

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

ISAC GABRIEL ABRAHÃO BOMFIM

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE ABELHAS INDÍGENAS SEM
FERRÃO DO TÁXON *Melipona* Illiger, 1806 (Apidae: Meliponina)
BASEADAS EM SEQUÊNCIAS PARCIAIS DA REGIÃO ITS1 DO
DNA RIBOSSÔMICO NUCLEAR**

FORTALEZA-CE

2008

ISAC GABRIEL ABRAHÃO BOMFIM

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE ABELHAS INDÍGENAS SEM
FERRÃO DO TÁXON *Melipona* Illiger, 1806 (Apidae: Meliponina)
BASEADAS EM SEQUÊNCIAS PARCIAIS DA REGIÃO ITS1 DO
DNA RIBOSSÔMICO NUCLEAR**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

Orientador: Prof. Ph D. Breno Magalhães Freitas

FORTALEZA – CE

2008

B683r Bomfim, Isac Gabriel Abraão
Relações filogenéticas de abelhas indígenas sem ferrão do táxon
Melipona llliger, 1806 (*Apidae: Meliponina*) baseadas em sequências
parciais da região ITS1 do DNA ribossômico nuclear / Isac Gabriel
Abraão Bomfim, 2008.
97 f. ; il. color. enc.

Orientador: Prof. Ph. D. Breno Magalhães Freitas

Co-orientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro

Área de concentração: Produção animal

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de
Ciências Agrárias. Depto. de Zootecnia, Fortaleza, 2008.

1. Melipona 2. Seqüenciamento automático 3. ITS1 parcial
4.Reconstrução filogenética I. Freitas, Breno Magalhães (orient.)
II. Grangeiro, Thalles Barbosa (co-orient.) III. Universidade Federal do
Ceará – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia IV. Título

CDD 636.08

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Zootecnia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Isac Gabriel Abrahão Bomfim

Dissertação aprovada em: 26 de maio de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Breno Magalhães Freitas – PhD.

ORIENTADOR

Thalles Barbosa Grangeiro – Dr.

CO-ORIENTADOR

Júlio Otávio Portela Pereira – Dr.

CONSELHEIRO

A **Deus, Nossa Senhora e São Francisco** por sempre estarem dispostos a me ajudar, mesmo quando tudo parecia estar perdido e até quando eu acreditava não merecer. Além da vontade e condição fornecidas por eles para a realização desse trabalho.

Aos meus pais **Francisco José de Andrade Bomfim e Celina Maria Abrahão Bomfim** pelos conselhos e ensinamentos transmitidos. Pela amizade verdadeira existente entre nós. Por terem me incentivado para seguir esse caminho, além de todo apoio dado para chegar à conclusão desta dissertação.

Às minhas irmãs **Rafaela Abrahão Bomfim e Raquel Abrahão Bomfim** por todo incentivo, carinho e amizade.

Aos meus cunhados **Cristhiano Motta de Sabóia e Euclides José Leite Castelo** por serem como irmãos para mim e por tornarem minha família maior e mais cheia de vida e alegria.

Aos meus sobrinhos **Diego Bomfim de Sabóia, Luis Eduardo Bomfim Castelo e Thiago Bomfim de Sabóia** por existirem na minha vida e me darem esperanças de um mundo melhor num futuro próximo através da beleza, alegria e pureza contida neles.

Aos meus avós, **Antônio de Andrade Bomfim Filho** (*in memoriam*) e **Maria José Mendes Bomfim, José Matos Abrahão** (*in memoriam*) e **Celina Lima Matos Abrahão** (*in memoriam*) por todo carinho e por serem exemplos de vida para mim.

À toda **minha família** pelo carinho, amizade e pela torcida para que esse dia chegasse. Muito obrigado.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A realização do presente trabalho não seria possível sem a participação de várias pessoas e instituições, às quais agradeço:

À Universidade Federal do Ceará, por meio do Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, pela possibilidade de realização da presente dissertação.

Ao CNPq, pela bolsa concedida durante a realização do curso de mestrado.

Ao professor orientador Breno Magalhães Freitas, pela oportunidade, confiança, orientação segura e tranqüila, compreensão, paciência, amizade e conselhos dentro e fora do meio acadêmico, os quais foram de grande valia para minha formação acadêmica e pessoal.

Ao Professor Thalles Barbosa Grangeiro, pela orientação, pelo apoio, dicas, conselhos, paciência, boa vontade e pela disponibilização do Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

À Universidade Federal de Viçosa na pessoa de Darci de Oliveira Cruz, pelas amostras fornecidas e enviadas, além da amizade e apoio.

À Embrapa Amazônia Oriental na pessoa do Dr. Giorgio Venturieri, também pelas amostras fornecidas e enviadas.

Ao colega abelhudo, Luiz Wilson Lima-Verde pela sua amizade, camaradagem e por todo o material didático fornecido, além é claro, das amostras trazidas do seu sítio em Pacoti-CE.

À Dra. Favízia Freitas de Oliveira e Thiago Mählmann Vitoriano Lopes Muniz pela identificação taxonômica de boa parte das abelhas estudadas, pela amizade, bons momentos e por toda ajuda na elaboração do presente trabalho.

Ao grande amigo e companheiro de mestrado Marcelo Casimiro Cavalcante, pela camaradagem, conselhos, parceria e pelas amostras trazidas da Embrapa Amazônia Oriental,

À Michely Diniz e todos os componentes da equipe do NUGEN-UECE (Núcleo de Genômica e Bioinformática – Universidade Estadual do Ceará) pela ajuda, disponibilização de equipamentos e local para realização de procedimentos essenciais para o término das análises.

À Dra. Eva Mônica Sarmiento da Silva, por sempre torcer e acreditar em mim, por todos os ensinamentos e “empurrões” dados desde os primeiros semestres de graduação, além de toda a ajuda e incentivo que certamente influenciaram na minha escolha de vida e na realização desta dissertação.

Ao grande amigo, David Ramos Rocha, parceiro e “irmão”, por me ajudar dentro e fora da vida universitária, pelos conselhos e pelo seu pensamento sempre positivo, que foram de fundamental importância durante toda essa caminhada.

Ao Marcelo de Oliveira Milfont, pela nossa amizade sólida construída nestes últimos anos e por estar sempre de prontidão para me ajudar sem a menor “miséria” em qualquer que seja a situação.

Aos amigos que participam ou já participaram do Laboratório de Genética Molecular Profa. Maria Aparecida Oliveira Alves, Profa. Dra. Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini, Carlos Eduardo Alves Soares, Tuana Oliveira Correia, Denise Rocha Nepomuceno, Sandra Mara Serafím Ribeiro, Walderly Melgaço Bezerra, Bruno Lopes de Sousa, Camila Dias, Adriana Sampaio Lima, Patrícia Gadelha de Castro, Francisco Tiago da Cunha Dias, Nathália Dias de Oliveira, Liana, Geórgia e Ivna Ribeiro Salmito Melo por me receberem de portas abertas e por sempre estarem dispostos e pacientes a me ajudar.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos, Thiago Lustosa Jucá, Nicholas Costa e todos os demais integrantes do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da UFC.

Aos amigos Alysson Lira Angelim, Natasha Wanderley Pinto, Denise Cavalcante Hissa e Profa. Vânia Maria Maciel Melo do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia.

Ao amigo Daniel Macedo de Melo Jorge pela imensa contribuição, dicas, sugestões e por todo o tempo disponibilizado para responder minhas dúvidas frequentes através de e-mails durante toda a fase de seqüenciamento e análise computacional, além de todo apoio e torcida para que tudo desse certo.

Aos amigos Davi Coe Torres, Júlio Albuquerque Camilo e Marina Duarte Pinto Lobo pela enorme paciência, valiosas sugestões e grandiosas ajudas, imprescindíveis para execução deste trabalho.

Aos companheiros e amigos de mestrado e doutorado, Joaquim, Sueli, Jaime, Bartolomeu, Allisson, Rafaele, Leonardo (Baiano), Willliam (Maranhão) e Cutrim pela amizade e bons momentos passados durante esses dois anos.

Aos amigos da universidade e da também da irmandade, Társio Tiago Lopes Alves e Ednir de Oliveira Santiago pelos momentos de diversão e camaradagem vividos nos últimos anos.

Aos amigos que participam ou já participaram do Grupo de Pesquisa com Abelhas da UFC, em especial para Afonso Odério Nogueira Lima, Júlio Otávio Portela Pereira, Everton Alves, Igor Torres Reis, Danielle Abreu, Patrícia Barreto, Michelle Guimarães, Mikail Olinda, Francisco Humberto de Carvalho Neto e Diogo de Barros Mota Mélo, pelo apoio e torcida.

À amiga Ligia Mesquita pela parceria e amizade durante todo o período de mestrado.

À professora Dra. Márcia Ribeiro pela amizade, confiança e incentivo.

Aos grandes amigos Rômulo Augusto Guedes Rizzardo, pela confiança, amizade, parceria, torcida e por toda colaboração na realização deste trabalho.

A todos os colegas do curso de pós-graduação.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Francisca das Chagas P. Bezerra.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Zootecnia.

Aos amigos do racha das terças-feiras, pela disputa saudável durante as partidas que certamente compensava o nível do futebol apresentado.

Aos amigos Leonardo Pinho, Hugo Simões, Francisco Fernandes Júnior, Heraldo Falcão, Rômulo Bomfim, Frederico Saboya, Filippe Macedo, Guilherme Macedo, Ricardo, Diogo e Tiago Duarte pelas idéias trocadas e pelas horas de lazer curtidas.

A todos que participaram direta ou indiretamente da construção e êxito deste trabalho.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	vi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1. Meliponicultura	21
3.2. Subtribo Meliponina.....	22
3.2.1. <i>Considerações gerais</i>	22
3.2.2. <i>Características biológicas e comportamentais</i>	23
3.3. Táxon <i>Melipona</i> Illiger, 1806.....	25
3.3.1. <i>Considerações gerais</i>	25
3.3.2. <i>Características biológicas e comportamentais</i>	26
3.4. Classificação biológica.....	27
3.4.1. <i>Considerações gerais</i>	27
3.4.2. <i>Nomenclatura: sinônimos e homônimos</i>	28
3.4.3. <i>Taxonomia tradicional e taxonomia baseada em dados moleculares</i>	29
3.5. Sistemática filogenética.....	31
3.5.1. <i>Considerações gerais</i>	31
3.5.2. <i>Filogenia molecular</i>	33
3.6. Mutagênese.....	34
3.7. Marcadores moleculares	36
3.7.1. <i>Considerações gerais</i>	36
3.7.2. <i>Genes nucleares que codificam para RNAs ribossômicos</i>	37
3.7.3. <i>O espaçador transcrito interno (ITS)</i>	38

3.8. Bioinformática.....	40
3.8.1. Considerações gerais	40
3.8.2. Métodos utilizados para reconstrução filogenética	41
3.8.3. Bootstrap (teste de confiança de topologias)	44
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1. Localização do experimento.....	46
4.2. Coleta das amostras	46
4.3. Extração e isolamento do DNA genômico das amostras.....	47
4.4. Análise da qualidade do DNA genômico	48
4.5. Eletroforese de DNA em de agarose a pH neutro	49
4.6. Amplificação da região ITS1 do DNA ribossômico nuclear por reação em cadeia da polimerase (PCR)	50
4.7. Purificação do fragmento amplificado	52
4.8. Seqüenciamento parcial da região ITS1 do DNA ribossômico nuclear purificado.....	52
4.9. Montagem das seqüências obtidas (obtenção das seqüências consenso)	53
4.10. Busca por similaridades das seqüências consenso geradas, em um banco de dados de seqüências nucleotídicas.....	54
4.11. Seqüências importadas do <i>GenBank</i>	54
4.12. Alinhamento múltiplo e edição das seqüências consenso	56
4.13. Análise de saturação de substituições.....	56
4.14. Análises dos agrupamentos taxonômicos	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1. Extração e isolamento do DNA genômico das amostras.....	58
5.2. Amplificação da região ITS1 do nrDNA por PCR.....	60
5.3. Seqüenciamento da região nrDNA ITS1 parcial e obtenção das seqüências consenso. 63	
5.4. Busca por similaridades das seqüências consenso geradas, em um banco de dados de seqüências nucleotídicas (<i>GenBank</i>)	65
5.5. Alinhamento múltiplo de seqüências e identificação de posições homólogas	66
5.6. Análise do conteúdo Guanina + Citosina (conteúdo GC)	69
5.7. Teste de saturação das substituições de bases	70
5.8. Teste do modelo	71

5.9. Matriz de distância genética das amostras do táxon <i>Melipona</i>	72
5.10. Árvores filogenéticas.....	75
6. CONCLUSÕES	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
8. ANEXOS	95

