem apresenta mudança na mobilidade eletroforética quando comparadas, caracterizando haplótipos (Kerr e Curran, 1996).

A técnica SSCP é muito usada por ser sensível para se detectar diferenças nas seqüências de DNA (Xie *et al.*, 2002), permitindo o processamento mais rápido de um grande número de amostras em busca de polimorfismos, cujos haplótipos se confirmam pelo seqüenciamento do DNA, como foi demonstrado por Naice *et al.* (2007) em espécies crípticas do complexo *Anopheles alibitarsis*. Em abelhas sem

ferrão, a técnica SSCP foi a mais adequada e eficiente para a identificação de mutações em *Melipona rufiventris* (Sousa *et al.*, 2003).

A quantidade de DNA amplificado por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) necessária para a detecção por essa técnica é muito menor do que a necessária para outras técnicas baseadas na PCR. Isso significa que os volumes das reações e as concentrações de substratos podem ser reduzidos diminuindo assim o custo da metodologia. Além disso, as mutações são detectadas por presença de bandas que migram mais ou menos que outras, do que pela ausência de sinal como ocorre em outras metodologias. Portanto a falha na PCR não leva a resultados falso-positivos. (Hayashi, 1991)

A revolução genômica da última década proporcionou ferramentas que fazem da taxonomia universal baseada no DNA um sistema de objetivo alcançável e desejável. Este sistema pode ajudar a sair da crise atual da taxonomia e a dar um novo impulso à investigação sobre a biodiversidade (Tautz *et al.*, 2003).

Há incongruências taxonômicas da família Apidae, a existência de espécies crípticas e a existência de poucos taxonomistas - até 2005 para Hymenoptera existiam apenas 32 sistematas especializados no Brasil (Marques e Lama, 2006) - ressaltam a importância de trabalhos que identifiquem as espécies, em especial, a identificação molecular, pois isso tornaria o trabalho de reconhecimento das espécies mais rápido e eficiente, além de contribuir, junto com os dados gerados pelos taxonomistas tradicionais, para uma identificação mais segura das espécies.

Neste sentido, um marcador molecular que possa ser utilizado em grande escala, como o DNA Barcode, auxiliado por uma técnica de baixo custo e que processa um grande volume de amostras, como SSCP será de grande utilidade na identificação das espécies de abelhas subsidiando os pesquisadores, tomadores de decisão e meliponicultores.

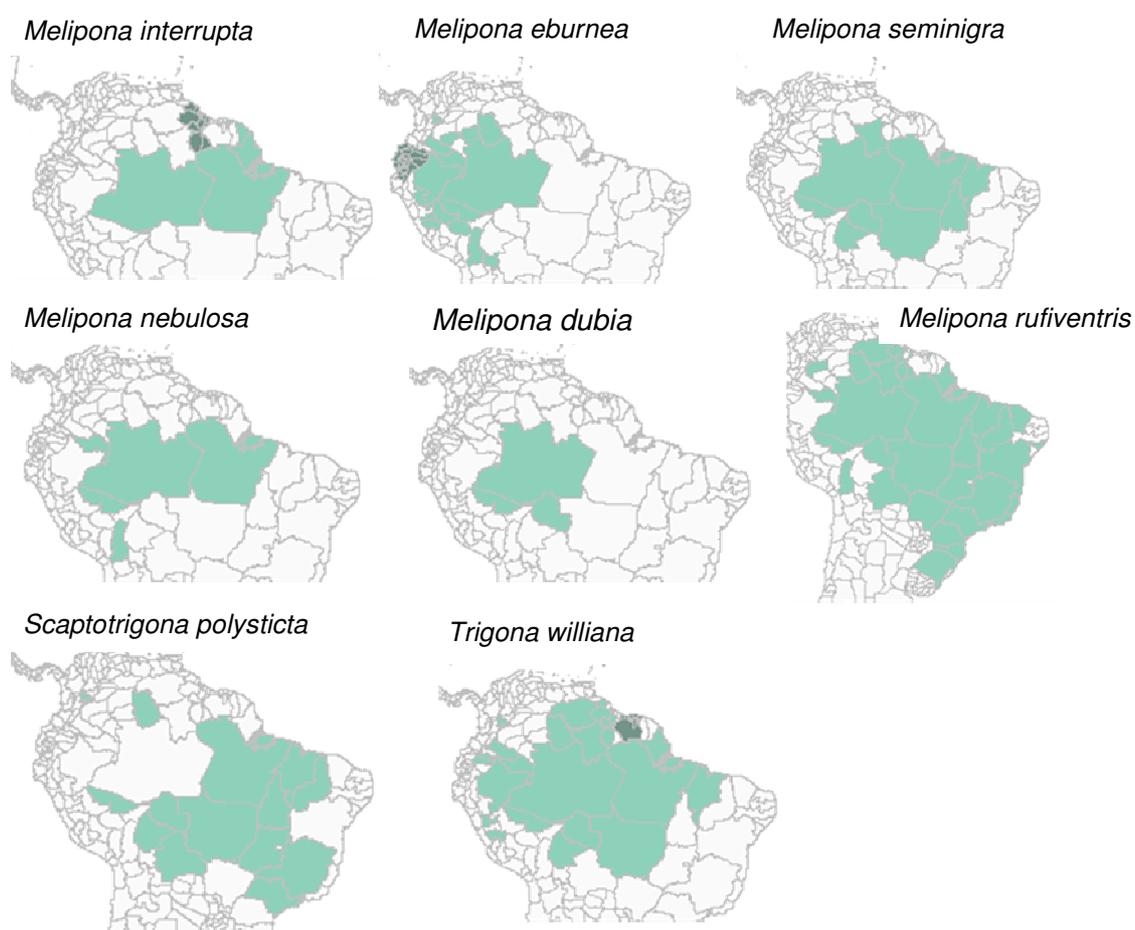
## **OBJETIVO**

O objetivo desse trabalho foi comparar a eficiência das regiões COI e 16S rRNA do DNA mitocondrial na diferenciação molecular de nove espécies de abelhas sem ferrão amazônicas usando a técnica SSCP para identificação e caracterização de haplótipos intra e interespecíficos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Material biológico*

O material biológico, previamente identificado por especialista, é composto por nove espécies de abelhas sem ferrão ocorrentes na Amazônia (Figura 2), a saber: *Melipona eburnea*, *Melipona seminigra*, *Melipona interrupta*, *Melipona nebulosa*, *Melipona rufiventris*, *Melipona dubia*, *Scaptotrigona polysticta*, *Scaptotrigona* sp. e *Trigona williana* (Figura 3).



**Figura 2.** Mapa com a distribuição geográfica das espécies de abelhas sem ferrão utilizadas nesse estudo. Fonte: <http://moure.cria.org.br/catalogue>.



*Melipona interrupta*



*Melipona eburnea*



*Melipona seminigra*



*Melipona nebulosa*



*Melipona dubia*



*Melipona rufiventris*



*Trigona williana*



*Scaptotrigona polysticta*



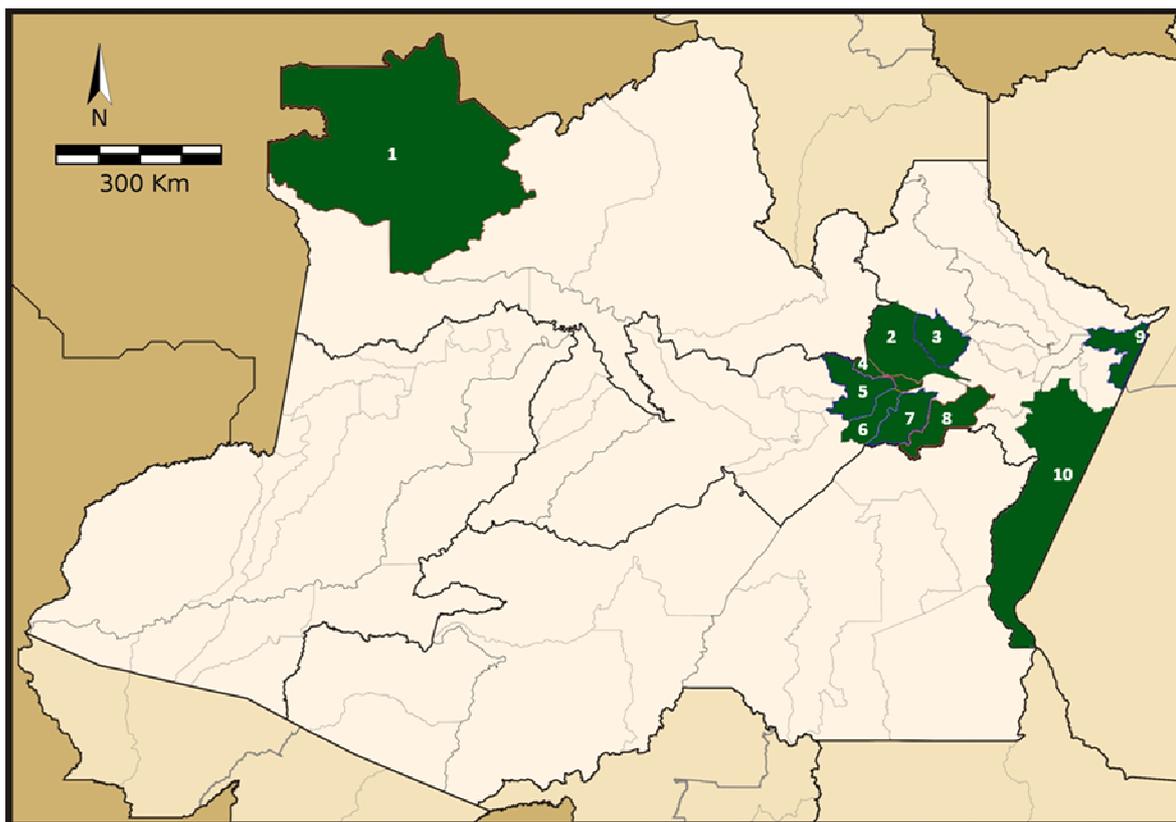
*Scaptotrigona* sp.