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
TABELA 1: Espécies extraídas no LGM com seus respectivos subgêneros, locais de coleta e responsáveis pela coleta.	46
TABELA 2: Nome, seqüência e sentido dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação da região-alvo rDNA ITS1.	50
TABELA 3: Constituintes e volumes utilizados na preparação das reações de PCR para amplificação do segmento do rDNA ITS1.	51
TABELA 4: Condições de amplificação da região do rDNA ITS 1 editadas para o programa “Abelhas”.	51
TABELA 5: Seqüências importadas e posteriormente integradas às seqüências obtidas no laboratório de genética molecular (LGM) para incrementar as análises filogenéticas do táxon <i>Melipona</i> .	55
TABELA 6: Valores das leituras de absorvância a 260 nm, 280 nm, a razão entre $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ e a concentração de ácidos nucléicos (ng/ul) para as amostras extraídas no laboratório.	60
TABELA 7: Relação das seqüências consenso, da região do rDNA ITS1 parcial das amostras do laboratório, mostrando seus respectivos comprimentos em pares de bases (pb), obtidas através do pacote de programas Pherd, Phrap e Consed.	64
TABELA 8: Características do alinhamento da “interseção central” entre todas as seqüências do rDNA ITS1 parcial das amostras estudadas.	69
TABELA 9: Relação da “interseção central” entre todas as seqüências obtidas da região do rDNA ITS1 parcial das amostras o laboratório mais as amostras importadas do <i>GenBank</i> , mostrando seus respectivos tamanhos em pares de bases (pb), composição nucleotídica e conteúdo GC (Guanina + Citosina).	71
TABELA 10: Resultados do teste do modelo, utilizando o programa <i>ModelTest</i> , para os dados da interseção do alinhamento das seqüências das amostras estudadas, incluindo o grupo externo, da região rDNA ITS1 parcial.	74

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura	Página
FIGURA 1: Representação esquemática do DNA ribossômico nuclear e suas regiões.	40
FIGURA 2: Eletroforese a 0,8% em presença de EtBr a 0,5µg/ml visualizado em luz UV (ultravioleta). Poços/Amostras: M/Marcador de alto peso molecular (DNA de fago λ digerido com <i>Hind</i> III – <i>Amersham Biosciences Corp.</i> , Piscataway – NJ, EUA); 1/ <i>Melipona fasciculata</i> ; 2/ <i>Melipona flavolineata</i> ; 3/ <i>Melipona mondury</i> (Rio Vermelho-MG); 4/ <i>Melipona mondury</i> (Pacoti-CE); 5/ <i>Melipona mondury</i> (Guaramiranga-CE); GE/ <i>Scaptotrigona bipunctata</i> (Grupo Externo).	60
FIGURA 3: Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com EtBr a 0,5 µg/mL e na presença de luz UV (ultravioleta), dos produtos de PCR da região ITS1 do nrDNA. Poços/Amostras: M1/Marcador molecular (Gene ruler 1kb DNA ladder plus); M2/Marcador molecular (Fastruler™ DNA ladder middle range); 1/ <i>Melipona fasciculata</i> ; 2/ <i>Melipona flavolineata</i> ; 3/ <i>Melipona mondury</i> (Rio Vermelho-MG); 4/ <i>Melipona mondury</i> (Pacoti-CE); 5/ <i>Melipona mondury</i> (Guaramiranga-CE); GE/ <i>Scaptotrigona bipunctata</i> (Grupo Externo); Br/Branco (controle negativo com adição de água Milli-Q no lugar do DNA genômico).	62
FIGURA 4: Visualização através do programa Consed das montagens das seqüências consenso realizadas pelo pacote de programas Phred e Phrap. As seqüências utilizadas como exemplo para ilustração foram da região ITS1 parcial do nrDNA de <i>Melipona fasciculata</i> .	64
FIGURA 5: Ilustração de um dos resultados da busca por similaridade com a ferramenta BLASTn. A seqüência Query utilizada como exemplo para ilustrar essa busca por similaridade foi a da região ITS1 parcial do nrDNA de <i>Melipona fasciculata</i> e a seqüência Subject corresponde à região ITS1 parcial do nrDNA de <i>Melipona quinquefasciata</i> com o nº de acesso EU073757.1 no <i>GenBank</i> .	66
FIGURA 6: Alinhamento múltiplo das seqüências estudadas da região ITS1 do nrDNA realizado com auxílio do programa MEGA.	68
FIGURA 7: Gráfico da taxa de transição (X s) e transversões (Δ v) versus a divergência das seqüências utilizando o modelo F84 (FELSENSTINE, 1993), para os dados provenientes da interseção do alinhamento de todas as amostras estudadas, incluindo o grupo externo, da região nrDNA ITS1 parcial.	73
FIGURA 8: Matriz de distância genética entre as seqüências parciais da região ITS1 do nrDNA das amostras do táxon <i>Melipona</i> , desenvolvida a partir do modelo Jukes-Cantor (JC).	76

FIGURA 9: Árvore consenso gerada pela análise do agrupamento do vizinho mais próximo (NJ), com *bootstrap* de 1000 replicações, da região ITS1 parcial do nrDNA para o táxon *Melipona*, utilizando como grupo externo *Scaptotrigona bipunctata*. Os valores de bootstrap encontram-se na base dos ramos. 77

FIGURA 10: Árvore consenso gerada pela análise de máxima parcimônia (MP), com *bootstrap* de 1000 replicações, da região ITS1 parcial do nrDNA para o táxon *Melipona*, utilizando como grupo externo *Scaptotrigona bipunctata*. Os valores de bootstrap encontram-se na base dos ramos. 78

FIGURA 11: Árvore consenso gerada pela análise de máxima verossimilhança (MV), com *bootstrap* de 100 replicações, da região ITS1 parcial do nrDNA para o táxon *Melipona*, utilizando como grupo externo *Scaptotrigona bipunctata*. Os valores de bootstrap encontram-se na base dos ramos. 79

RESUMO

O presente trabalho foi conduzido no período de abril de 2006 a março de 2008, nos departamentos de Zootecnia e de Biologia, da Universidade Federal do Ceará. O objetivo desta pesquisa foi investigar, através de dados moleculares, as relações filogenéticas de algumas abelhas indígenas sem ferrão do táxon *Melipona* Illiger, 1806, nativas do Brasil. Procurou-se fornecer subsídios para facilitar uma futura revisão taxonômica sobre essas abelhas, e desse modo gerar informações para o desenvolvimento de um criatório racional, adequado às diferentes espécies deste táxon, dessa forma contribuindo para o melhor aproveitamento comercial e conservação dessas abelhas. As amostras de abelhas foram coletadas em vários estados das regiões Norte, Nordeste e Sudeste do Brasil. Por meio da extração, amplificação e seqüenciamento parcial da região ITS1 do DNA ribossômico nuclear dessas amostras, somadas às seqüências parciais da região ITS1 de outras abelhas do mesmo táxon retiradas do *GenBank*, pôde-se verificar os seguintes aspectos: alinhamento múltiplo, composição nucleotídica, matriz de distância genética e reconstrução filogenética entre as mesmas. Os resultados mostraram que o alinhamento múltiplo produziu uma interseção central com o comprimento de apenas 141 pb e a média da distância genética entre todas as seqüências estudadas do táxon *Melipona* foi de 7,6%. As árvores construídas usando algoritmos baseados nos métodos de agrupamento do vizinho mais próximo (NJ), máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (MV) para as seqüências parciais da região pesquisada mostraram essencialmente a mesma topologia, sendo esta bem definida em três grandes clados: Clado 1- contendo as seqüências de *M. subnitida*, *M. quadrifasciata* e *M. mandacaia* (todas pertencendo ao subgênero *Melipona*); Clado 2 – abrangendo as seqüências de *M. quinquefasciata* e *M. fasciculata* (ambas pertencendo ao subgênero *Melikerria*); Clado 3 – tendo como representantes no presente trabalho, as seqüências de *M. mondury*, *M. flavolineata* e *M. scutellaris* (todas pertencentes ao subgênero *Michmelia*). Todas as três árvores filogenéticas foram capazes de recuperar a monofilia tanto do gênero *Melipona* como também a dos três clados, que apareceram como grupos monofiléticos.

Palavras-chaves: *Melipona*, seqüenciamento automático, ITS1 parcial, reconstrução filogenética.

ABSTRACT

The present work was carried out from April 2006 to March 2008, in the departments of Biology and Animal Science in the Universidade Federal do Ceará. The aim of this research was to investigate, through molecular data, the phylogenetic relationships among some Brazilian stingless bee species belonging to the taxon *Melipona* Illiger, 1806. It was attempted to obtain information that could facilitate a taxonomic revision of this bee group in the future and to generate information useful to the development of rational rearing adequate to the distinct species of this taxon, contributing to a better commercial exploitation and conservation of these bee species. Bee samples were collected in various states of the North, Northeast and Southeast regions of Brazil. Through the extraction, amplification and partial DNA sequencing of the ITS1 region of nuclear ribosomal DNA of those samples and the partial sequences of the ITS1 region of other bees of the same taxon searched in the GenBank, it was possible to observe the following parameters: multiple alignment, nucleotide composition, matrixes of genetic distances and phylogenetic reconstruction. Results showed that multiple alignment resulted produced a central intersection of only 141 bp long and the average of the genetic distance among all the studied sequences of the taxon *Melipona* was of 7,6%. The phylogenetic trees built using algorithms based on the methods of the Neighbor-Joining (NJ), Maximum Parsimony (MP) and Maximum Likelihood (ML) for the partial sequences showed essentially the same topology, which was clearly distinct in three great clados: Clado 1 - contained the sequences of *M. subnitida*, *M. quadrifasciata* and *M. mandacaia* (all belonging to the subgenus *Melipona*); Clado 2 - included the sequences of *M. quinquefasciata* and *M. fasciculata* (both belonging to the subgenus *Melikerria*); and Clado 3 – represented in this work by the sequences of *M. mondury*, *M. flavolineata* and *M. scutellaris* (all belonging to the subgenus *Michmelia*). The three phylogenetic trees were capable to recover the monophyly of the genus *Melipona* as well as of the three clados, that appeared as monophyletic groups.

Key-words: *Melipona*, automatic sequencing, partial ITS1, phylogenetic reconstruction.

1. INTRODUÇÃO

As primeiras abelhas surgiram como consequência do aparecimento das plantas que produzem flores. Porém, foi devido à separação dos continentes durante meados do período Cretáceo que as abelhas sofreram sua primeira grande diversificação, através de dispersão e vicariância (mecanismo evolutivo oriundo do isolamento de populações de uma espécie ancestral pela interposição de uma barreira geográfica efetiva entre elas, normalmente levando a especiação), e da consequente adaptação aos novos ambientes formados em decorrência dessa deriva continental (SILVEIRA *et al.*, 2002). A vida em locais tão diversos em clima, vegetação, luminosidade, temperatura, pluviosidade, predadores, opções para nidificação etc., propiciou o surgimento de uma grande diversidade de abelhas espalhadas por todos os continentes (FREITAS, 1999; KERR *et al.*, 2001).

Nos dias atuais são conhecidas mais de vinte mil espécies de abelhas ao redor do mundo e todos os anos novas espécies são descobertas nas Américas Central e do Sul, África, Ásia e Austrália (ROUBIK, 1992). Elas variam em tamanho, forma e hábitos de vida, cuja maior parte vive de forma solitária, enquanto outras mostram vários níveis de organização social. Entretanto a grande maioria delas compartilha a característica de visitar flores para coletar seu alimento: néctar (ou óleo) para demanda de energia e pólen para a de proteína (VELTHUIS, 1997).

O Brasil, devido a suas proporções continentais e riqueza de ecossistemas, pode ser considerado privilegiado neste aspecto, pois abriga cerca de $\frac{1}{4}$ de todas as espécies de abelhas existentes no mundo (ALVES-DOS-SANTOS, 2002). Entre as abelhas nativas do Brasil é possível destacar inúmeras espécies solitárias e meliponíneos ou abelhas indígenas sem ferrão. Além dessas, encontra-se também a espécie *Apis mellifera*, que foi introduzida no país durante o período colonial para fins de apicultura (ALVES-DOS-SANTOS, 2002; NOGUEIRA-NETO, 1997). Dentre as abelhas nativas, os meliponíneos formam um grupo importante, rico tanto em espécies e como nas variações comportamentais existente entre elas (VELTHUIS, 1997).

São os meliponíneos que compõem as abelhas da subtribo Meliponina (Hymenoptera, Apidae), cujas espécies são exclusivamente de hábito social, além de

caracterizam-se por possuírem o ferrão atrofiado, portanto sendo, incapazes de ferocar e é essa característica que faz com que sejam popularmente conhecidas por "abelhas sem ferrão". Entretanto, apesar da ausência do ferrão como órgão de defesa, ainda assim conseguem defender suas colônias, tanto de forma indireta, construindo seus ninhos em locais de difícil acesso, como também de maneira direta, defendendo-se dos inimigos através de beliscões com as mandíbulas afiadas, penetrando nos ouvidos e narinas, além de enroscarem-se nos cabelos e pêlos dos mesmos (NOGUEIRA-NETO, 1997; CARVALHO *et al.*, 2003).