**Figura 3:** Espécies de abelhas sem ferrão utilizadas neste trabalho.

Abelhas adultas das diferentes espécies foram coletadas diretamente na entrada das colônias (ninhos naturais ou em meliponários). Para as análises, um total de 345 abelhas operárias foram utilizadas, sendo cinco (5) indivíduos por colônia de cada espécie (Tabela 4), em diferentes localidades de sua ocorrência natural nos Municípios de Autazes, Barreirinha, Careiro Castanho, Iranduba, Manacapuru, Manaquiri, Manaus, Parintins, Rio Preto da Eva, São Gabriel da Cachoeira (Figura 4).

**Tabela 4:** Número amostral de colônias de cada espécie e sua origem (M - meliponário, N - ninho da natureza), locais de coleta e respectivas coordenadas geográficas.

<b>Espécies</b>	<b>Nº de colônias</b>	<b>Origem</b>	<b>Localidade</b>	<b>Coordenadas geográficas</b>
<i>Melipona dubia</i>	1	M	Maués	3° 23' 1" S, 57° 43' 7" W
<i>M. eburnea</i>	10	M	São Gabriel da Cachoeira	1° 20' 24,5"N, 68° 9' 6,3" W
<i>M. nebulosa</i>	7	M	Maués	3° 23' 1" S, 57° 43' 7" W
<i>M. rufiventris</i>	9	M	Manaus	3° 5' 50,5" S, 59° 59' 6,2" W
			São Gabriel da Cachoeira	1° 20' 24,5"N, 68° 9' 6,3" W
			Manaquiri	3° 25' 41" S, 60° 27' 34" W
			Manacapuru	3° 17' 59" S, 60° 37' 14" W
<i>M. seminigra</i>	10	M	Manaus	3° 5' 50,5" S, 59° 59' 6,2" W
			Rio Preto da Eva	2° 41' 56" S, 59° 42' 0" W
			Careiro Castanho	3° 48' 83,6" S, 60° 23' 94,4" W
<i>M. interrupta</i>	10	M	Irاندuba	3° 17' 6" S, 60° 11' 9" W
			Autazes	3° 34' 48" S, 59° 7' 51" W
			Parintins	2° 37' 40" S, 56° 44' 9" W
			Barreirinha	2° 47' 34" S, 57° 4' 12" W
			Manaus	3° 5' 50,5" S, 59° 59' 6,2" W
<i>Scaptotrigona sp.</i>	11	M	São Gabriel da Cachoeira	1° 20' 24,5"N, 68° 9' 6,3" W
<i>S. polysticta</i>	10	M	Manaus	3° 5' 50,5" S, 59° 59' 6,2" W
<i>Trigona williana</i>	2	N	Manaus	3° 5' 50,5" S, 59° 59' 6,2" W



**Figura 4.** Municípios de coleta de amostras de abelhas sem ferrão do estado do Amazonas, da esquerda para direita: **1** – São Gabriel da Cachoeira, **2** – Manaus, **3** – Rio Preto da Eva, **4** - Iranduba, **5** - Manacapuru, **6** - Manaquiri, **7** – Careiro Castanho, **8** - Autazes, **9** - Parintins, **10** – Maués.

A variação no número amostral de colônias entre as espécies reflete a dificuldade de localização e acesso às colônias de meliponíneos. Mesmo com a meta inicial de esforço amostral de 10 colônias/espécie, a grande maioria das coletas ocorreu nas poucas colônias mantidas em meliponários das diferentes localidades. Apenas para *Trigona williana* foi possível amostrar ninhos da natureza. Não foi possível coletar indivíduos das espécies *Melipona fulva*, *M. fuliginosa* e *Plebeia minima*, conforme previsto inicialmente, por não terem sido encontradas colônias na natureza ou em meliponários.

As abelhas adultas foram coletadas com auxílio de puçá, diretamente na entrada das colméias. Estas foram colocadas imediatamente em etanol e conduzidas ao Laboratório de Genética de Abelhas do Grupo de Pesquisas em Abelhas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LGA/GPA/INPA). No

laboratório as amostras foram mantidas em freezer -80 °C até a extração do DNA total.

### **Extração de DNA**

Para posterior análise pela técnica SSCP para as regiões COI e 16S rRNA, o DNA individual das abelhas de cada espécie foi extraído seguindo o protocolo de Paxton *et al.* (1996).

O tórax dos adultos foi macerado individualmente, após congelamento, dentro de microtubo de 1,5 mL. A cada amostra foi adicionado 500 µL de tampão SET (NaCl 0,15M; Tris 0,02M e EDTA 1mM com pH8,0), 18 µL de proteinase K (10mg/mL) e 22 µL de SDS (25%). As amostras foram incubadas a 55°C por duas horas, sendo necessário mexer ocasionalmente. Após a incubação foi adicionado 430 µL de NaCl (6M), sendo os microtubos agitados em vórtex e centrifugados por 10 minutos a 13000 rpm. Em seguida, foram adicionados 215 µL de Tris (0,01M com pH 8,0), as amostras foram centrifugadas por mais 10 minutos a 13000 rpm e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL. O volume da amostra foi dobrado usando-se etanol 99,5% gelado (-20 °C). As amostras permaneceram em freezer a -20 °C durante toda a noite. Em seguida, foram centrifugadas por 15 minutos a 11000 rpm, retirado o etanol e acrescentados 500 µL de etanol 70% gelado (-20 °C), invertendo-se os tubos suavemente. O etanol foi descartado cuidadosamente por inversão do microtubo e o *pellet* secou a vácuo ou em estufa (37 °C). Quando seco, o *pellet* foi ressuspenso em 50 µL de TE (Tris-EDTA; Tris 10mM e EDTA 1mM) durante a noite com o auxílio de um agitador de tubos (shacker). As amostras foram estocadas em freezer -20°C para procedimentos posteriores.

A pureza e integridade do DNA total extraído foram verificadas pela quantificação em gel de agarose a 0,8 %, corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador.

## **Amplificação das seqüências alvo**

A amplificação das seqüências COI e 16S rRNA do DNAm<sub>t</sub> foi realizada por otimização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando-se um par de *primers* para região 16S (Mcomp: 5' – CTGTACAAAGGTAGCATAATCA - 3' e 5' – CTTCTGCATTTAAAATTTATCTT - 3') específico para *M. compressipes* e utilizado por Bezerra (1999) e outro para região COI (mtD7: 5' – GATCCAATAGGAGGAG - 3' e 5' – GATTTCCATTAATTTTCAGG - 3') utilizado por Simon *et al.*, (1994) para *M. bicolor*.

As concentrações dos reagentes utilizados para a reação em cadeia da polimerase foram otimizadas tendo como base as condições utilizadas por Bezerra (1999) e Simon *et al.* (1994): 25 a 75ng de DNA; tampão da enzima 1X, 1 a 3mM de MgCl<sub>2</sub>; 5 a 8 picomoles de *primers*; 200mM de dNTPs e 1 a 1,5U de *Taq* DNA polimerase, para um volume final de 20µL.

Os ciclos da PCR foram diferentes para os dois genes. Para 16S as condições de amplificação foram: 5 min a 94°C; 35 ciclos de 2 min a 94°C, 1 min a 51°C e 2 min a 70°C; e uma extensão final de 10 min a 70°C. Para COI utilizou-se: 1 min a 94°C; 5 ciclos de 1 min a 94°C, 1,5 min a 45°C e 1,5 min a 72°C; seguidos de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1,5 min a 51°C e 1,5 min a 72°C, com uma extensão final de 5 min a 72°C.

As amplificações ocorreram em termociclador MJ96G (Biosystems) sendo o tamanho e a qualidade dos fragmentos amplificados verificados pela eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo ou GELRED<sup>®</sup> e visualizados em fotodocumentador EagleEye Applied.

## **SSCP (Single strand Conformation Polymorphism)**

Após a amplificação das regiões COI e 16S, os produtos PCR foram submetidos a técnica SSCP de acordo com o protocolo usado por Carvalho (2000) que consiste em: misturar 18 µL de tampão LIS-SSCP (sacarose 10%, azul de bromofenol 0,01%, xileno cianol 0,01%) e 2 µL da amostra de DNA amplificado (16S ou COI) em microtubo de 0,5 mL; desnaturar o DNA

amplificado por 5 minutos a 97°C em termociclador e, imediatamente, colocar as amostras em gelo. Então, os 20  $\mu$ L de amostra foram submetidos a eletroforese em gel de acrilamida (12%) por 20:30h a 80 volts.