Dentre as abelhas dessa subtribo, o gênero *Melipona* é o que apresenta maior número de espécies. Ocorrendo em toda região neotropical e sendo mais diversificado na bacia amazônica, o gênero *Melipona*, se caracteriza por ser exclusivamente neotropical, com distribuição geográfica variando do México até Argentina e compreendendo aproximadamente 40 espécies descritas (MICHENER, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2002) sendo 36 encontradas no Brasil (VELTHUIS *et al.*, 2003).

Apesar do fato de que a biologia de certas espécies de *Melipona* já ser bem documentada, muitos aspectos sistemáticos sobre este táxon ainda permanecem obscuros (FERNANDES-SALOMÃO *et al.*, 2005). Ainda hoje existe uma confusão de nomes vulgares e até mesmo nomes científicos dados de forma incorreta a determinadas espécies de meliponíneos, como também dentro do gênero *Melipona*. Muitas vezes, os mesmos nomes são dados a diferentes espécies ou então o contrário, nomes diferentes são dados às mesmas espécies. Isso pode ser atribuído à existência de vários grupos de espécies bastante similares, além das poucas revisões taxonômicas feitas em cima desse gênero. Para poder esclarecer, acrescentar e/ou corrigir nomes e espécies que podem variar de uma região para outra, o gênero *Melipona* necessita urgente de uma ampla revisão (SILVEIRA *et al.*, 2002; MELO, 2003). Portanto, para uma revisão taxonômica de *Melipona*, uma robusta filogenia, baseada tanto em dados morfológicos quanto em dados moleculares, seria de grande utilidade (FERNANDES-SALOMÃO *et al.*, 2005).

Toda essa confusão apresentada sobre a correta classificação taxonômica das abelhas deste táxon gera prejuízos para o avanço da meliponicultura, pois o desenvolvimento de manejos para a criação racional dessas abelhas pode ser, de certa forma, espécie-específico, assim, dependendo da anatomia, morfologia e comportamento das mesmas, tanto na forma individual como também em nível de colônia. De modo que muitas espécies são criadas de

maneira incorreta e, portanto muitas vezes não conseguem fixar-se e desenvolver-se dentro de caixas racionais, logo não apresentando capacidade adequada para produzir quantidades consideráveis de mel ou de se encontrar em condições de serem introduzidas em áreas agrícolas com a finalidade de polinização.

Diante desse contexto, o desenvolvimento de formas zootécnicas de criação só poderá ser estabelecido juntamente com a correta identificação e classificação dessas abelhas, para que então se possa adaptar as formas de criação racional às particularidades de cada espécie e assim dar um grande passo para o crescimento da meliponicultura no Brasil.

Na ajuda da busca por uma correta identificação e classificação dessas abelhas a análise do seqüenciamento de DNA de espécies de *Melipona* também proporcionará diversas comparações inter e intra-específicas, abrindo então perspectivas para novas teorias e aplicações zootécnicas, como estudos de comportamento, nidificação, pastejo, necessidades de alimentos, reprodução e ainda sobre evolução do gênero dentre outros (WEINLICH *et al.*, 2004; PEREIRA, 2006).

Portanto, o presente trabalho propõe-se a investigar, através de dados moleculares, as relações filogenéticas de algumas espécies de abelhas indígenas sem ferrão do táxon *Melipona* nativas do Brasil. Visando fornecer dados para facilitar uma futura revisão taxonômica sobre o gênero *Melipona* e assim poder gerar subsídios para o desenvolvimento de um criatório racional adequado às diferentes espécies de abelha deste táxon, assim contribuindo tanto para um melhor aproveitamento comercial destas abelhas quanto para a conservação das mesmas.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Investigar, através de dados moleculares, as relações filogenéticas de algumas espécies de abelhas indígenas sem ferrão do táxon *Melipona* Illiger, 1806, nativas do Brasil.

Objetivos específicos

- Inferir geneticamente a relação de parentesco (filogenia) entre algumas espécies do táxon *Melipona*, analisada pelo seqüenciamento parcial da região ITS1 do DNA ribossômico nuclear;

- Fornecer dados para facilitar uma futura revisão taxonômica sobre o táxon *Melipona* Illiger, 1806;

- Gerar subsídios para o desenvolvimento de um criatório racional adequado às diferentes espécies de abelha deste táxon, dessa forma contribuindo, juntamente, para o melhor aproveitamento comercial e para conservação dessas abelhas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Meliponicultura

A meliponicultura é o nome dado à criação racional dos meliponíneos ou abelhas indígenas sem ferrão (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Na América Latina existem pouco mais de 300 espécies de meliponíneos, as quais possuem uma diversidade genética, morfológica e comportamental enorme. Dessas, cerca de 70 poderiam ser criadas para uso em polinização e para produção de mel (KERR *et al.*, 2001).

Apesar da produção de mel das abelhas sem ferrão ser inferior à das abelhas *Apis mellifera*, seu mel obtém um melhor preço no mercado, por se tratar de um produto especial por várias características medicinais, por ser orgânico e raro, além de seu sabor e aroma possuírem características únicas, dependendo da florada e da espécie de abelha que o produziu. Além disso, os meliponíneos possuem vantagens muito importantes, especialmente levando-se em conta que estes estão muito mais adaptados à polinização das nossas matas nativas e à nossa cultura e realidade. Outra vantagem é que a criação de abelhas indígenas sem ferrão se enquadra perfeitamente dentro do conceito de se desenvolver práticas de uso sustentado dos recursos naturais, pois é uma atividade agropecuária que pode ser integrada a vegetação natural, a plantios florestais, de fruteiras e de culturas de ciclo curto, e em muitos casos, pode contribuir para o aumento da produção agrícola, originando frutos com melhores qualidades agrônômicas, através dos serviços de polinização prestados pelas abelhas (VENTURIERI, 2004).

A meliponicultura já era praticada há muito tempo pelos povos nativos da América Latina, em especial aqueles do Brasil e México. As abelhas sem ferrão eram as únicas produtoras de mel e as principais polinizadoras da flora nativa até 1838, quando se deu a introdução das *Apis mellifera* no Rio de Janeiro (KERR *et al.*, 2001).

Três espécies de meliponíneos são criadas pelo homem das Américas, mais do que qualquer outra espécie de abelha deste continente: *Melipona beecheii*, a qual se encontra em território mexicano; *Melipona compressipes*, conhecida pelo nome popular de tiúba, encontrada no Maranhão; e *Melipona scutellaris*, popularmente chamada de uruçú do nordeste (KERR, *et al.*, 2001). Ainda podemos citar a abelha indígena sem ferrão jandaíra (*Melipona*

subnitida Ducke) que é bastante criada no Ceará e Rio Grande do Norte (CÂMARA *et al.*, 2004).

Na floresta Amazônica existem mais de 100 espécies de meliponíneos (podendo esse número ser bem maior), porém, apenas as espécies do gênero *Melipona* vêm sendo mais procuradas e estudadas para elaboração de manejos adequados à criação das mesmas (KERR *et al.*, 2001). Entretanto, poucas são criadas de maneira racional e dessas, muitas ainda são criadas em cortiços, cabaças ou mesmo em troncos de árvores. Desse modo, apesar da tentativa de criação racional, verifica-se a criação de abelhas em caixas totalmente fora do padrão (BEZERRA, 2002). De maneira que não são fornecidos a essas abelhas, técnicas e manejo adaptados à anatomia, biologia de nidificação e comportamento de cada espécie (CARVALHO *et al.*, 2003).

3.2. Subtribo Meliponina

3.2.1. Considerações gerais

As abelhas sem ferrão pertencem à família Apidae, subfamília Apinae, tribo Apini e subtribo Meliponina, sendo denominadas por meliponíneos (SILVEIRA *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2003). As abelhas desta subtribo estão entre as mais antigas abelhas sociais conhecidas. O fóssil mais velho encontrado foi o de Nova Jersey, EUA, num âmbar do período Cretáceo de 96 a 74 milhões de anos, e esse fóssil era de uma abelha operária de *Cretotrigona prisca*, muito semelhante às abelhas do gênero *Trigona* existentes atualmente (VELTHUIS, 1997).

Naquele tempo, o mundo ainda não estava dividido em continentes como se encontra hoje em dia. O processo de deriva continental, provocando a separação das Américas da Europa e África e mais tarde a separação da Austrália a partir da América do Sul, ainda não havia ocorrido, assim, isso provavelmente justifica o fato das abelhas sem ferrão já terem ocorrido em todos os continentes (VELTHUIS, 1997).

Como exemplos de espécies pertencentes a essa subtribo podemos citar a jandaíra (*Melipona subnitida*), a urucu do chão (*Melipona quinquefasciata*), abelha canudo (*scaptotrigona bipunctata*), arapué (*Trigona spinipes*), moça branca (*Frieseomelitta doederleini*) etc. As várias centenas de espécies desta subtribo estão distribuídas por todas as

regiões tropicais do mundo, bem como nas regiões subtropicais do hemisfério sul (MICHENER, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2002).

O grupo Trigona-Tetragona, com morfologia considerada primitiva, é encontrado no sudeste asiático e nas Américas Central e do Sul. Há também uma afinidade entre gêneros africanos e sul-americanos e uma afinidade entre gêneros da América do Sul e Austrália. A América Central e do Sul apresentam um grande número de espécies e gêneros da subtribo Meliponina, o que indica, certamente, uma grande proliferação dessas abelhas por todo esse continente. Provavelmente, isso fez com que no Brasil se encontrassem os gêneros mais primitivos como *Plebeia* e *Schwarziana* junto com os mais evoluídos como *Scaptotrigona* e *Melipona* (VELTHUIS, 1997).

Atualmente são reconhecidas várias centenas de espécies, no entanto podendo esse número ser bem maior, pois uma aproximação do número real é bastante difícil por causa da abundância de espécies crípticas (espécies morfologicamente semelhantes diferindo dos seus parentes próximos apenas nas bases de caracteres aparentemente triviais) (MICHENER, 2000). Apesar de bons começos feitos por CAMARGO & MOURE (1989, 1994 e 1996) e SAKAGAMI (1978), poucos esforços têm sido realizados para a real aproximação do número de abelhas sem ferrão existentes no Brasil vendo que a maioria dos gêneros, em grande parte das áreas, não tem sido adequadamente analisados para o reconhecimento das tais espécies crípticas. Além do que, segundo MELO (2003), a maior parte dos gêneros neotropicais de meliponíneos necessita de uma ampla revisão, para então poder-se estimar a situação real deste táxon.

DUCKE (1916) fez a primeira e única revisão desta subtribo, porém apesar de todos os méritos, Ducke sinonimizou ou tratou como subespécies formas hoje reconhecidas como “boas” espécies, assim subestimando muito a riqueza das Meliponina no Brasil (SILVEIRA *et al.*, 2002).

3.2.2. Características biológicas e comportamentais

Todas as espécies de Meliponina são eussociais, embora algumas delas vivam de alimento roubado de colônia de outras espécies (SILVEIRA *et al.*, 2002). Sendo esta subtribo composta por um grande número de espécies diferentes, ela apresenta também padrões bastante distintos no que se refere aos locais de preferência para nidificação, arquitetura do

ninho e também de sua entrada, arranjo das células de cria, sistema de diferenciação de castas femininas etc.

A grande maioria das espécies faz seus ninhos em cavidades pré-existentes como ocos de árvores ou espaços no solo, tais como tocas abandonadas, ou até mesmo dentro de ninhos arbóreos de algumas espécies de cupins. Outras espécies constroem, elas mesmas, seus ninhos em árvores, no caule ou nos galhos, em fendas de rochas etc (VELTHUIS, 1997; SILVEIRA *et al.*, 2002).

Geralmente, a entrada do ninho apresenta detalhes arquitetônicos característicos, permitindo freqüentemente o reconhecimento das espécies (NOGUEIRA-NETO *et al.*, 1986; VELTHUIS, 1997). As células de crias podem estar dispostas de várias maneiras, de modo que, às vezes, estão dispostas em forma de simples cachos de células mal ligadas umas às outras, mas também podendo estar, como na grande maioria das espécies, justapostas formando favos compactos. Os favos compactos podem ter a forma de discos horizontais e/ou algumas vezes até helicoidais. Existem algumas exceções como espécies que apresentam favos de cria dispostos em posição vertical. Além disso, ainda existem tipos de transição entre os favos compactos e os em cachos (NOGUEIRA-NETO *et al.*, 1986; VELTHUIS, 1997; MICHENER, 2000). Segundo MICHENER (2000), não parece irracional supor que as células de crias dispostas em cachos desordenados sejam plesiomórficas (ancestrais) quando comparadas com as células arranjadas em favos.