A detecção de mutações pela mudança da conformação é sensível ao ambiente físico do gel, como temperatura, concentração de íons e solventes. O aumento da temperatura durante a eletroforese é especialmente perigosa para a obtenção de resultados reproduzíveis, por essa razão o pouco aquecimento e eficiente resfriamento são importantes (Hayashi, 2002). Para evitar esse aquecimento, as corridas eletroforéticas do presente estudo se deram com as cubas mantidas em gelo (Figura 5).



**Figura 5.** Cubas de eletroforese verticais mantidas em gelo para evitar o superaquecimento durante a corrida do gel de poliacrilamida.

Em seguida o gel foi corado com nitrato de prata. Dois protocolos de coloração foram testados. A coloração 1 (Creste *et al.*, 2001) implica em colocar os géis em uma solução de etanol a 10% e ácido acético a 1%, por 10min. Em seguida colocar os géis numa solução de nitrato de prata a 0,2% por 20 a 30 min, lavar em água destilada por 3 vezes de 30 segundos. Colocar os géis em uma solução de hidróxido de sódio a 3% e formaldeído a 0,1% até o aparecimento das bandas e interromper a revelação com uma solução de ácido acético a 10%. A coloração 2 (Iuri Drummond Louro, comunicação pessoal) consistiu na colocação dos géis em uma solução de álcool etílico a 10% e ácido acético 0,5% por 6 minutos, retirados e colocados numa solução de nitrato de prata a 0,1% e deixados no escuro por no mínimo 10 minutos e no máximo 15

minutos, em seguida foram lavados com água destilada por 30seg a 1min e corados numa solução de hidróxido de sódio a 15% e formaldeído a 0,1% até o aparecimento das bandas.

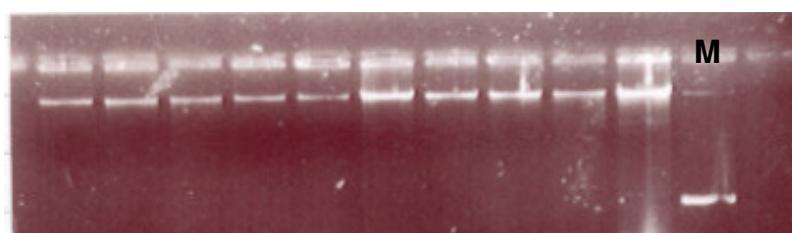
O perfil dos haplótipos gerado foi comparado após a digitalização dos géis em *scanner* de mesa e auxílio do Programa ImageJ versão 1.42 dentro e entre as espécies. Para facilitar a comparação dos haplótipos utilizou-se o haplótipo de dois indivíduos (correspondentes as duas regiões alvo) como marcadores.

### ***Análises genéticas***

As análises genéticas consistiram do cálculo da distancia genética de Nei (1978) com base nos haplótipos encontrados e construção de árvores de distâncias calculadas pelo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) utilizando-se o programa TFGA (*Tools for Population Genetic Analysis*) versão 1.3 (Miller, 1997).

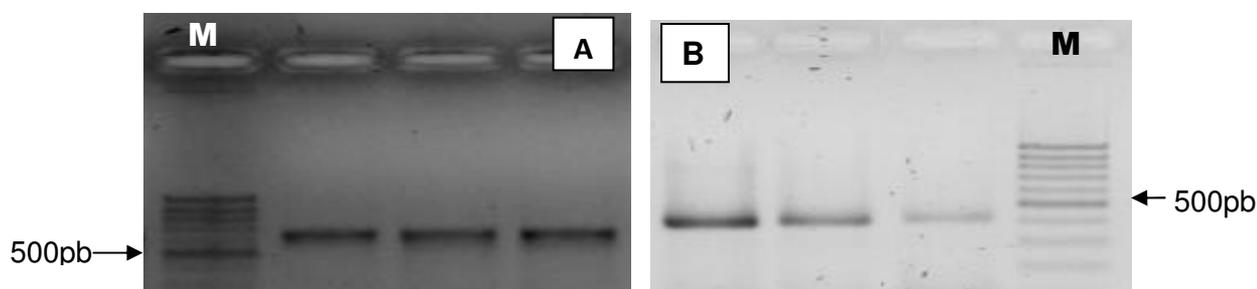
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil de extração de DNA foi satisfatório para todas as espécies (Figura 6) obtendo-se, em média, 125ng/ $\mu$ L de DNA por indivíduo nas espécies de *Melipona* e 100ng/ $\mu$ L de DNA por indivíduo nas espécies de *Scaptotrigona* e *Trigona*.



**Figura 6:** Perfil de extração de DNA em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etideo de 10 indivíduos de *Melipona interrupta*. **M** = marcador de fago lambda (125 ng/ $\mu$ L).

Em todas as espécies obteve-se um bom perfil de amplificação para ambas as regiões (Figura 7).

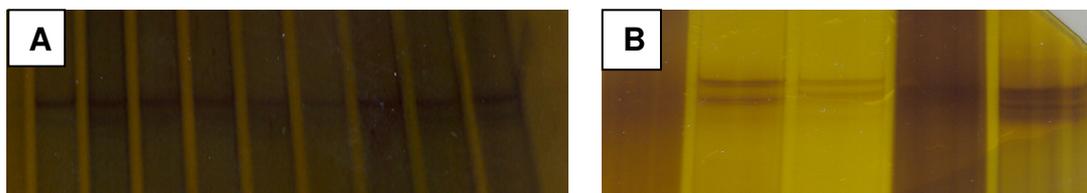


**Figura 7:** Produtos de amplificação do DNA das regiões COI (em **A** com indivíduos de *Melipona eburnea*) e 16S (em **B** com indivíduos de *Scaptotrigona polysticta*). **M** = marcador Ladder de peso molecular de 100pb (Invitrogen).

De acordo com Savov *et al.* (1992) géis de poliacrilamida com maior concentração apresentam separação mais eficiente de haplótipos, especificamente, para fragmentos maiores que 400pb. Neste trabalho foram testadas as concentrações de 8, 10 e 12%, conseqüentemente, com maior tempo de corrida (12h, 17h e 21h, respectivamente). Ratificando a citação acima, a melhor separação e visualização das bandas (dos produtos PCR das regiões 16S e COI) se deu em gel de poliacrilamida a 12%.

A proporção do volume de amostra em relação ao volume de tampão LIS-SSCP para eletroforese foi padronizada em 15:5  $\mu$ L. Portanto, sendo necessária uma maior quantidade de amostra (com o uso de pentes mais largos - de 1cm) do que a proposta por Carvalho (2000), o que permitiu a melhor visualização das bandas.

Quanto a coloração do gel de poliacrilamida, o protocolo de coloração 2 apresentou melhor poder de revelação (Figura 8), a despeito da menor concentração de nitrato de prata (0,1%) e de menor tempo de exposição a este corante (10 minutos). Isto deixou o gel mais claro, numa coloração mais amarelada, e com as bandas mais visíveis.



**Figura 8.** Eficiência dos métodos de coloração de gel de poliacrilamida com nitrato de prata. **A** – Coloração 1 (nitrato de prata a 0,2% com tempo de exposição de 20 minutos); **B** – Coloração 2 (nitrato de prata a 0,1% com tempo de exposição de 10 minutos).

Dos 345 indivíduos com DNA extraído 221 apresentaram amplificação positiva para 16S (64,05%) e 193 para COI (55,94%), sendo amplificados indivíduos em todas espécies, para os dois genes (Tabela 5). Vences *et al.* (2005) também comparando os genes 16S e COI obtiveram uma amplificação

com sucesso de 100% para a região 16S, enquanto que para a região COI o sucesso variou de 50 a 70% entre as espécies de anfíbios por eles analisadas.

**Tabela 5:** Número total de colônias (NC) e de indivíduos (NI) com DNA extraído e suas respectivas ampliações positivas para as regiões COI e 16S em todas as espécies analisadas.

Espécies	NI (NC)	Nº ampliações positivas	
		COI	16S
<i>Melipona dubia</i>	5 (1)	3	3
<i>M. eburnea</i>	50 (10)	42	26
<i>M. nebulosa</i>	35 (7)	20	23
<i>M. rufiventris</i>	45 (9)	11	20
<i>M. seminigra</i>	50 (10)	27	32
<i>M. interrupta</i>	50 (10)	34	34
<i>S. polysticta</i>	55 (11)	14	32
<i>Scaptotrigona</i> sp	50 (10)	38	43
<i>T. williana</i>	10 (2)	3	8
<b>Total</b>	<b>345 (64)</b>	<b>193</b>	<b>221</b>

Para identificação de espécies por DNA Barcode, Sheffield *et al.* (2009) consideram possível a utilização de poucos exemplares de cada espécie quando há limitada variação intraespecífica mesmo entre indivíduos de localidades amplamente separadas. Entretanto, Zhang *et al.* (2010) sugerem que o número normalmente usado para DNA Barcode (cinco a dez amostras, sendo que em alguns casos há apenas uma amostra), pode não ser suficiente para “decobrir” a quantidade real de variação genética e diversidade. Além disso, Schaefer e Renner (2008) sugerem cautela, pois há um problema potencial com pseudogenes para COI em abelhas (observado em seu estudo de Ctenoplectrini).

Segundo Zhang *et al.* (2010) o esforço para encontrar novos haplótipos varia, consideravelmente, de espécie para espécie e de população para população. Por exemplo, se for decidido parar a coleta de dados no momento em que encontrar novos haplótipos se torna difícil (menos de 5 ou 10

haplótipos a cada 100 indivíduos), encontraremos tamanhos amostrais diferentes, variando de 4,5 a 332,9 para 10 haplótipos a cada 100 indivíduos e de 7,5 a 556,3 para 5 haplótipos a cada 100 indivíduos. Assim, neste trabalho, tal perspectiva significaria que, apesar do número amostral utilizado ser maior do que acontece normalmente em bancos de DNA Barcode, este pode ainda não ter sido suficiente para a identificação de todos os haplótipos existentes em cada uma das espécies.

Como esperado, os fragmentos amplificados para cada região gênica estudada foram diferentes. Obteve-se um fragmento de aproximadamente 400pb para 16S em todas as espécies enquanto para o gene COI foi de aproximadamente 600pb, apresentando um tamanho aproximado ao que normalmente é usado para a realização do DNA Barcode. Apesar do uso de *primers* heterologos, não se observou bandas inespecíficas em gel de agarose para nenhuma das regiões de DNA. Foi possível a amplificação em indivíduos de todas as espécies tanto para um gene quanto para o outro. Isso indica que a transferência desses marcadores se mostrou efetiva entre espécies dessa tribo.

Apesar da tecnologia do DNA Barcode preconizar o uso de um fragmento com cerca de 648pb, Hajibabaei *et al.* (2006b) verificaram que seqüências menores apresentam medidas de variabilidade e divergência semelhantes ao observado para o código de barras completo, tanto intra quanto interespecificamente. Além disso, esses mini-códigos de barra foram amplificados com sucesso em espécies de museu e apresentaram resolução coerente com a apresentada pelo código de barras completo.

Meusnier *et al.* (2008) também verificaram que o DNA Barcode pode ser realizado com um fragmento menor do que o usual, e em suas análises averiguaram que fragmentos de COI com tamanho de 100pb obtiveram 90% de sucesso na identificação das espécies, comparados com 95% usando fragmentos de 250 pb e 97% para fragmentos com o tamanho padrão para a tecnologia do barcoding. Assim, era esperado que os fragmentos aqui utilizados (16S com aproximadamente 400 pb e COI com 600 pb) também apresentassem a mesma porcentagem de sucesso que o fragmento modelo (DNA Barcode com 648 pb), o que de fato ocorreu.

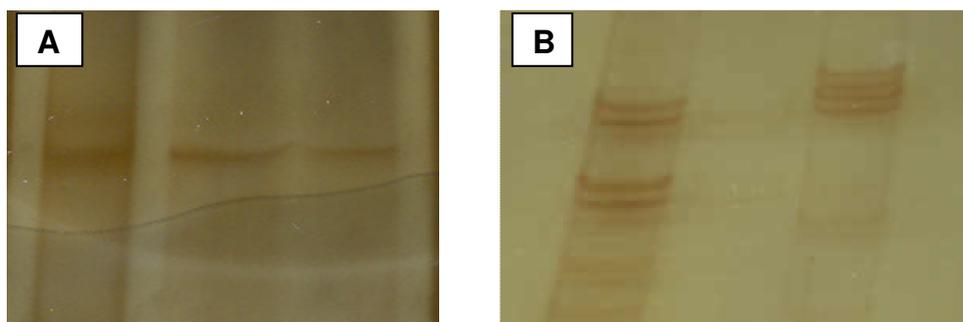
O tamanho do fragmento também influencia na execução da técnica SSCP, sendo que a sensibilidade da técnica geralmente é inversamente proporcional ao tamanho do fragmento, por exemplo, mutações de um par de bases tem 99% de resolução em fragmentos de 100 a 300pb e de 80% para fragmentos de até 400pb (Sunnucks *et al.*, 2000), mas esse procedimento já foi aplicado com sucesso em fragmentos de até 750pb (Ortí *et al.*, 1997).

No presente trabalho, os fragmentos de 400 e 600pb foram bem resolvidos pela técnica SSCP, apresentando polimorfismo haplotípico suficiente para discriminar as espécies, como será discutido adiante.

A logística para a comparação de haplótipos no mesmo gel e entre os géis depende do número de populações e de haplótipos, podendo ser um processo trivial quando há poucos haplótipos ou complexo quando o número de haplótipos e/ou populações é grande (Sunnucks *et al.*, 2000), como no presente trabalho. Desta forma, optou-se por usar o haplótipo apresentado por um individuo de uma espécie com banda suficientemente nítida como marcador referencial em todos os géis.

Hayashi (1991) visualizou três ou quatro bandas nos géis de poliacrilamida, apesar de geralmente as fitas simples de DNA gerarem apenas dois polimorfismos de conformação (duas bandas de SSCP). Este autor considera que provavelmente este fato ocorreu devido a presença de duas conformações estáveis de uma ou de ambas as bandas. Além disso, outra possibilidade seria um excesso de *primers* que podem se associar a fita de DNA e formar uma forma detectável no gel (Cai e Touitou, 1993). Também pode ocorrer o reanelamento das fitas de DNA e se obter três bandas no gel, representando duas fitas simples e uma fita dupla de DNA. Em condições adequadas (baixas temperaturas e condições não desnaturantes), as fitas de DNA migram de acordo com a sua forma. Filamentos de DNA com seqüências diferentes geralmente não assumem a mesma forma e por isso tem mobilidade distinta no gel (Sunnucks *et al.*, 2000). Em alguns géis, do presente trabalho, foi visualizada apenas uma banda (Figura 9), o que pode representar o reanelamento da dupla fita ou a mesma conformação apesar da diferença na seqüência levando a mesma mobilidade eletroforética, como foi verificado por Wholford *et al.* (1999).

A técnica SSCP é muito usada por ser uma técnica sensível para se detectar diferenças nas sequências de DNA (Xie *et al.*, 2002), permitindo o processamento mais rápido e barato de um grande número de amostras em busca de polimorfismos, cujos haplótipos se confirmam pelo sequenciamento do DNA, como foi demonstrado por Naice *et al.* (2007).



**Figura 9.** Perfil de polimorfismo de DNA de fita simples em gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata, exemplificando as situações de uma única banda (A) e de várias bandas (B) por amostra.

A possibilidade de variação do perfil eletroforético das bandas de DNA fita simples, a dificuldade de se reproduzir as condições ideais de temperatura do gel e o fato de bandas com a mesma seqüência poderem apresentar mobilidades diferentes em alguns casos, torna-se interessante a confirmação apenas dos haplótipos duvidosos por seqüenciamento. Naice *et al.* (2007) analisando espécies crípticas de *Anopheles*, confirmaram todos os haplotipos de SSCP por sequenciamento.

A região 16S apresentou polimorfismo com 23 haplótipos (16SH1-16SH23), sendo que apenas dois foram compartilhados, H1 entre *M. interrupta* e *M. seminigra*, H5 entre *S. polysticta*, *M. interrupta* e *M. eburnea*. Para COI também foram encontrados 23 haplótipos (COIH1-COIH23), dos quais três compartilhados, sendo dois entre as espécies *M. eburnea* e *M. rufiventris* (Tabela 6).

Em recente análise comparativa da seqüência COI entre espécies de abelhas, Sheffield *et al.* (2009) verificaram que a maioria das espécies

apresenta seqüência única nesta região de DNA e em pouquíssimos casos houve compartilhamento de seqüências.

**Tabela 6.** Haplótipos encontrados em cada espécie correspondentes as regiões 16S e COI do DNA mitocondrial, com destaque em negrito para os haplótipos compartilhados.

<b>Espécies</b>	<b>Haplótipos 16S</b>	<b>Haplótipos COI</b>
<i>Melipona dubia</i>	H10	H18
<i>M. eburnea</i>	<b>H5</b> ; H17; H18; H19	H9; <b>H10</b> ; <b>H11</b> ; H20
<i>M. interrupta</i>	<b>H1</b> ; H2; <b>H5</b>	H1; H2; H3; H4; H5; H21
<i>M. nebulosa</i>	H15; H23	H19; H22
<i>M. rufiventris</i>	H13; H14; H16	<b>H10</b> ; <b>H11</b> ; H17
<i>M. seminigra</i>	<b>H1</b> ; H6; H7; H8; H9	H6; H7; H8;
<i>S. polysticta</i>	H3; H4; <b>H5</b>	H14; H15; <b>H16</b>
<i>Scaptotrigona</i> sp.	H11; H12; H22	H12; H13; <b>H16</b>
<i>Trigona williana</i>	H20; H21	H23

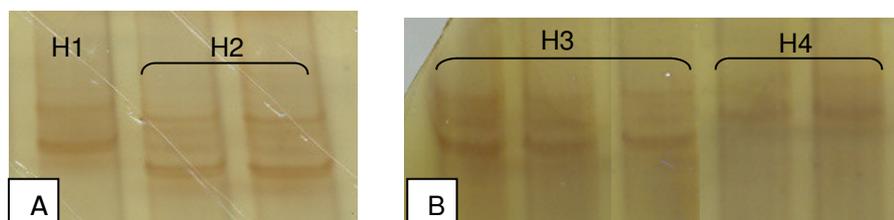
Para todas as espécies foram encontrados haplótipos exclusivos permitindo 100% de discriminação entre as nove espécies com base tanto na região COI quanto na região 16S, o que indica a eficiência de ambas regiões na diferenciação molecular de espécies de abelhas sem ferrão da tribo Meliponini e potencializa seu uso como marcadores moleculares interespecíficos.