O sistema de diferenciação das castas dentro dos Meliponina, segundo MICHENER (2000), se apresenta de três formas distintas. No primeiro sistema, encontrado na maioria das abelhas sem ferrão, como, por exemplo, no gênero *Trigona*, rainhas são produzidas em pequenos números dentro de células grandes, geralmente nas margens dos favos. A grande quantidade de comida que é colocada nestas tais células parece ser o fator responsável pelo desenvolvimento de rainhas nelas em lugar de operárias. Já no segundo sistema, encontrado no gênero *Frieseomelitta*, as crias ficam alojadas em células dispostas em forma de cacho, normalmente bem separadas, e não existe a construção de células reais grandes. O que realmente ocorre é que quando duas células acontecem de serem contíguas, uma larva mais velha após ter consumido todo o alimento de sua própria célula, pode furar a célula vizinha e comer o alimento armazenado nela, assim se tornando uma rainha. Finalmente no terceiro sistema, encontrado no gênero *Melipona*, nenhuma célula especial está presente.

As rainhas são do tamanho das operárias quando maduras e são produzidas em grandes números, acima de ¼ de fêmeas maduras em certas estações, sendo que quase todas são logo mortas pelas operárias.

A investigação destas características é de grande valia na construção de hipóteses filogenéticas usadas para explicar as origens evolutivas e diversificações de caracteres (MARQUES, 2001).

3.3. Táxon *Melipona* Illiger, 1806

3.3.1. Considerações gerais

De acordo com MOURE (1951), o gênero *Melipona*, originou-se a partir das linhagens pós-gondwanianas, as quais evoluíram subseqüentemente após mudanças paleontológicas que ocorreram nos novos ambientes que se separaram definitivamente do continente africano durante o Eoceno superior.

Este táxon constitui o gênero de Meliponina com maior número de espécies. O mesmo encontra-se distribuído desde Sinaloa e Tamaulipas, México, até Tucumán e Misiones, Argentina (MICHENER, 2000), sendo mais diversificado na bacia amazônica (SILVEIRA *et al.*, 2002).

Taxonomicamente, o gênero é bastante uniforme. De fato, vários grupos de espécies são tão similares, muitas vezes diferindo, aparentemente, apenas em padrões de cores, o que faz com que muitos autores prefiram classificá-los como subespécies (VELTHUIS *et al.*, 2003).

SCHWARZ (1932) fez a última revisão sobre esse gênero e este reconhecia apenas 14 espécies, mas distinguia um grande número de subespécies e variedades que claramente representavam unidades naturais e que mereceriam o *status* de espécie, dessa forma subestimando muito a riqueza desse táxon (SILVEIRA *et al.*, 2002; VELTHUIS *et al.*, 2003). Outro problema que nos leva a subestimar sua riqueza é a existência de espécies crípticas (MICHENER, 2000), além do grande número de espécies ainda não propriamente reconhecidas, principalmente dentro da complexa fauna da região amazônica (MELO, 2003).

De acordo com a classificação proposta por MOURE (1992) este táxon compreende quatro subgêneros: *Melipona* (*Melipona s. str.*) Illiger, 1806; *Melipona* (*Michmelia*) Moure, 1975; *Melipona* (*Melikerria*) Moure, 1992; *Melipona* (*Eomelipona*)

Moure, 1992, os quais foram baseados totalmente em caracteres morfológicos e refletem as relações de similaridade e afinidade entre as espécies do gênero *Melipona* Illiger (SILVEIRA *et al.*, 2002). Ainda, segundo SILVEIRA *et al.* (2002), o subgênero *Eomelipona* talvez não constitua um grupo monofilético, uma vez que seus caracteres diagnosticados parecem representar apenas simpliomorfias. Porém MICHENER (2000), não reconhece nenhum destes subgêneros, devido à grande similaridade morfológica existente entre eles.

3.3.2. Características biológicas e comportamentais

O gênero *Melipona* é o único dentre todos os outros gêneros de meliponíneos, no qual todas as espécies de abelhas são capazes de criar numerosas pequenas rainhas em células de favos que além de serem idênticas as células de operárias, também se localizam entre as mesmas. A determinação de castas desse táxon é parcialmente genética, no sentido em que uma combinação de fatores tróficos e genéticos determina a casta específica. Então em algumas larvas falta o potencial genético para se tornarem rainhas, enquanto que outras têm esse tal potencial (dupla heterozigose), mas só se tornam rainhas diante de condições tróficas favoráveis (KERR *et al.*, 1967; MICHENER, 2000).

Os ninhos destas abelhas são na maioria das espécies feitos em ocos de árvores, apresentando preferências em relação à altura e, às vezes, em relação à espécie de árvore onde irão instalar-se (NOGUEIRA-NETO *et al.*, 1986), podendo então escolher seus ninhos junto às raízes das árvores, na parte de tronco rente ao solo, no caule propriamente dito ou até mesmo, como no caso da uruçú do chão (*Melipona quinquefasciata*), debaixo do solo, dentro de formigueiros abandonados (NOGUEIRA-NETO *et al.*, 1986; VELTHUIS, 1997; MICHENER, 2000; LIMA-VERDE & FREITAS, 2002). Além do que, a entrada substancialmente elaborada de seus ninhos são geralmente espécies-específicas (SAKAGAMI *et al.*, 1990).

Todas estas características podem fornecer bons dados para se inferir o grau de relacionamento genético, o qual, por sua vez, está relacionado com o tempo geológico (VELTHUIS, 1997). O estudo dessas variações genéticas em populações pode contribuir para a compreensão de seu processo de especiação (TEMPLETON, 1981). Além disso, análises moleculares têm sido uma ferramenta poderosa para inferir o status de espécie e estimar suas

relações evolucionárias, permitindo testar hipóteses sobre o processo de especiação (TEMPLETOM, 1994).

Contudo, apesar de sua importância ecológica existiam poucos estudos genéticos moleculares sobre espécies de *Melipona*. Sendo que estudos neste âmbito em referência a este táxon vêm aumentando, principalmente, desde o início desta última década, como por exemplo: NASCIMENTO *et al.*, 2000; WALDSCHMIDT *et al.*, 2000 e 2002; FERNANDES-SALOMÃO *et al.*, 2002 e 2005; SILVESTRE 2002; COSTA *et al.*, 2003 e 2005; SOUSA *et al.*, 2003; WEINLICH *et al.*, 2004; CRUZ *et al.*, 2006; PEREIRA, 2006; TAVARES, 2007; BARNI *et al.*, 2007 e DE LA RÚA *et al.*, 2007.

3.4. Classificação biológica

3.4.1. Considerações gerais

A partir de épocas remotas, quando o homem passou a deixar vestígios de sua existência na Terra, pôde-se perceber o interesse que o mesmo tinha em conhecer melhor o mundo em que vivia e suas relações com os demais seres vivos. Para a melhor obtenção do conhecimento dessa imensa diversidade de espécies, o homem percebeu que teria que organizar uma estrutura para facilitar seus estudos. Então a partir daí, começou a agrupar os seres vivos, estabelecendo critérios comuns entre eles e que refletissem uma ordem hierárquica natural. Assim, deu-se o início da classificação biológica (BOSCHILIA, 2001).

O campo da biologia que estuda os padrões evolucionários da diversidade biológica chama-se sistemática. Ela inclui a classificação e a identificação das espécies, além do entendimento das suas relações. A sistemática abrange duas grandes áreas da biologia: a taxonomia que procura classificar os organismos com base em similaridades de estrutura ou características; e a filogenia que lida com a identificação e o entendimento das relações entre as espécies que resultam da evolução. Sob a premissa que as espécies evoluem de um ancestral comum, assim sendo, as espécies mais próximas têm mais características em comum do que as mais distantes (BUSO, 2005).

Sistematas conhecidos que iniciaram a classificação dos organismos datam pelo menos da Grécia Antiga, como exemplo, Platão e Aristóteles. Na sistemática, o objeto de estudo são os organismos, sendo as categorias, utilizadas no sistema hierárquico, denominadas táxons e as suas delimitações de uma para outra correspondem aos caracteres biológicos

compartilhados. O termo Táxon define-se como qualquer conjunto de organismos biológicos construídos com base em uma definição (AMORIM, 2002).

Já a moderna classificação biológica começou com o naturalista sueco do século dezoito, Carolus Linnaeus, cuja ambição era nomear e descrever todas as espécies de plantas, animais e minerais. Ele que criou o sistema binomial para designar as espécies de organismos e estabeleceu as principais categorias - Espécie, Gênero, Ordem, Classe e Reino - que são usadas no sistema hierárquico da classificação biológica atual, sendo seu trabalho também fundamentado na lógica de Aristóteles (RAVEN *et al.*, 2001).

Atualmente já se é aceito, quase que universalmente pelos taxônomos, o fato de que as classificações devem refletir as relações evolutivas entre os organismos. Entretanto ainda existem discordâncias em relação a quais processos evolutivos devem ser levados em consideração para serem representados nos esquemas classificatórios (SILVEIRA *et al.*, 2002). Entende-se que a diversidade de seres vivos é resultante de processos evolutivos e que esses processos ocorrem por anagênese e por cladogênese. Anagênese seria a mudança direcional dentro de uma única linhagem, enquanto que a cladogênese seria a ramificação da árvore filogenética através da especiação (FUTUYMA, 2002). Contudo, duas escolas taxonômicas contemporâneas defendem diferentes pontos de vista. Enquanto que a escola da sistemática evolutiva, conhecida também como ortodoxa ou gradista, defende que tanto a cladogênese quanto a anagênese devem estar representadas nas classificações, a escola da sistemática filogenética, também chamada de cladística, por outro lado, argumenta que apenas a cladogênese deve estar representada nas classificações (SILVEIRA *et al.*, 2002).

3.4.2. Nomenclatura: sinônimos e homônimos

De acordo com KERR *et al.* (1996) , os povos pré-colombianos já conheciam as abelhas sem ferrão e as domesticaram, dando-lhes os nomes que ainda hoje persistem na cultura popular brasileira: jataí, uruçú, tiúba, mombuca, irapuá, tataíra, jandaíra, guarupu, manduri e tantas outras. A utilização de nomes vulgares varia de região para região, dificultando a identificação das espécies e sua classificação científica. Tanto que, segundo NOGUEIRA-NETO (1970), a verdadeira jandaíra vive no Nordeste. Na Amazônia há diversas outras abelhas denominadas jandaíra. Provavelmente essa designação é devida à influência dos imigrantes nordestinos.

Logo, verifica-se que os nomes vulgares de abelhas, por sua imprecisão, não oferecem base sólida para o entendimento comum entre pessoas de um país tão grande e variado como o Brasil. Cada Estado ou grupos de Estados tem tradições, costumes, história, clima, topografia, solos, fauna, flora, etc. que lhes são próprios, ou neles apresentam composição diferente. Felizmente existe uma nomenclatura científica latina, que é internacional (CÂMARA *et al.*, 2004).

Então, para serem aceitos como classificações formais, os agrupamentos de organismos devem se ajustar ao esquema hierárquico proposto por Lineu e adotado pela Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica (CINZ). A CINZ publica, e atualiza de vez em quando, o Código de Nomenclatura Zoológica (CNZ), que traz as normas para nomeação dos táxons dentro da hierarquia lineana (SILVEIRA *et al.*, 2002).

Dois dos principais objetivos do CNZ são garantir que cada táxon tenha apenas um nome válido e que duas espécies nunca tenham o mesmo nome. Mesmo assim taxônomos acabam descrevendo, por engano ou ignorância, a mesma espécie mais de uma vez com nomes diferentes (sinônimos), ou dando a espécies distintas o mesmo nome (homônimos). Então o acúmulo de sinônimos e homônimos acaba causando uma grande confusão para a população em geral (SILVEIRA *et al.*, 2002).

3.4.3. Taxonomia tradicional e taxonomia baseada em dados moleculares

A taxonomia tradicionalmente utilizada é a morfológica, entretanto com o avanço da biologia molecular, permitiu-se a aplicação também de dados de ácidos nucleicos a problemas em sistemática, assim mostrando um grande avanço na solução de diversos problemas sistemáticos outrora obscuros (JUDD *et al.*, 1999). Assim como também, para questionar visões sobre classificações propostas anteriormente (RUSSO, 2001).

MOURE & KERR (1950) apresentaram duas sugestões básicas, ambas baseadas em dados morfológicos, que dariam uma melhor estruturação sistemática ao gênero *Melipona* Illiger. A primeira referia-se ao uso de dados biológicos (reprodutivos) para diminuir dúvidas sobre as relações entre espécies e subespécies: sempre que fosse possível detectar híbridos férteis, estes seriam considerados como subespécies da espécie em questão; já sempre que constatada a existência de mecanismos de isolamento, estas, assim, seriam consideradas espécies diferentes. A segunda questão baseava-se nas observações anatômicas da genitália

masculina, pois essa se mostrava variar muito pouco dentro de uma mesma espécie. Sendo essa então considerada como elemento morfológico principal na identificação de espécies em grupos muito homogêneos. A partir desses critérios, MOURE & KERR (1950) foram capazes de distinguir e separar pelo menos oito espécies diferentes outrora classificadas por SCHWARZ (1932) como compo das 22 subespécies de *Melipona fasciata* Latr.

Já recentemente, MELO (2003) encontrou grandes evidências morfológicas que sugerem modificações no status das formas de *Melipona* do grupo *rufiventris*, encontradas no sudeste brasileiro, com o reconhecimento do status de espécie para as populações distribuídas ao longo da Mata Atlântica, cujo nome para esta forma seria *Melipona mondury* Smith, 1863. Assim, o nome *Melipona rufiventris* Lepageletier, 1836 deveria ser aplicado apenas para a forma encontrada no Mato Grosso do Sul, noroeste de São Paulo, oeste de Minas Gerais e sul de Goiás, enquanto o nome *Melipona mondury* Smith, 1863 deveria ser aplicado para a forma presente na Mata Atlântica (de Santa Catarina à Bahia), e que, portanto, esta deveria ser reconhecida como uma espécie à parte. Juntamente, o material proveniente do Ceará (Serra do Baturité, Viçosa do Ceará, Ubajara) e Rio Grande do Norte (Martins) foi também examinado e, embora as abelhas apresentem tamanho corporal menor, elas seriam enquadradas na espécie *M. mondury* (MELO, 2003).

Mais recente ainda, BARNI *et al.* (2007) através de análises do DNA mitocondrial foram capazes de mostrar que as espécies de abelha sem ferrão *M. mondury* e *M. rufiventris*, anteriormente consideradas como espécies únicas com uma ampla distribuição geográfica no Brasil, podem ser consideradas espécies distintas devido a variabilidade genética detectada entre elas, desse modo corroborando com MELO (2003) que havia baseado suas análise apenas em dados morfométricos.

Dessa forma, as classificações biológicas são um depósito de informação, ou melhor, uma fonte sintética de informação sobre a ordem que somos capazes de perceber na diversidade biológica em determinado momento (AMORIM, 2002). De maneira que a existência de classificações estáveis são evidências da falta de continuidade no estudo da biologia dos organismos. O que não é o caso das abelhas, que são os organismos vivos mais intensamente estudados na atualidade e isto tem se refletido numa atualização constante de sua classificação (SILVEIRA *et al.*, 2002).

3.5. Sistemática filogenética

3.5.1. Considerações gerais

A sistemática filogenética é uma escola de classificação biológica, cuja metodologia busca refletir a história evolutiva dos grupos de organismos e reuni-los com base no grau de parentesco filogenético, a qual foi proposta por Willy Henning em 1950 (BUSO, 2005; MIYAKI *et al.*, 2001). O centro da proposta de Henning é que as classificações biológicas devem ser um reflexo inequívoco do conhecimento atual sobre as relações de parentesco entre os táxons (AMORIM, 2002). Para que se possa fazer essas classificações de acordo com as relações evolutivas faz-se necessário que sejam identificadas as características ancestrais e derivadas. Características ancestrais, também denominada de plesiomórficas ou primitivas, são um conjunto de características que foram herdadas sem nenhuma alteração desde ancestrais remotos, enquanto que, as derivadas, também conhecidas como apomórficas são características que sofreram mudanças recentes, e quando esses caracteres são compartilhados por diversas espécies denominam-se caracteres simplesiomórficos e sinapomórficos, respectivamente (FUTUYMA, 2002).

Segundo Henning (1950) citado por MIYAKI *et al.* (2001), os organismos que compartilhassem condições derivadas (apomórficas) de caracteres poderiam ser hipotetizados como sendo descendentes da espécie ancestral na qual a condição primitiva (plesiomórfica) passou, por mutação, à condição derivada. Dessa forma, inferências sobre a história filogenética dos grupos só podem ser feitas quando é possível verificar o compartilhamento de características apomórficas por um conjunto de espécies, indicando a existência de uma espécie ancestral de todo um grupo, na qual a mutação surgiu.

O papel da sistemática é, portanto, além de realizar o trabalho tradicional da taxonomia, realizar o trabalho de organizar o conhecimento sobre a diversidade biológica a partir da relação de parentescos entre os grupos e do conhecimento da evolução das características morfológicas, comportamentais, ecológicas, fisiológicas, citogenéticas e moleculares dos grupos (MIYAKI *et al.*, 2001).

Os resultados dos estudos sistemáticos são representados graficamente na forma de cladogramas ou árvores filogenéticas, indicando a relação histórica entre os organismos. Um cladograma é uma estrutura matemática usada como modelo para refletir a história evolutiva

dos táxons estudados. A árvore filogenética consiste de pontos (ou nós) ligados por linhas (ou ramos). Essas últimas apresentam dois tipos de nós: os internos e os terminais. Os nós terminais representam as OTUs, unidades taxonômicas operacionais (Operational Taxonomic Units), que são os táxons a respeito dos quais se pretende estabelecer relações de parentesco, unidas por ramos cujo nó interno representa o ancestral comum mais recente desses táxons (MIYAKI *et al.*, 2001). Para isso a escola da sistemática filogenética considera que todos os táxons da classificação devem ser monofiléticos e todas as informações entre os grupos-irmãos devem estar expressas (AMORIM, 2002). Grupos monofiléticos são definidos por um grupo de organismos que apresenta um ancestral em comum exclusivo, ou seja, que não é ancestral de nenhum outro membro externo ao grupo (MIYAKI *et al.*, 2001).

Um conceito importante em reconstrução filogenética é o de grupo externo, o qual se entende por ser toda e qualquer espécie ou grupo de espécies que filogeneticamente não pertença ao grupo, supostamente monofilético, abordado num dado momento de uma análise (AMORIM, 2002). Assim, os grupos externos devem apresentar condições mais plesiomórficas a dos grupos internos (MIYAKI *et al.*, 2001). Desse modo sendo os grupos externos capazes de dar o sentido do tempo na análise de um grupo, o que acaba provendo a raiz da árvore filogenética, que corresponde ao ancestral comum mais recente de todos os membros do grupo interno (GRAUR & LI, 2000) citado por MIYAKI *et al.* (2001).

Os grupos externos devem sempre ser assumidos com base em dados anteriores que indiquem que é um táxon próximo, mas que necessariamente divergiu antes do processo de diferenciação dos táxons do próprio grupo interno. Então o uso de um grupo externo permite o estabelecimento da direção das modificações evolutivas, assim determinando os estados primitivos ou derivados de um determinado caráter, ou seja, ele permite a polarização do caráter (MIYAKI *et al.*, 2001).

Um dos grandes problemas da inferência filogenética é agrupar espécies em grupos monofiléticos utilizando somente caracteres homólogos, ou seja, que reflitam uma relação de parentesco, evitando utilizar homoplasias, caracteres semelhantes compartilhados não adquiridos de um ancestral em comum recente, provenientes de convergência evolutiva, paralelismo ou reversão (FUTUYMA, 2002; SCHNEIDER, 2003).

Bem recentemente, os dados da sistemática foram muito enriquecidos pela biologia molecular, assim fazendo com que organismos não sejam comparados apenas através de seus fenótipos, mas também pelas seqüências de seu DNA (FUTUYMA, 2002).

Em termos moleculares, dois genes são homólogos se eles descendem de uma mesmo ancestral. No caso da origem de genes homólogos por um evento de duplicação, eles são chamados de parálogos. Quando os genes passaram a ter histórias evolutivas independentes (divergência gênica) a partir de um evento de especiação, eles são chamados ortólogos. Desse modo devem ser utilizados genes ortólogos para reconstrução filogenética de grupos taxonômicos (RUSSO, 2001).

3.5.2. Filogenia molecular

Filogenias são baseadas no princípio de que todos os organismos atuais e extintos são interligados por relações de ancestralidade comum. A principal meta dos estudos filogenéticos é levantar as hipóteses mais prováveis sobre história evolutiva entre os organismos. Com base no princípio de ancestralidade comum, a evolução ocorre por processos de ramificação, onde uma linhagem se divide em duas ou mais, portanto, as hipóteses sobre as relações evolutivas entre os organismos são ilustradas em gráficos chamados de árvores filogenéticas. O padrão de ramificação de uma árvore é chamado de topologia (GRAUR & LI, 2000). Muitas são as aplicações dos estudos filogenéticos, entre elas, estabelecer sistemas de classificação biológica que refletem a evolução dos organismos e permitir interpretações de diversos processos evolutivos morfológicos, moleculares e biogeográficos. Com o desenvolvimento das técnicas moleculares, surgiu a filogenia molecular, que se refere à filogenia macromolecular, que é o estudo dos padrões de ancestralidade e do grau de parentesco entre os organismos pelo uso de dados moleculares, como seqüências de ácidos nucléicos e proteínas, entre outros marcadores moleculares (MORITZ & HILLIS, 1996; GRAUR & LI, 2000; VARELA, 2003).

Os dados de seqüência molecular podem ser utilizados para estimar filogenias por qualquer das diversas técnicas cladísticas, isto é, aquelas que procuram características derivadas, as quais, no caso dos dados de seqüência, são as substituições de nucleotídeos (FUTUYMA, 2002).

As principais vantagens dos dados moleculares são permitir a comparação de ácidos nucleicos, investigando assim diretamente a situação genotípica, dessa forma detectando variações em nível de DNA entre qualquer grupo de organismos, não importando o nível em que eles se encontram, desse modo, pode-se excluir influências ambientais. Outra vantagem é que as análises podem ser feitas em estágios de desenvolvimento primordiais (BUSO, 2005), além da grande vantagem de que são entidades estritamente herdáveis de uma geração para outra (NEI & KUMAR, 2000). Entretanto quando se trabalha com dados morfológicos, isso não é necessariamente verdadeiro, já que o fenótipo pode ser influenciado de forma direta ou indireta por diversos fatores ambientais. No entanto, é necessária uma combinação de dados moleculares e morfológicos para melhor elucidar tais problemas, uma vez que a filogenia baseada só em dados moleculares pode conduzir a interpretações errôneas, pois ela não necessariamente reflete a filogenia das espécies investigadas (TORRES, 2007).

3.6. Mutagênese

Mutações são mudanças permanentes que ocorrem nos genes. Como os genes são compostos por polímeros de desoxirribonucleotídeos de timina (T), adenina (A), citosina (C) e guanina (G), então mutações, na realidade, ocorrem quando acontecem alterações nas seqüências de suas bases nitrogenadas (NETTO & MENCK, 2001).

Seqüências de DNA são copiadas com grande exatidão durante a replicação do material genético. Contudo, alguns erros podem, muito raramente, ocorrer durante a própria replicação ou no reparo do DNA replicado. Esses erros, também denominados de mutações, são o que possibilitam a origem de novas seqüências. As mutações representam uma fonte de variação e ao mesmo tempo novidade nos processos evolutivos (GRAUR & LI, 2000).

As mutações podem ser classificadas com base no comprimento da seqüência de DNA afetada pelo evento de mutação. Podendo, assim ser: mutações pontuais, ou seja, que afetam apenas um nucleotídeo; ou mutações segmentadas, isto é, que afetam vários nucleotídeos adjacentes (PAGE & HOLMES, 2001).

Podemos ainda classificar as mutações com relação ao tipo de mudança observada no DNA. Essas mudanças podem ser de quatro tipos. Elas podem envolver: (1) a substituição de um nucleotídeo por outro; (2) a deleção ou (3) a inserção de um nucleotídeo da seqüência,

e (4) a inversão de nucleotídeos, na qual ocorre a rotação de 180° de um segmento de DNA dupla-fita composto por um ou mais pares de bases.

As substituições nucleotídicas são divididas em dois tipos: transições e transversões. Transição, quando uma purina (A e G) é incorporada no lugar de outra purina, ou quando uma pirimidina (C e T) é incorporada no lugar de outra pirimidina; Transversão, quando uma base do tipo purina é substituída por uma do tipo pirimidina e vice-versa (PAGE & HOLMES, 2001).

Um dos fenômenos explorados na filogenética molecular são as diferenças nas frequências de substituições dos nucleotídeos mencionados. Geralmente as transições são mais frequentes do que as transversões, uma vez que esta última gera uma distorção na largura do DNA, sendo assim a probabilidade do sistema de reparo da célula atuar neste tipo de mutação ser bem maior (PAGE & HOLMES, 2001). Entretanto, quando se está estudando a divergência entre duas espécies, quanto mais divergente elas forem menor será o número de transições em relação ao de transversões (SCHNEIDER, 2003).