Mesmo com haplótipos exclusivos em todas as espécies analisadas, a diversidade haplotípica pode estar subestimada pelo fato de não ter sido amostrada toda área de distribuição geográfica das espécies o que, segundo Zhang *et al.* (2010), seria importante pois uma amostragem aleatória de toda distribuição geográfica de uma espécie pode ser importante para a análise de DNA Barcode, caso contrário apenas uma pequena amostra da diversidade pode ser encontrada e ocorrer erro na identificação.

Costa *et al.*, (2008) conseguiram discriminar molecularmente as espécies *M. compressipes* e *M. seminigra* também usando a região 16S e técnica SSCP. Houve 100% de divergência dos haplótipos encontrados nessas

duas espécies, além disso, *M. seminigra* apresentou monomorfia no que diz respeito aos seus haplótipos enquanto em *M. compressipes* foi encontrado haplótipo exclusivo para localidades diferentes.

No presente estudo, também foi observada a exclusividade de haplótipos por população tanto para 16S quanto para COI (Tabela 7) em *M. interrupta*, *M. seminigra*, *M. rufiventris* espécies onde foi possível a coleta de amostras em diferentes localidades. Em *Melipona interrupta*, por exemplo, as abelhas de Barreirinha, Parintins e Autazes, apresentaram haplótipos únicos para a região 16S, ou seja, não compartilhados com abelhas da mesma espécie de outras localidades (Figura 10).



**Figura 10.** Polimorfismo haplotípico da região 16S entre populações de *M. interrupta* em gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata. **A** - Barreirinha (haplótipo H1) e Parintins (H2). **B** - Parintins (H3) e Autazes (H4).

Apesar da amplificação bem sucedida, visualizada em gel de agarose, em *Melipona seminigra* não foi possível a identificação dos haplótipos para a região COI em Careiro Castanho, e em *M. interrupta* nenhum haplótipo para a região 16S em Iranduba, mesmo depois de repetidos testes para a otimização da técnica.

**Tabela 7.** Distribuição de haplótipos 16S e COI nas populações de cada espécie de abelhas, com destaque em negrito para os haplótipos exclusivos.

<b>Espécies</b>	<b>Populações</b>	<b>Haplótipos 16S</b>	<b>Haplótipos COI</b>
<i>M. dubia</i>	Maués	H10	H18
<i>M. eburnea</i>	S. G. da Cachoeira	<b>H5</b> , H17, H18, H19	H9, <b>H10</b> , <b>H11</b> , H20
<i>M. nebulosa</i>	Maués	H15, H23	H19, H22
<i>M. rufiventris</i>	Manaus	H13, H14	H17
	Manacapuru	H13	<b>H11</b>
	Manaquiri	H14	H17
	S. G. da Cachoeira	<b>H16</b>	<b>H10</b>
<i>M. seminigra</i>	Manaus	H1, H6, H7, H8, <b>H9</b>	H6, <b>H7</b> , <b>H8</b>
	Rio Preto da Eva	<b>H6</b>	H6
	Careiro Castanho	H7, H8	-
<i>M. interrupta</i>	Barreirinha	<b>H1</b>	<b>H1</b> , <b>H2</b>
	Autazes	H5	<b>H3</b>
	Parintins	<b>H2</b>	<b>H4</b>
	Irاندuba	-	<b>H5</b>
	Manaus	H5	<b>H21</b>
<i>Scaptotrigona</i> sp.	S. G. da Cachoeira	H3, H4, <b>H5</b>	H14, H15, <b>H16</b>
<i>S. polysticta</i>	Manaus	H11, H12, H22	H12, H13, <b>H16</b>
<i>Trigona williana</i>	Manaus	H20, H21	H23

A distância genética de Nei (1978) entre populações de *Melipona interrupta*, para a região 16S, foi igual a 100%, com exceção das populações de Manaus e Autazes (Tabela 8), já que ambas compartilham seu único haplótipo. Para COI a distância foi de 100% entre todas as populações, uma vez que todas apresentaram haplótipos exclusivos.

**Tabela 8.** Matrizes de distância genética (Nei 1978) entre as populações de *Melipona interrupta* com base no polimorfismo haplotípico das regiões 16S (**A**) e COI (**B**).

<b>A</b>	Populações	Barreirinha	Autazes	Parintins	Manaus
	Barreirinha	*****			
	Autazes	1,0000	*****		
	Parintins	1,0000	1,0000	*****	
	Manaus	1,0000	0,0000	1,0000	*****

<b>B</b>	Populações	Barreirinha	Autazes	Parintins	Iranduba	Manaus
	Barreirinha	*****				
	Autazes	1,0000	*****			
	Parintins	1,0000	1,0000	*****		
	Iranduba	1,0000	1,0000	1,0000	*****	
	Manaus	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	*****

A distância genética (Nei, 1978) entre as populações de *M. seminigra* foi de 51,08% entre Manaus e Rio Preto da Eva e 3,85% entre Manaus e Careiro Castanho para o gene 16S, sendo que para COI, apenas duas populações foram amostradas e com uma distância de 29,39%, entretanto Manaus apresentou dois haplótipos exclusivos (Tabela 9).

**Tabela 9.** Matrizes de distância genética (Nei 1978) entre as populações de *Melipona seminigra* com base no polimorfismo haplotípico da região 16S (**A**) e COI (**B**).

**A**

Populações	Manaus	Rio Preto da Eva	Careiro Castanho
Manaus	*****		
Rio Preto da Eva	0,5108	*****	
Careiro Castanho	0,0385	1,0000	*****

**B**

Populações	Manaus	Rio Preto da Eva
Manaus	*****	
Rio Preto da Eva	0,2939	*****

A distância genética (Nei, 1978) entre as populações de *M. rufiventris* (Tabela 10), com base na região 16S, foi de 14,38% indicando que a população de Manaus está igualmente próxima de Manacapuru e Manaquiri, entretanto a distância entre Manacapuru e Manaquiri foi de 100%. Para a região COI as populações de Manaquiri e Manaus não se distinguiram já que o único haplótipo encontrado foi compartilhado entre elas. Apesar desse compartilhamento de haplótipos entre duas localidades, o resultado da comparação entre as demais localidades corrobora o de Sousa *et al.* (2003) e Vasconcelos *et al.* (1998) que chegaram a conclusão que a técnica SSCP foi adequada para detectar mutações da região mitocondrial 16S em *Melipona rufiventris*.

**Tabela 10.** Matrizes de distância genética (Nei 1978) entre as populações de *Melipona rufiventris* com base no polimorfismo haplotípico da região 16S (**A**) e COI (**B**).

<b>A</b>	Populações	Manaus	Manacapuru	Manaquiri	SGC
	Manaus	*****			
	Manacapuru	0,1438	*****		
	Manaquiri	0,1438	1,0000	*****	
	São Gabriel da Cachoeira	1,0000	1,0000	1,0000	*****

<b>B</b>	Populações	Manaus	Manacapuru	Manaquiri	SGC
	Manaus	*****			
	Manacapuru	1,0000	*****		
	Manaquiri	0,0000	1,0000	*****	
	São Gabriel da Cachoeira	1,0000	1,0000	1,0000	*****

Bezerra (1999), usando SSCP para comparar 16 populações de *Melipona compressipes fasciculata* do Maranhão, encontrou três haplótipos para a região 16S, com possível separação das populações em três grupos, e nenhum polimorfismo entre as localidades quanto a região intergênica COI-COII indicando que essa região é ainda mais conservada que 16S. Apesar de algumas espécies terem compartilhado haplótipos entre diferentes localidades, nossos resultados permitem indicar que a região 16S é suficiente para a separação de populações de uma mesma espécie, o que corrobora com os dados de Costa *et al.* (2008). A região COI também permitiu a separação de populações diferentes, mesmo compartilhando alguns haplótipos. Entretanto, foi possível verificar que há variação na eficiência desses genes para discriminação em nível de populações. A região 16S se mostrou mais eficiente para populações de *M. seminigra*, com uma média de 51,64%, comparado com COI (média de 29,39%); enquanto COI se mostrou mais eficiente para

populações de *M. interrupta* e *M. rufiventris*, com uma média de 100% e 83% respectivamente, em relação a uma média para 16S de 83% e 71,46%.

O índice de distância genética de 100% e o não compartilhamento de haplótipos entre as populações das espécies estudadas podem ser consequência do isolamento por distância geográfica visto que a capacidade de voo das operárias é limitada, chegando ao máximo 3km em *Melipona subnitida* (Bruening, 1990 *apud* Nogueira-Neto, 1997). Ainda, a distância de dispersão (migração) das colônias é determinada pela capacidade de voo dos machos, que no caso de *Melipona scutellaris* é de cerca de 1 km (Carvalho-Zilse e Kerr, 2004). Portanto, o compartilhamento de haplótipos entre as diferentes populações, cuja distância geográfica ultrapassa o limite de voo e dispersão das abelhas, certamente representa o fluxo gênico artificial entre colônias, promovido pela troca de colméias entre os meliponários ou ainda refletir a variabilidade natural das espécies.

O sucesso na discriminação de espécies por ambas as regiões do DNAm usando a técnica SSCP ratifica trabalhos anteriores sobre a eficiência desta técnica além do baixo custo e rapidez. Tal resultado nos leva a sugerir o uso da técnica SSCP na triagem de polimorfismos haplotípicos populacionais ou interespecíficos. Isto levaria à redução na quantidade de amostras a serem analisadas e de custos com sequenciamento, que apesar de ser o melhor método para distinguir diferentes fragmentos de DNA, ainda tem alto custo (Xie *et al.*, 2002). Essa estratégia de triagem prévia por SSCP também tem sido utilizada por outros autores (Hodgkinson *et al.*, 2002; Mohr e Tebbe, 2006; MacGregor e Amann, 2006).

Com base no polimorfismo haplotípico encontrado dentro e entre as espécies, observou-se que distância genética entre as espécies estudadas foi diferente para os dois genes estudados.

Para a região 16S a distância genética (Tabela 11) foi de 100% entre a maioria das espécies, o que já era esperado, uma vez que nestas não foi observado compartilhamento de haplótipos. Entre as espécies *Melipona interrupta* e *M. seminigra* foi de 80%, entre *M. interrupta* e *M. eburnea* de 70%, *M. interrupta* e *Scaptotrigona polysticta* de 58% e 70% entre *S. polysticta* e *Melipona eburnea*.

**Tabela 11.** Matriz de distância genética (Nei 1978) entre as espécies estudadas com base no polimorfismo haplotípico da região 16S.

Espécies	Mi	Ms	Mr	Me	Mn	Md	Ssp	Sp	Tw
Mi	*****								
Ms	<b>0,8047</b>	*****							
Mr	1,0000	1,0000	*****						
Me	<b>0,7072</b>	1,0000	1,0000	*****					
Mn	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	*****				
Md	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	*****			
Ssp	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	*****		
Sp	<b>0,5878</b>	1,0000	1,0000	<b>0,7072</b>	1,0000	1,0000	1,0000	*****	
Tw	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	*****

**Mi** – *Melipona interrupta*, **Ms** – *M. seminigra*, **Mr** – *M. rufiventris*, **Me** – *M. eburnea*, **Mn** – *M. nebulosa*, **Md** – *M. dubia*, **Ssp** – *Scaptotrigona* sp., **Sp** – *S. polysticta* e **Tw** – *Trigona williana*. Destaque em negrito para as distâncias menores do que 100%.

A distância genética (Nei 1978) encontrada entre as espécies para a região COI (Tabela 12) também foi de 100% entre as espécies que não compartilharam haplótipos. Quando houve haplótipos compartilhados a distância foi de 1,4% entre *M. eburnea* e *M. rufiventris* e 58% entre *Scaptotrigona* sp. e *S. polysticta*.

**Tabela 12.** Matriz de distância de Nei (1978) para o gene COI entre as espécies estudadas.

Espécies	Mi	Ms	Mr	Me	Mn	Md	Ssp	Sp	Tw
Mi	*****								
Ms	1,0000	*****							
Mr	1,0000	1,0000	*****						
Me	1,0000	1,0000	<b>0,0141</b>	*****					
Mn	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	*****				
Md	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	*****			
Ssp	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	*****		
Sp	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	<b>0,5878</b>	*****	
Tw	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	*****

**Mi** – *Melipona interrupta*, **Ms** – *M. seminigra*, **Mr** – *M. rufiventris*, **Me** – *M. eburnea*, **Mn** – *M. nebulosa*, **Md** – *M. dubia*, **Ssp** – *Scaptotrigona* sp., **Sp** – *S. polysticta* e **Tw** – *Trigona williana*. Destaque em negrito para as distâncias menores do que 100%.

As distâncias médias intraespecíficas foram de 95,05% para a região 16S e de 96,11% para COI, enquanto que para as espécies dentro do gênero *Melipona* obteve-se, 96,74% para 16S e 93,42% para COI. Entre as espécies do grupo *Trigona* (gêneros *Scaptotrigona* e *Trigona*) as distâncias médias foram de 91,72% (16S) e 98,03% (COI). Considerando-se apenas as espécies de *Scaptotrigona* obteve-se 96,82% e 94,57% de distância com base em 16S e COI.

Hebert *et al.* (2003a) e Rubinoff (2005) propõem 3% como sendo a porcentagem de divergência para identificação de espécies de invertebrados, portanto as distâncias encontradas no presente trabalho foram bem maiores mostrando que ambas as regiões foram altamente eficientes para diferenciação de espécies do mesmo gênero e entre gêneros de abelhas sem ferrão.

Sheffield *et al.* (2009) com base na região COI para comparação de espécies de abelhas nativas do Canadá, onde não são encontradas abelhas sem ferrão, encontraram uma média das distâncias intraespecíficas de 0,48%,

enquanto pares de espécies dentro de um mesmo gênero mostraram uma divergência média de 13,32%, aproximadamente 27 vezes maior. Espécies que diferenciavam também em gênero sempre mostraram uma média de 19,87%. Os resultados aqui apresentados nos permite inferir que COI foi melhor para separar espécies dentro do grupo *Trigona* (*Scaptotrigona* e *Trigona*) com uma média de 98,03% e quando se comparou espécies dentro da tribo Meliponini (média de 96,11%), entretanto quando se comparou apenas as espécies do gênero *Scaptotrigona* e de *Melipona* 16S apresentou uma média de 96,82% e 96,74% respectivamente.

Os resultados obtidos por Sheffield *et al.* (2009) constataram que as informações geradas com COI foram congruentes com a taxonomia clássica para o grupo estudado, além disso encontram uma alta divergência intraespecífica. Apesar dos resultados aqui mostrados não gerarem árvores congruentes com a taxonomia clássica, verificou-se que o gene COI foi taxonomicamente informativo, já que nos permite separar as espécies além de apresentar uma maior quantidade de haplótipos exclusivos para espécies do que de haplótipos compartilhados. Isso pode ser devido a alta taxa de evolução mitocondrial proposta por Crozier *et al.* (1989) que vem se apresentando maior em abelhas que em outros insetos.

Apesar do estudo de Sheffield *et al.* (2009) demonstrar a eficiência do COI como identificador de espécies em abelhas, tal região também vem se mostrando eficiente em outros grupos de artrópodes tais como aranhas (Barrett e Hebert, 2005), colêmbolas (Hogg e Hebert, 2004) e insetos (Smith *et al.*, 2006; Footitt *et al.*, 2009). De acordo com Elias *et al.* (2007), a taxa de sucesso do DNA Barcode varia entre grupos, sendo que em alguns táxons a possibilidade de diferenciar espécies é maior que em outros, por exemplo em grupos que sofreram especiação recente, ou com grande tamanho efetivo da população ou razoável estabilidade, como no caso de muitos insetos tropicais. Esses autores demonstraram ainda que o barcoding, tal como é aplicado, pode se apresentar com menos sucesso do que sugerem seus proponentes, em particular quando se fala de diversos invertebrados tropicais com várias espécies congênicas e raças geográficas, em outras palavras a maior parte da biodiversidade pode ser considerada um desafio. Apesar das limitações do

barcoding na identificação e descoberta de espécies, o uso de dados do DNAmt pode ser uma valiosa ferramenta para a taxonomia.

Existem possíveis desvantagens na utilização de um marcador de código de barras mitocondrial único, pois a diversidade de sequências intraespecíficas e a probabilidade de sequências compartilhadas entre espécies biológicas distintas é sensível à demografia das populações, “idade” das espécies e tempo de divergência, além de tamanho efetivo da população. Espécies jovens e com grande tamanho efetivo provavelmente não são monofiléticas para sua sequência de códigos de barras. Heteroplasmia, introgressão, seleção potencial nos nucleotídeos e a existência de pseudogenes nucleares podem levar a conflitos (Ács *et al.*, 2010)

Vences *et al.* (2005) trabalhando com anfíbios, e tendo experiências anteriores com peixes, répteis e mamíferos, verificaram que o gene 16S é suficientemente variável para identificar inequivocamente espécies, além disso, os *primers* usados por eles para esse gene podem ser considerados universais. Estes autores recomendam o uso do 16S como um marcador de código de barras adicional para os vertebrados. Nós podemos sugerir esse gene como marcador adicional também para abelhas, uma vez que ele mostrou grande capacidade de diferenciar espécies de *Melipona*, *Scaptotrigona* e *Trigona*. Outros genes foram citados como possíveis marcadores barcode, como o 28S e 18S para insetos (Tautz *et al.*, 2003), o 12S para nematóides (Ferri *et al.*, 2009).