Existe uma relação entre o número de substituições e o tempo de divergência entre duas seqüências. O número de diferenças entre duas seqüências, com o aumento do tempo, torna-se uma estimativa cada vez menos acurada em relação ao verdadeiro número de substituições que ocorreram desde a divergência das seqüências do ancestral comum. A relação entre a diferença da seqüência e o tempo decorrido desde a divergência não é linear, e sim hiperbólica, devido à ocorrência de múltiplas mudanças no mesmo sítio (PAGE & HOLMES, 2001). Isso acontece, pois existem regiões do DNA que apresentam uma alta taxa de mutação. Desse modo, o conhecimento do tipo bem como da função da região de DNA em estudo é fundamental porque as mudanças nas seqüências nucleotídicas variam extensivamente com a região de DNA em questão (SOARES, 2005).

No decorrer do tempo, o número de diferenças entre duas seqüências pode ser cada vez menos acurado e informativo para se inferir uma filogenia, uma vez que haja uma saturação de substituições durante o processo evolutivo entre essas. Dessa forma, ao se trabalhar com conjuntos de seqüências, para estudo das relações filogenéticas, deve-se fazer a análise de saturação de dados. Dar uma continuação a uma análise filogenética quando se evidencia saturação pode se levar a subestimar eventos evolutivos importantes que possam ter ocorrido durante o tempo, desde a divergência inicial (PAGE & HOLMES, 2001).

3.7. Marcadores moleculares

3.7.1. Considerações gerais

Marcadores baseados na morfologia podem ser facilmente monitorados, entretanto, podem ser influenciados pelo ambiente. Além do que, alguns somente podem ser identificados em estágios tardios do desenvolvimento o que impossibilita sua caracterização precoce (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Contudo, com o advento dos marcadores moleculares, as limitações dos marcadores morfológicos foram superadas (SOARES, 2005).

Entende-se por marcadores moleculares características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente (MILLACH, 1999).

A matéria bruta dos estudos em biodiversidade molecular é a mesma envolvida na evolução das espécies: a variabilidade gênica. É essa variabilidade que nos permite comparar indivíduos, populações ou espécies diferentes (SOLÉ-CAVA, 2001).

Algumas áreas do DNA são neutras com respeito à seleção, essas não evoluem por meio de seleção natural porque as mutações nestas áreas não afetam o fenótipo do organismo. Ou seja, a seleção natural depende de diferenças no fenótipo que representem diferenças de adaptação. Se indivíduos com mutações diferentes no DNA tiverem o mesmo fenótipo, provavelmente, eles terão a mesma capacidade de adaptação. Entretanto, outras áreas do DNA podem afetar o fenótipo, assim não sendo consideradas neutras com respeito à seleção natural. Se o DNA codifica para alguma característica que quando sofre mutação afeta o fenótipo, muitas mutações, provavelmente resultarão num fenótipo que não funciona apropriadamente. Portanto, estas mutações letais serão perdidas ou permanecerão a uma frequência muito baixa nas populações. Como somente poucas mutações nestas áreas seguem adiante, a evolução nestas áreas tende a ser muito lenta. Já nas áreas de DNA neutro com respeito à seleção, qualquer mutação pode ir adiante e vir a ser comum e a evolução provavelmente será bem mais rápida (BUSO, 2005).

Assim, marcadores moleculares podem representar uma metodologia auxiliar para dimensionar com precisão a análise da variabilidade genética existente nas populações, sujeitos ou não à ação seletiva. Todavia, é cada vez mais improvável que existam marcadores soberanos da variabilidade existente. Espera-se que combinações múltiplas forneçam parâmetros mais seguros na avaliação da diversidade. Além disso, os valores adaptativos dos

marcadores podem servir a hierarquização do nível de aferição da diversidade (MASCARA, 2007).

Marcadores moleculares diferentes podem ter taxas de substituições/evolução diferentes, de modo que, através de uma escolha sensata desses marcadores, podemos estudar desde problemas de identificação de indivíduos à identificação de espécies crípticas ou formulação de hipóteses filogenéticas em grupos supra-específicos (SOLÉ-CAVA, 2001).

O desenvolvimento de marcadores moleculares está diretamente relacionado aos avanços no campo da biologia molecular. A caracterização recente de genomas completos ou parciais e o conhecimento das bases moleculares da variação genética têm sido fontes muito importantes para o desenvolvimento de marcadores e para o estabelecimento de modelos evolucionários nos níveis inter e intra-específicos (LI, 1997) citado por ARIAS *et al.* (2006).

Nas últimas décadas numerosos marcadores moleculares têm sido caracterizados e estes têm sido empregados em estudos de uma grande variedade de organismos, e os dados resultantes têm, com bastante êxito, adicionado novos e em alguns casos informações surpreendentes sobre biologia, ecologia, comportamento, dinâmica da população e evolução das espécies (ARIAS *et al.*, 2006). O que mostra que marcadores moleculares têm cada vez mais se tornado uma ferramenta poderosa na análise filogenética (BUSO, 2005).

3.7.2. Genes nucleares que codificam para RNAs ribossômicos

As seqüências dos genes nucleares que codificam para RNAs do complexo ribossômico vêm sendo amplamente utilizadas como *locus* para inferir relações entre diversos organismos (LIMA, 2003).

O genoma dos procariotos é composto majoritariamente por seqüências de DNA codificantes de produtos estruturais (proteínas ou RNAs), enquanto que o genoma dos eucariotos está organizado em seqüências de DNA codificante e não codificante (NAHUM, 2001). Das muitas classes dessas seqüências os genes ribossômicos sejam, talvez, o de maior potencial para o sitemata (DOYLE, 1987) citado por LIMA (2003).

Os RNAs ribossômicos são componentes essenciais na fisiologia celular. Estes componentes interagem de modo específico com as proteínas ribossômicas para formar as subunidades dos ribossomos que atuam na síntese de proteínas. Os RNAs são o principal produto da transcrição em qualquer célula, constituindo geralmente de 80 a 90% da massa de

RNA total dos procariontes e eucariontes. Nos eucariontes, essas seqüências estão organizadas em centenas de repetições dispostas em série e agrupadas em uma ou mais regiões cromossômicas (GORAB, 2001; NAHUM, 2001).

É a natureza repetida dos genes da família do rRNA que os torna útil para o sistemata. Há fortes indícios de que as unidades individuais (repetições) do rDNA não evoluem em total independência uma da outra, um fenômeno que é também conhecido para outros genes e chamado de evolução em concerto. Este fenômeno leva a padrões de variação espécie-específica, e quando combinados com alto número de cópias da família gênica facilita a análise por métodos de biologia molecular (DOYLE, 1987; RUSSO, 2001).

De forma geral, cada unidade de repetição do rDNA eucarionte possui uma organização conservada, consistindo de: (1) um espaçador externo (ETS), transcrito em uma seqüência que contém a extremidade 5' da molécula precursora do rRNA; (2) uma região que codifica para rRNA 18S; (3) um espaçador interno que é transcrito (ITS) e que contém a região que codifica para rRNA 5,8S; e (4) uma região que codifica para 28S, além de um espaçador externo (NTS), que não é transcrito. Seus transcritos primários incluem o SSU rDNA (subunidade pequena), 5,8S e o LSU rDNA (subunidade grande) separados pelos dois espaçadores transcritos internos, ITS1 e ITS2 (FIGURA 01) (GORAB, 2001; LIMA, 2003).

Vários componentes da unidade de repetição dos genes de rRNA têm sido estudados com um enfoque evolutivo, como é o caso dos genes que codificam para o rRNA 18S, 25-28S, a região do NTS, e mais recentemente, a região que contém o ITS (GORAB, 2001).

Devido a essencialidade da sua função, os genes codificadores da região do rRNA evoluem de maneira mais lenta, pois modificações pontuais em sítios específicos podem determinar a inativação da função da subunidade comprometendo a síntese protéica, fato que ocasiona a morte do indivíduo. Por serem regiões não codificadores o ETS e o ITS sofrem uma pressão seletiva diferenciada em relação aos genes codificadores, portanto evoluem mais rapidamente, acumulando maior número de mutações (JORGE, 2004).

3.7.3. O espaçador transcrito interno (ITS)

O espaçador transcrito interno (ITS) está relacionado com o transcrito primário do arranjo ribossomal (MAI & COLEMAN, 1997). A excisão correta dos espaçadores no

processamento do pré-rRNA é passo fundamental na biogênese de uma unidade ribossomal ativa (VAN NUES *et al.*, 1995; OLIVERIO *et al.*, 2002).

A região ITS do DNA ribossômico nuclear, definida como a unidade contendo o espaçador ITS1, o gene 5,8S rRNA, e o espaçador ITS2 (FIGURA 01), tem provado ser uma molécula útil para determinar relações taxonômicas entre vários táxons (JOBES & THIEN, 1997).

A necessidade de marcadores filogenéticos do genoma nuclear para completar os crescentes dados de DNA mitocondrial levou ao reconhecimento da região ITS como uma nova escolha para os sistematas (JOBES & THIEN, 1997).

No passado, a variação de DNA nas regiões espaçadoras era analisada através de RFLP (polimorfismo no tamanho dos fragmentos de restrição), porém recentemente estas regiões e, em particular, o espaçador transcrito interno (ITS) tem sido analisado mais freqüentemente através da tecnologia da PCR (reação em cadeia da polimerase). Trechos conservados de DNA em regiões rDNA codificantes adjacente ao ITS podem ser convenientemente usadas para projetar iniciadores (primers) “universais” para amplificação de regiões espaçadoras de alta variação. Vários estudos têm aplicado essa metodologia entre populações e táxons proximamente relacionados (VOGLER & DESALLE, 1994).

O espaçador transcrito interno-1 (ITS1) é parte do locus do rDNA eucariótico. O ITS1 separa duas regiões funcionais: a 18S rDNA e a 5,8S rDNA (FIGURA 01). Este espaçador é um elemento não codificante de relativamente rápida evolução. Ele é bastante utilizado em reconstruções filogenéticas de táxons proximamente relacionados (ARMBRUSTER & KORTE, 2006).

A região ITS1 do rDNA do táxon *Melipona* demonstra um grande potencial filogenético para estudos entre espécies (FERNANDES-SALOMÃO *et al.*, 2005), como também pode ajudar a resolver dúvidas taxonômicas em nível de subgênero do mesmo, e além disso pode servir para avaliar a variação intra-específicas em populações de abelhas, como demonstrado para *M. subnitida* PEREIRA (2005) e CRUZ *et al.* (2006).

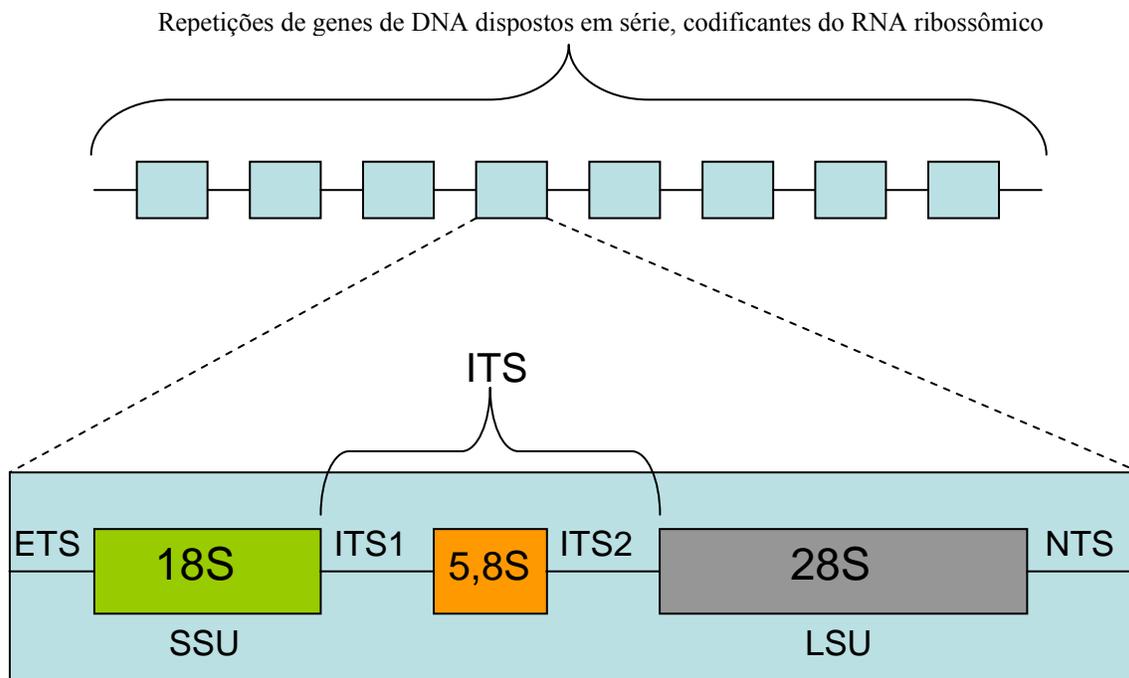


FIGURA 01 – Representação esquemática do DNA ribossômico nuclear e suas regiões.