Fenômenos de compartilhamento de haplótipos ou haplótipos não monofiléticos afetarão toda a abordagem de DNA barcoding que utiliza genes mitocondriais, no entanto alguns genes podem superar outros na capacidade de discriminação e aplicabilidade universal, o que pode variar entre grupos de organismos (Vences *et al.*, 2005). Os resultados do presente trabalho indicam que, apesar de ambos os genes terem sido eficientes para diferenciar as espécies, e partindo do pressuposto que quanto menor a quantidade de haplótipos compartilhados melhor seria o gene para um barcoding, 16S seria, portanto, melhor que COI, pois apresentou menos haplótipos compartilhados. Em contrapartida mostrou uma maior distância média (96,11%) entre todas as espécies, em comparação com 95,25% para 16S. No entanto, os haplótipos

foram compartilhados entre três espécies, enquanto COI apresentou um haplótipo compartilhado a mais, mas somente entre duas espécies.

Um marcador genético adequado para o DNA barcoding precisa ser variável o suficiente para discriminar a maioria das espécies dentro de um grupo de estudo, mas ser menos variável dentro do que entre as espécies (Vences *et al.*, 2005). Para as espécies aqui estudadas, os dois marcadores mostraram uma variação intraespecífica menor do que interespecífica, o que torna ambos bons marcadores para diferenciar espécies.

Para o 16S, a quantidade de haplótipos variou de um haplótipo para *Melipona dubia* até cinco haplótipos para *M. seminigra* e *M. eburnea*. Para COI também foi encontrado um haplótipo único para *M. dubia* e *Trigona williana* e um máximo de seis haplótipos para *M. interrupta*. A ocorrência de haplótipos únicos em *M. dubia* e *T. williana* pode ter ocorrido devido ao menor número de indivíduos utilizados no presente estudo.

Para a região 16S, foi possível 100% de discriminação entre *M. seminigra*, *M. dubia*, *M. nebulosa*, *M. rufiventris*, *Trigona williana* e *Scaptotrigona* SP certamente em consequência dos haplótipos compartilhados.

Para a região COI foi possível a discriminação total entre as espécies *M. dubia*, *M. nebulosa*, *M. seminigra* e *T. williana*. Não foi possível a separação entre *M. rufiventris* e *M. eburnea* nem das duas espécies de *Scaptotrigona*.

Rasmussen e Cameron (2010) usando uma combinação de cinco regiões de DNA (16S, 28S, ArgK, EF-1 $\alpha$ , opsin) conseguiram separar as espécies do grupo *Trigona* e do grupo melipona.

Neste trabalho, apesar da eficiência de ambas as regiões 16S e COI na discriminação das espécies elas se mostraram variáveis em nível populacional, interespecífico e entre os gêneros aqui estudados. Este fato ratifica a necessidade de mais estudos sobre a possibilidade de uma única região de DNA (ou um único marcador molecular) ser suficientemente amplo para identificação de espécies.

## CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados nos permite inferir que ambas as regiões do DNA mitocondrial 16S rRNA e COI são eficientes para separar espécies e populações de abelhas da tribo Meliponini.

Para a identificação de espécies dentro dos gêneros *Melipona* e *Scaptotrigona* a região 16S foi mais eficiente, enquanto para o grupo *Trigona* (gêneros *Scaptotrigona* e *Trigona*) e tribo Meliponini em geral a região COI se mostrou mais eficaz.

Mesmo compartilhando haplótipos, a distância genética entre as espécies analisadas foi muito maior que a proposta para separação de espécies de insetos pelo DNA Barcode. Entre as espécies *Melipona interrupta* e *M. seminigra* foi de 80%, entre *M. interrupta* e *M. eburnea* de 70%, *M. interrupta* e *Scaptotrigona polysticta* de 58% e 70% entre *S. polysticta* e *M. eburnea*, para o gene 16S. A distância foi de 1,4% entre *M. eburnea* e *M. rufiventris* e 58% entre *Scaptotrigona* sp. e *S. polysticta* para o gene COI.

A técnica SSCP foi eficiente para identificação e caracterização de haplótipos intra e interespecíficos nas espécies de Meliponini analisadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ács, Z.; Challis, R.J.; Bihari, P.; Blaxter, M.; Hayward, A.; Melika, G.; Csóka, G.; Péntzes, Z.; Pujade-Villar, J.; Nieves-Aldrey J.L.; Schönrogge, K. e Stone, G.N. 2010. Phylogeny and DNA barcoding of inquiline oak gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae) of the Western Palaearctic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55 (X): 210-225.
- Avise J.C., 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman e Hall, New York. 684pp.
- Barni, G.S.; Strapazzon, R.; Guerra Jr, J.C.V.; Moretto, G. 2007. Mitochondrial genome differences between the stingless bees *Melipona rufiventris* and *Melipona mondury* (Apidae: Meliponini). *Genetics and Molecular Research*, 6 (1): 8 – 14.
- Bastos, E.; Cravador, A.; Azevedo, J.; Guedes-Pinto, H. 2001. Single strand conformation polymorphism (SSCP) detection in six genes in Portuguese indigenous sheep breed “Churra da Terra Quente”. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 5 (1): 7 – 15.
- Bezerra, J. M. D. 1999 - *Caracterização morfofenética de populações de Melipona compressipes fasciculata Smith (Hymenoptera, Apidae) em diferentes ecossistemas do Estado do Maranhão (Brasil)*. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, FMRP, Ribeirão Preto 152pp.
- Brito, R.M.; Arias M.C. 2005. Mitochondrial DNA characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by PCR+RFLP and sequencing. *Apidologie*, 36 (3): 431-437.
- Brown, M.J.F.; Paxton, R.J. 2009. The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie*, 40 (3): 410-416.
- Cai, Q.Q. e Touitou I. 1993. Excess PCR primers may dramatically affect SSCP efficiency. *Nucleic Acids Research*, 21: 3909-3910.
- Camargo, J.M.F; Pedro, S.R.M. 2007. Meliponini Lepeletier, 1836. In: Moure, J. S., Urban, D. e Melo, G. A. R. (Orgs). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version*.

Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acessado em 29/10/2008.

- Carvalho, G.A. 2000. *Contribuição à reprodução de Melipona scutellaris Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidea, Meliponini) e suas consequências*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, FMRP, Ribeirão Preto, 108pp.
- Carvalho-Zilse, G.A. e Kerr, W.E. 2006. Utilização de marcadores microsatelites para estudos populacionais em *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). *Magistra* 18(4): 213-220.
- Cortopassi-Laurino, M.; Imperatriz-Fonseca, V.L.; Roubik, D.W.; Dollin, A.; Heard, T.; Aguilar, I.; Venturieri, G.C.; Eardley, C.; Nogueira-Neto, P. 2006. Global meliponiculture: challenges and opportunities. *Apidologie*, 37 (2): 275-292.
- Costa, M.A.; Del Lama, M.A.; Melo, G.A.R; Sheppard, W.S. 2003. Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. *Apidologie*, 34 (1): 73-84.
- Costa, S.A.; Carvalho-Zilse, G.A. e Costa-Pinto, M.F.F. 2008. Polimorfismo da região 16S rRNA do DNA mitocondrial em *Melipona compressipes* e *Melipona seminigra* (Hymenoptera, Apidae) do Amazonas. *XVII Jornada de Iniciação Científica do INPA*. p. 121.
- Cox, A. J.; Hebert, P. D. N. 2001. Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular Ecology*, 10 (2): 371–386.
- Creste, S.; Tulmann-Net, A.; Figueira, A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver straining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19 (4): 299-306.
- Crozier H.R.; Crozier, Y.C.; Mackinlay. 1989. The CO-I and CO-II region of honeybee mitochondrial DNA: evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates. *Molecular Biology Evolution*, 6(4): 399-411.
- Cywinska, A.; Hunter, F. F.; Hebert, P. D. N. 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical and Veterinary Entomology*, 20 (4): 413-424.

- Elias, M.; Hill, R.I.; Willmott, K.R.; Dasmahapatra, K.K.; Brower, A.V.Z.; Mallet, J.; Jiggins, C.D. 2007. Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. *Proceedings of the Royal Society B*, 274 (1627): 2881-2889.
- Ferri, E.; Barbuto, M.; Bain O.; Galimberti, A.; Uni, S.; Guerrero, R.; Ferté, H.; Bandi, C.; Martin, C.; Casiraghi, M. 2009. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Frontiers in Zoology* 6:1
- Francisco, F. de O.; Silvestre, D.; Arias M.C. 2001. Mitochondrial DNA characterization of five species of *Plebeia* (Apidae: Meliponini): RFLP and restriction maps. *Apidologie*, 32 (4): 323-332.
- Foottit, R.G.; Maw, H.E.L.; Havill, N.P.; Ahern, R.G.; Montgomer, M.E. 2009. DNA barcodes to identify species and explore diversity In the Adelgidae (Insecta: Hemiptera: Aphidoidea). *Molecular Ecology Resources*, 9 (Suppl. 1): 188-195.
- Hajibabaei, M.; Janzen, D.H.; Bruns, J.M.; Hallwachs, W.; Hebert, P.D.N. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (4): 968-971.
- Hajibabaei, M.; Smith, A.; Janzen, D.H.; Rodriguez, J.J.; Whitfiel J.B.; Hebert, P.D.N. 2006a. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes*. 6: 959-964.
- Hayashi, K. 1991. PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *Genome Research*, 1: 34-38
- Hebert, P.D.N.; Gregory, T.R.; 2005. The promise of DNA Barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 54 (5): 852-859.
- Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L.; deWaard, J.R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*: 270 (1512): 313-321.
- Hebert P.D.N.; Ratnasingham S.; deWaard, J.R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Royal Society London*, 270 (supplement): 96-99.
- Hebert, P.D. N.; Penton, E.H.; Burns, J.M.; Janzen, D.H.; Hallwachs, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the

- neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (41): 14812-14817.
- Hillis D.M.; Mortiz C.; Mable, B.K.. 1996. *Molecular Systematics*, 2a ed, Sinauer Associates, Massachusetts. 243p.
- Hodgkinson, V.H.; Birungi, J.; Haghpanah, M.; Joshi, S.; Musntermann, L.E. 2002. Rapid identification of mitochondrial cytochrome B haplotypes by single strand conformation polymorphism in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) populations. *Journal of Medical Entomology*, 39 (4): 689-694.
- Hogg, I.D. e Hebert, P.D.N. 2004 Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, 82: 749-754
- Holland, B. S. e M. G. Hadfield. 2002. Islands within an island: Phylogeography and conservation genetics of the endangered Hawaiian tree snail *Achatinella mustelina*. *Molecular Ecology*, 11:365-376.
- Kerr, J.R.; Curran, M.D. 1996. Applications of polymerase chain reaction-single stranded conformational polymorphism to microbiology. *Molecular Pathology*, 49 (6): 315-320.
- Kerr, W.E., Carvalho, G.A.; Nascimento V.A. 1996. *Abelha Uruçu: biologia, manejo e conservação*. Ed Fundação Acangau. Paracatu, Minas Gerais. 143pp.
- Kerr, W.E.; Carvalho, G.A.; Silva, A.C.; Assis, M.G.P. 2001. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parcerias estratégicas*, 12: 20 – 41.
- Kerr, W.E. 2002. Extinção de Espécies: a grande crise biológica do momento e como afeta os meliponínios. *Anais do V Encontro sobre Abelhas*, Ribeirão Preto, SP: 4-9.
- Marques, A.C. e Lamas, C.J.E. 2006. Taxonomia zoológica no Brasil: estado da arte, expectativas e sugestões de ações futuras. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 46: 139-174.
- Meusnier, I.; Singer, G.A.C.; Landry, J.; Hickey, D.A.; Hebert, P.D.N.; Haijibabei. 2008. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics*, 9:214

- Michener, C.D. 2007. *The bees of the world*. 2<sup>a</sup> ed, Baltimore: Johns Hopkins University Press. 992 pp.
- Miller, M. 1997. *Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA)*. Version 1.3. Department of Biological Sciences. Northern Arizona University. 30p.
- Moure, J.S.; Kerr, W.E. 1950. Sugestões para modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymenoptera – Apoidea). *Dusenía*, 1:105-129.
- Moure, J.S.; Urban, D.; Melo G.A.R. (Orgs). 2007. *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region*. Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia. 1058pp.
- Naice, M.V.; Tadei, W.P.; Carvalho-Zilse, G.A.; Batista, J.S.; Rafael, M.S. 2007. Estudo da variabilidade genética do complexo *Anopheles albitarsis*, de três localidades da Amazônia central. *Anais do 53<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Genética*. p.222.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Nogueira-Neto, P. 1997. *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. Editora Nogueirapis. 445p.
- Orita, M.; Iwahana, H.; Kanazawa, H.; Hayashi, K.; Sekiya, T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Science*, 86 (8): 2766-2770.
- Orti, G.; Hare, M.P.; Avise, J.C.. 1997. Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP. *Molecular Ecology*, 6: 575-580.
- Paxton, R.J.; Thor.n, P.A.; Teng, J.; Estoup, A.; Pamilo, P. 1996. Mating structure and estimate relatedness in a communal bee, *Andrena jacobii* (Hymenoptera: Andrenidae), using microsatellites. *Molecular Ecology*, 5 (4): 511-519.
- Pfenninger, M.; Nowak, C.; Kley, C.; Steinke, D.; Streit, B. 2007. Utility of DNA taxonomy and barcoding for the inference of larval community structure in morphologically cryptic *Chironomus* (Diptera) species. *Molecular Ecology*, 16 (9): 1957-1968.

- Rasmussen, C.; Cameron, S.A. 2007. A molecular phylogeny of the Old World stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) and the non-monophyly of the large genus *Trigona*. *Systematic Entomology*, 32 (1): 26-39.
- Rasmussen, C.; Cameron, S.A. 2010. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99: 206-232.
- Rubnoff, D. 2005. Utility of Mitochondrial DNA Barcodes in Species Conservation. *Conservation Biology*, 20(4): 1026–1033. DOI: 10.1111/j.1523-1739.2006.00372.x.
- Savov A.; Anchelicheva, D.; Jordanova, A.; Eigel, A.; Kalaydjeieva L. 1992. High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. *Nucleic Acids Research* 24: 6741-6742.
- Schaefer H. e Renner S.S. 2008. A phylogeny of the oil bee tribe Ctenoplectrini (Hymenoptera: Anthophila) based on mitochondrial and nuclear data: evidence for Early Eocene divergence and repeated out-of-Africa dispersal. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47: 799-811.
- Schwarz, H.F. 1932. The genus *Melipona*. The type genus of the Meliponidae of stingless bees. *Bulletim of the American Museum of Natural History*, 63:231-460.
- Sheffield, C.S.; Hebert, P.D.N; Kevan, P.G; Packer L. 2009. DNA barcoding a regional bee (Hymenoptera: Apoidea) fauna and its potential for ecological studies. *Molecular Ecology Resources*, 9 (Suppl. 1): 196-207.
- Silveira, F.A.; Melo, G.A.R.; Almeida, E.A.B. 2002. *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*. Belo Horizonte: Fundação Araucária, 253 pp.
- 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 Entom. Soc. Am.*, 87: 651-701.
- Smith, M.A.; Woodley, N.E.; Janzen D.H.; Hallwachs W.; Hebert P.D.N. 2006. DNA barcodes revel cryptic host-specificity within the presumed polyphagous membres of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the National Academy of Science*, 103 (10): 3657-3662.

- Slaa, E.J.; Sánchez Chaves, L.A.; Malagodi-Braga, K.S.; Hofstede, F.E. 2006. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*, 37 (2): 293-315.
- Sousa, C.S; Kerr, W.E.; Bonetti, A.M.; Souza, C.S; Santana F.A.; Goulart, L.R.; Oliveira, R.C; Vieira, C.U.; Vasconcelos, S.M. 2003. Comparação das técnicas de SSCP, DS-PCR, PCR-RFLP para detecção de mutação no gene mitocondrial 16S rRNA em populações de *Melipona rufiventris*. *Bioscience Journal*, 19 (1): 65-70.
- Souza, B. de A.; Carvalho C.A.L.; Alves R.M. de O. 2008. Notas sobre a bionomia de *Melipona asilvai* (Apidae: Meliponini) como subsídio à sua criação racional. *Archivos de Zootecnia*, 57 (217): 53-62.
- Sunnucks, P.; Wilson, A.C.C.; Beheregaray, L.B.; Zenger, K.; French, J.; Taylor, A.C. 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformations polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*, 9: 1699-1710.
- Tautz, D.; Arctander, P.; Minelli, A.; Thomas, R. H.; Vogler, A.P. 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(2): 70-74.
- Vasconcelos, S.M. 1998. Divergência genética entre populações de *Melipona rufiventris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 45pp.
- Vences, M.; Thomas, M.; Meijden, A.; Chiari, Y.; Vieites, D.R. 2005. Comparative performance of the 16SrRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *BMC Frontiers in Zoology*, 2:5.
- Weinlich, R.; Francisco, F. de O.; Arias, M. C. 2004. Mitochondrial DNA restriction and genomic maps of seven species of *Melipona* (Apidae: Meliponini). *Apidologie*, 35 (4): 365-370.
- Whiteman, N.K.; Santiago-Alarcon, D.; Johnson, K.P.; Parker, P.G. 2004. Differences in straggling rates between two genera of dove lice (Insecta: Phthiraptera) reinforce population genetic and cophylogenetic patterns. *International Journal for Parasitology*, 34 (10): 1113-1119.
- Whitfield, J.B. e Kjer, K.M. 2008. Ancient rapid radiations of insects: challenges for phylogenetic analysis. *Annual Review Entomology*, 53: 449-472.

- Will K.W. e Rubinoff D. 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identifications and classification. *Cladistics*, 20: 47-55.
- Winston, M.L. 2003. *A biologia das abelhas*. Porto Alegre, Magister, pp 276.
- Wohlford, D.L.; Krafur, E.S.; Griffiths, N.T.; Marquez, J.G.; Baker, M.D. 1999. Genetic differentiation of some *Glossina morsitans morsitans* populations. *Medical and Veterinary Entomology*, 13: 377-385.
- Xie, J.; Wehner, T.C.; Conkling, M.A. 2002. PCR-based single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis to clone nine aquaporin genes in cucumber. *Journal of the American Society Horticultural Science*, 127 (6): 925-930.
- Zhang, A.B.; He, L.J.; Crozier, R.H.; Muster, C.; Zhu, C. D. 2010. Estimating sample size for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54 (X): 1035-1039.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)