3.8. Bioinformática

3.8.1. Considerações gerais

Com a descoberta do código genético e do fluxo da informação biológica, dos ácidos nucleicos para as proteínas, tais polímeros passaram a constituir os principais objetos de estudo de uma nova ciência, a biologia molecular. Logo surgiram métodos de seqüenciamento desses polímeros, principalmente do DNA, que permitiam a investigação de suas seqüências monoméricas constituintes. Desde então, um grande número dessas seqüências já foram produzidas e estão disponíveis nos bancos de dados públicos. Sendo que com o surgimento dos seqüenciadores automáticos de DNA, nos meados da década de 90, houve uma explosão na quantidade de seqüências a serem armazenadas, exigindo recursos computacionais cada vez mais eficientes. Além do armazenamento ocorria, paralelamente, a necessidade de análise desses dados, o que tornava indispensável à utilização de plataformas computacionais eficientes para a interpretação dos resultados obtidos. Assim, nascia a bioinformática que como uma nova ciência envolveria a união de diversas linhas de conhecimento como engenharia de softwares, matemática, estatística, ciência da computação e a biologia molecular. Portanto, a bioinformática pode ser definida como sendo uma ciência

que utiliza os computadores para aquisição, gerenciamento e análise das informações biológicas (CORPET & CHEVALET, 2000; PROSDOCIMI *et al.*, 2003).

Hoje em dia os termos biologia computacional e bioinformática são usados freqüentemente sem distinção em função da linha comum de projetos de pesquisa e desenvolvimento de ferramentas de atualização e recuperação de informações em banco de dados públicos. Na realidade, a biologia computacional é mais abrangente, pois busca técnicas algorítmicas e métodos computacionais para criar estas ferramentas. Já a utilização em laboratório de equipamentos como seqüenciadores automáticos de DNA e de proteínas, analisadores de expressões gênicas e sintetizadores de ácidos nucléicos, entre outros, pertencem ao campo da bioinformática (VIANA, 2007)

3.8.2. Métodos utilizados para reconstrução filogenética

Uma das aplicações mais antigas da bioinformática é a de desenvolvimento de programas que, a partir das seqüências de DNA ou de proteínas de diferentes organismos, sejam capazes de reconstruir a relação de parentesco entre as espécies, o que chamamos de sistemática molecular, ou de reconstruir o parentesco entre as espécies associando essas informações a uma escala temporal, o que chamamos de filogenia molecular. A representação gráfica desses resultados é feita na forma de árvores filogenéticas (PAGE & HOLMES, 2001; PROSDOCIMI *et al.*, 2003).

Como já mencionado anteriormente, para realizar inferências a respeito das relações de parentesco entre organismos, tomando como base seqüências de DNA ou proteínas, o primeiro passo é identificar seqüências de interesse que apresentem ancestralidade comum, ou seja, que sejam homólogas. É importante ressaltar que, ao se fazer uma reconstrução filogenética, a escolha de seqüências homólogas é fundamental para gerar uma árvore confiável, pois só assim se tem certeza de estar comparando um mesmo marcador que apresenta similaridades entre vários organismos a partir de uma origem comum, garantindo que eles compartilham um mesmo ancestral. Quando não se comparam caracteres homólogos, pode-se incidir no erro de considerar similaridades sem origem comum e, portanto, com histórias evolutivas diferentes. Uma das formas de avaliar esta escolha é incluir nas análises, seqüências de grupos externos (organismos com história evolutiva conhecida em relação ao

grupo em estudo), que funcionam como controles no processo de reconstrução de parentescos (PROSDOCIMI *et al.*, 2003).

Uma vez selecionadas as seqüências homólogas dos organismos de interesse e de grupos externos, será necessário realizar o alinhamento múltiplo entre elas e então gerar árvores filogenéticas a partir de métodos de distância, também conhecidos por métodos geométricos: UPGMA, *neighbor joining* (NJ) etc., ou a partir de caracteres discretos: máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) etc., para assim poder realizar a inferência filogenética desejada (PAGE & HOLMES, 2001; PROSDOCIMI *et al.*, 2003).

Os métodos pertencentes à primeira abordagem são baseados em medidas de distância, estimadas pelo cálculo do número de substituições de nucleotídeos entre as seqüências comparadas. Já os da segunda abordagem estão relacionados ao estado de um caráter, como a presença ou ausência de uma deleção ou inserção (denominados de “indels”) numa certa porção do DNA (CIDRACK, 2003).

Este primeiro método resume-se na construção de uma matriz de distância, na qual a divergência entre duas seqüências é calculada através de uma única medida, utilizando-se um modelo de substituições de nucleotídeos (RUSSO *et al.*, 2001; SCHNEIDER, 2003). Em contrapartida, os métodos discretos analisam todos os caracteres diretamente, levando em consideração cada sítio de um alinhamento de seqüências (PAGE & HOLMES, 2001; SCHNEIDER, 2003).

Quando as taxas de substituição variam entre as linhagens, deve-se utilizar um método de distância diferente, como o do agrupamento do vizinho mais próximo (*Neighbor-joining* - NJ), desenvolvido por SAITOU & NEI (1987). Ele é um dos métodos mais comumente usados e se baseia no da Evolução Mínima, no qual se procura a árvore com menor soma de ramos (CAVALLI-SFORZA & EDWARDS, 1967 *apud* RUSSO *et al.*, 2001). No entanto, o método de evolução mínima, originalmente descrito, demandava muito tempo computacional, uma vez que todas as árvores possíveis tinham que ser construídas para que a soma mínima fosse encontrada. Então se buscou um método heurístico mais rápido e eficaz, hoje conhecido por agrupamento do vizinho mais próximo (RUSSO *et al.*, 2001).

O método de NJ inicia-se com a análise de uma árvore sem resolução, ou seja, em forma de estrela. A cada passo posterior busca-se um par de vizinhos que minimize a soma total dos ramos da árvore, assim formando uma bifurcação, até que se obtenha uma árvore

completamente resolvida. Uma consequência imediata disso é que uma árvore de NJ sempre será totalmente resolvida, ou seja, nunca vai apresentar politomias (NEI & KUMAR, 2000).

Quando se está trabalhando com um método de distância, além de ter que escolher qual o método mais apropriado para a construção da árvore filogenética, deve-se saber qual o modelo de substituições nucleotídicas mais apropriado para se estudar a evolução de um dado grupo taxonômico, o qual vai ser utilizado para se obter a matriz de distância (SCHNEIDER, 2003). POSADA & CRANDALL (1998) desenvolveram um programa chamado *ModelTest* o qual realiza o teste estatístico da razão de verossimilhança, que compara modelos progressivamente mais complexos. Para isto duas hipóteses são testadas: a hipótese nula, que está relacionada a um modelo mais simples, e a hipótese alternativa, que está relacionada a um modelo mais complexo. Então a partir dos cálculos realizados a hipótese nula será ou não rejeitada, assim levando à escolha do modelo de evolução do DNA mais apropriado aos dados utilizados.

Em relação aos métodos discretos, o da máxima parcimônia (MP) é um dos mais bem conhecidos. O critério da parcimônia é historicamente associado à análise cladística, originalmente delineada por HENNIG (1950) *apud* MEYER (1996). Este método define como melhor hipótese filogenética aquela que apresenta o menor número de passos, sendo cada passo definido como uma mudança de estado de caráter (MEYER, 1996). No caso da utilização de seqüências de DNA para gerar árvores filogenéticas, o método analisa cada sítio separadamente distinguindo-os em variáveis ou não, ou seja, aqueles sítios que apresentam alguma mudança nucleotídica em pelo menos uma das seqüências utilizadas. Posteriormente, dentre os variáveis, há a distinção entre os informativos ou não, à parcimônia. Um sítio é filogeneticamente informativo caso favoreça a determinação de uma árvore em relação a outras (GRAUR & LI, 2000).

A análise de máxima parcimônia vem sendo criticada por requerer uma constância nas taxas de substituição nucleotídica entre as linhagens estudadas (BROCCHIERI, 2001). YANG (1996) testou, através de simulações computacionais, o desempenho do método da máxima parcimônia em gerar uma árvore verdadeira utilizando-se diversos modelos de substituição nucleotídica. Ele então constatou que o desempenho da análise se deteriora quando as taxas de substituição dos nucleotídeos diferem entre as linhagens.

Por último, há o método da máxima verossimilhança (*Maximum-likelihood* - ML) desenvolvido por FELSENSTEIN (1981). Este método é baseado em modelos probabilísticos de evolução, podendo levar em consideração parâmetros como a taxa de mutação entre seqüências de DNA e a sua frequência de pares de bases (NEI & KUMAR, 2000). O algoritmo de ML considera todas as árvores possíveis na sua busca por árvores filogenéticas. Portanto, é um método que demanda um maior tempo computacional e requer modelos simples o suficiente para permitir um tratamento analítico, sendo necessário supercomputadores quando se trabalha com um largo espectro de seqüências (GRAUR & LI, 2000; MOUNT, 2004; PEREIRA *et al.*, 2001). De acordo com ZHANG (1999), o método de ML falha em representar de maneira realística os diversos fatores e obstáculos que caracterizam os processos naturais de evolução.

O método de máxima verossimilhança também é bem semelhante ao da máxima parcimônia, no qual as árvores são construídas com o menor número de passos levando em consideração as mudanças de estado de caráter. Entretanto, o método de ML possui uma ferramenta a mais para avaliar as topologias geradas, ele leva em consideração a variação nas taxas de mutação entre as linhagens estudadas de acordo com um modelo evolutivo escolhido. Além disso, este método pode explorar as relações evolutivas entre seqüências que apresentam alta variabilidade, condições que não são bem exploradas quando se escolhe o método da máxima parcimônia (MOUNT, 2004).

3.8.3. *Bootstrap* (teste de confiança de topologias)

A cada vez que um programa de filogenia molecular é rodado para gerar uma árvore sobre o conjunto de dados escolhidos, o resultado pode ser diferente. Por isso, para validar uma árvore filogenética, o que se faz é rodar repetidas vezes o programa escolhido e, estatisticamente, testar cada ramo para escolher um a um aqueles com maior probabilidade de ocorrência para a composição final da árvore. O método estatístico mais usado nessas análises é o chamado *bootstrap* (PROSDOCIMI *et al.*, 2003).

O objetivo do *bootstrap* é realizar uma simples reamostragem com uma reposição pseudoaleatória dos dados. Caracteres da matriz original são amostrados aleatoriamente e transferidos para a matriz do *bootstrap*, mantendo-se sempre o número total de dados amostrados constante. Todos os caracteres da matriz original apresentam probabilidade igual

de serem amostrados, logo há chance de alguns serem contados mais de uma vez, enquanto outros nem chegarão a serem amostrados. Esse processo é repetido várias vezes à escolha do usuário, gerando diversas matrizes de *bootstrap* e por consequência diversas árvores-réplicas. Ao final do teste, compara-se cada uma das árvores-réplica com a original, sendo o valor do *bootstrap* o percentual de vezes que um mesmo agrupamento da árvore original foi obtido nas árvores-réplica (MEYER, 1996; NEI & KUMAR, 2000; RUSSO *et al.*, 2001).

A intenção original do *bootstrap* é buscar quantificar até que ponto os grupos inferidos a partir de uma matriz de dados original são consequência de artefatos amostrais. Esta confiabilidade, entretanto, não diz respeito à chance de uma inferência estar ou não correta (MEYER, 1996).

Em contrapartida, de modo a avaliar a relação entre os valores de *bootstrap* para grupos monofiléticos e a ocorrência desses mesmos em árvores verdadeiras, HILLIS & BULL (1993), através do emprego de simulações de computador, verificaram que estes valores são estimativas conservadoras e precisas para se inferir a árvore verdadeira. Valores de 75% correspondem à probabilidade de inferência correta de 95% ou mais, para as simulações. Portanto, o *bootstrap* pode trazer informação sobre a precisão de uma inferência filogenética (MEYER, 1996).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Localização do experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Genética Molecular (LGM) localizado na Universidade Federal do Ceará. Porém para realização do mesmo foram coletadas e enviadas ao LGM-UFC amostras de abelhas (operárias) do táxon *Melipona* de variadas regiões do país (TABELA 01).

TABELA 01- Espécies extraídas no Laboratório de Genética Molecular com seus respectivos subgêneros, locais de coleta e responsáveis pela coleta.

Subgênero	Espécie	Local de coleta (Cidade/Estado)	Responsável pela coleta
<i>Melikerria</i>	<i>Melipona fasciculata</i> Smith, 1858	Belém – PA	Giorgio Venturieri
<i>Michmelia</i>	<i>Melipona flavolineata</i> Friese, 1900	Belém – PA	Giorgio Venturieri/ Marcelo Cavalcante
<i>Michmelia</i>	<i>Melipona mondury</i> Smith, 1863	Rio Vermelho - MG	Darci Cruz
<i>Michmelia</i>	<i>Melipona mondury</i> Smith, 1863	Pacoti –CE	Luiz Lima-Verde
<i>Michmelia</i>	<i>Melipona mondury</i> Smith, 1863	Guaramiranga - CE	Luiz Lima-Verde
–	<i>Scaptotrigona</i> sp. Lepelletier, 1836	Maranguape - CE	Igor Reis

4.2. Coleta das amostras

Todos os espécimes foram coletados por meio de rede entomológica ou sugadores colocados na entrada do ninho, com o intuito de garantir que cada amostra fosse composta por espécimes da mesma colônia. O número mínimo de abelhas amostradas por colônia foi de 15 operárias. Logo após coletadas, as amostras eram acondicionadas em tubos tipo *Falcon* contendo etanol de 70 a 100%. Em alguns casos, devido à falta, foram utilizados recipientes limpos e rosqueados contendo álcool comum. Este procedimento se fez para minimizar a degradação do material genômico, pela ação das DNases, que poderiam alterar a qualidade final do resultado do seqüenciamento (JORGE, 2004; PEREIRA, 2006). Também durante as

coletas as amostras foram etiquetadas com relação ao local (propriedade/cidade), data e responsável pela coleta. Após todos esses procedimentos as amostras foram enviadas o mais rápido possível ao LGM-UFC. Logo quando as amostras chegavam, parte das abelhas contidas em cada amostra era tombada e depositada no Museu do Grupo de Pesquisas com Abelhas (MGPA), localizado também na Universidade Federal do Ceará, e a outra parte das amostras era conservada na geladeira para sua posterior extração de DNA no LGM-UFC.

4.3. Extração e isolamento do DNA genômico das amostras

Toda a metodologia de extração dos espécimes de abelhas deste experimento foi baseada nos trabalhos de JORGE (2004); CRUZ *et al.* (2006) e PEREIRA (2006), os quais basearam sua metodologia no protocolo que utiliza o reagente CTAB (Brometo de Cetiltrimônio) descrito por FOSTER & TWELL (1996), com algumas modificações.

O DNA genômico das amostras foi obtido a partir do mesossoma de três a cinco abelhas, de cada colônia, dependendo do tamanho do espécime.

Os tórax das abelhas de cada amostra eram macerados com auxílio de grau e pistilo na presença de nitrogênio líquido. O pó obtido através da maceração era transferido para um tubo tipo *ependorf* estéril de 1,5 ml, já aquecido à uma temperatura de 65 °C, contendo de 500 a 600 µl de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM; pH 8,0; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; CTAB 2% (v/v)), 6,3 µl de proteinase K (a partir da solução estoque de 20 mg/ml) e 1 µl de β-mercaptoetanol (0,2%).

A partir daí, o tubo contendo o extrato permanecia incubado por duas horas a uma temperatura de 65 °C, e a cada 30 min o material era misturado por inversão manual do tubo. Após essas duas horas de permanência na temperatura de 65 °C era adicionado 500 a 600 µl de Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico (25:24:1; pH 8,0) ao tubo contendo o material ao qual se desejava extrair o DNA, sendo este misturado por repetidas inversões.

O passo seguinte era levar o tubo com o material à centrífuga MiniSpin (*ependorf*) e regulá-la para o funcionamento a 8000 rpm durante 18 min. Isso era feito para que a fase aquosa (superior) e orgânica (inferior) fossem separadas. Logo após a etapa de centrifugação anterior, transferia-se a fase aquosa (utilizando pipetas com ponteiros cortadas) para um novo tubo tipo *ependorf* estéril de 1,5 ml, já contendo 450 a 500 µl de Clorofórmio: Álcool isoamílico (25:1, v/v), sendo este misturado por inversão manual. Posteriormente,

centrifugava-se o novo tubo, com seu conteúdo, novamente a 8000 rpm por 18 min. Dependendo da persistência do cheiro de fenol podia-se adicionar mais Clorofórmio: Álcool isoamílico (25:1, v/v) ao tubo e repetir a etapa da centrifugação a 8000 rpm por 18 min. Depois transferia-se fase aquosa do tubo para outro novo tubo tipo *ependorf* estéril.

A próxima etapa consistia em adicionar etanol 95% gelado ao tubo com a fase aquosa, na proporção de 2,5 vezes o volume do mesmo (1 ml) e misturá-lo gentilmente por inversão. Após esse passo, o tubo era deixado durante toda a noite em um freezer regulado na temperatura de -4 °C.

No dia seguinte continuava-se o procedimento de isolamento de DNA genômico das amostras, de modo que o tubo voltava à centrifuga regulada em 8000 rpm só que desta vez permanecia nesta durante 20 min. Depois desse passo, normalmente aparecia, de forma bem visível, um precipitado de ácidos nucléicos aparentemente sólido ('pellet') no fundo do tubo. Então a etapa seguinte era retirar o etanol do tubo sem deixar o precipitado sólido ('pellet') cair e lavar o tubo, contendo o 'pellet', com 300 a 500 µl de etanol 70% e então colocá-lo na centrífuga, desta vez regulada 3000 rpm, durante 4 min. Após isso, abria-se o tubo e deixava-se o 'pellet' secar ao ar por aproximadamente 30 min, até que o cheiro de etanol saísse.

O último passo era ressuspender o 'pellet' contido no tubo, em 100 µl de Tris-HCl 10 mM; pH 8,0; contendo EDTA 1 mM (tampão TE) à temperatura ambiente e deixar o tubo tipo *ependorf* em cima da bancada durante duas a três horas.

Após todos esses procedimentos para o isolamento do DNA genômico, a solução final, contendo o precipitado de ácidos nucléicos e a TE, era tratada com 2 µl de RNase (1 mg/ml) a fim de retirar a contaminação por RNA da solução.

4.4. Análise da qualidade do DNA genômico

Todas as amostras estudadas eram visualizadas em gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etídio. Após a eletroforese realizou-se a quantificação do DNA genômico a partir da medida da absorvância em um comprimento de onda de 260 nm, através do aparelho espectrofotômetro GeneQuant RNA/DNA calculator (*Amersham Biosciences Corp.*, Piscataway- NJ, EUA). De acordo com SAMBROOK *et al.* (1989), uma solução de DNA dupla fita, numa concentração de 50 ng/µl possui uma absorvância a 260 nm num valor igual a 1,0. Assim a concentração de DNA das amostras estudadas foi calculada pela expressão $C =$

$50 \times D \times A_{260 \text{ nm}}$, na qual C representa a concentração de ácidos nucleicos em $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ e D é o fator de diluição. A razão entre os dois valores de absorbância ($A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$) também foi calculada a fim de estimar a contaminação por proteínas e por compostos fenólicos (ROMANO, 1998).

4.5. Eletroforese de DNA em de agarose a pH neutro

As preparações de DNA genômico foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v). O gel de agarose foi preparado em TBE 0,5X (Tris-Borato 45 mM, EDTA 1 mM), contendo brometo de etídio (EtBr) 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, de acordo com o protocolo descrito por SAMBROOK *et al.* (1989). Em suma, a massa ideal de agarose é adicionada ao volume ideal de TBE, dependendo do volume final desejado. A solução é aquecida até que a agarose seja completamente fundida, sendo posteriormente resfriada a 50°C. O brometo de etídio é então adicionado a partir de uma solução estoque 10 mg/mL (*Amersham Biosciences Corp.*, Piscataway – NJ, EUA), de maneira que sua concentração final foi de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O gel permaneceu em repouso a temperatura ambiente até a sua completa solidificação (15 a 20 minutos).

Foram aplicados em cada poço do gel 4 μl da amostra, preparado previamente com 3 μl do tampão de amostra (glicerol 30%, TE pH 8,0, azul de bromofenol 0,25%). Além disso, em um poço aplicou-se 5 a 6 μl do marcador de massa molecular adequado correspondendo a uma quantidade final de 250 ηg . O tampão de corrida utilizado foi o TBE 0,5X e a corrida eletroforética foi realizada a uma amperagem constante (100 volts) por aproximadamente 60 minutos, fornecida pela fonte Gene Power Supply GPS 200/400, *Amersham Biosciences Corp.*, Piscataway – NJ, EUA. A eletroforese era finalizada quando o azul de bromofenol alcançava 2/3 do comprimento total do gel.

Após a eletroforese, o DNA foi visualizado pela fluorescência do brometo de etídio quando exposto aos raios UV (320 ηm) em um transluminador *MacroVueTM transluminator*, *Amersham Biosciences Corp.*, Piscataway – NJ, EUA; e a imagem do gel foi capturada através do *Eagle Eye® Video System*, *ltf Labortechnik GmbH & Co KG* (Wasserburg, Alemanha).

A visualização dos resultados das reações em cadeia da DNA polimerase foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,0% (m/v), corado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), como descrito acima.

Os marcadores de massa molecular utilizados foram: uma solução de fragmentos de DNA do fago λ digerido com *Hind* III, um marcador de alto peso molecular utilizado como referência quando realizado uma eletroforese com DNA genômico; ou uma solução de fragmentos de DNA do bacteriófago ϕ X-174 digerido com *Hae* III, um marcador de baixo peso molecular utilizado como referência quando realizado uma eletroforese de produtos de PCR. Ambos os marcadores foram obtidos através da *Amersham Biosciences Corp.*, Piscataway – NJ, EUA.

4.6. Amplificação da região ITS1 do DNA ribossômico nuclear por reação em cadeia da polimerase (PCR)

O fragmento de DNA correspondente à região do nrDNA foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) utilizando-se como substrato: DNA genômico previamente isolado e oligonucleotídeos (*Invitrogen Brazil LTDA*, São Paulo, Brasil) específicos às extremidades que flanqueiam a região ITS1 (TABELA 02).

Em um tubo eppendorf estéril *Axygen Scientific Inc.* (Union City - CA, EUA) de 0,2 mL realizou-se as reações de PCR para um volume final de 25 μ L. Nele foram misturados os componentes nos volumes especificados (TABELA 03). Além das amostras testadas na reação de PCR, foi utilizado um controle negativo, que continha água no lugar do DNA, e o restante dos componentes.

O processo de amplificação ocorreu no termociclador PTC-200 (*MJ Research Inc.*, Waltham – MA, EUA), programado de acordo com as condições de amplificação descritas na TABELA 04.

TABELA 02 – Nome, seqüência e sentido dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação da região-alvo rDNA ITS1.

Oligonucleotídeo utilizado	Seqüência nucleotídica	Sentido do anelamento
ITS 2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	3'→5'
ITS 5	GCAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	5'→3'

TABELA 03 – Constituintes e volumes utilizados na preparação das reações de PCR para amplificação do segmento do rDNA ITS1.

Componentes da reação de PCR	Volume utilizado
Tampão de reação(10X)*	2,5 µl
Mistura de dNTP's (1mM cada)	5,0 µl
Primer ITS 2 (5 µM)	2,5 µl
Primer ITS 5 (5 µM)	2,5 µl
DNA genômico	**
H ₂ O milli-Q estéril	***
Taq DNA polimerase (5 U/ µl)	0,50 µl
TOTAL	25,0 µl

* Tris-HCl 100 mM pH 9,0; MgCl₂ 15 mM e KCl 500mM

** O volume de DNA genômico utilizado variava de acordo com a concentração do DNA, mantendo-se 800ng / reação.

*** A H₂O milli-Q estéril, quando necessária, era acrescentada a reação para se completar um volume de 25 µl

TABELA 04 - Condições de amplificação da região do rDNA ITS 1 editadas para o programa “Abelhas”.

Ciclos	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1°	Desnaturação	95	3
2°	Anelamento	55	1
3°	Extensão	72	1'10''
4°	Desnaturação	95	1
5°	Anelamento	55	1
6°	Extensão	72	1'10''
7°	Ir para o ciclo 4°, 33 vezes	-	-
8°	Extensão	72	9
9°	Manutenção de temperatura	4	∞

4.7. Purificação do fragmento amplificado

Um volume com aproximadamente 100 µL da solução do fragmento amplificado, resultante de quatro reações de PCR com volume de 25 µL, foi purificado através da utilização de colunas de matriz GFX, cujo nome comercial é *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante do produto (*Amersham Biosciences Corp.*, Piscataway – NJ, EUA). O produto da purificação foi ressuspensionado em 50 µL de água Milli-Q estéril. A concentração de DNA purificado foi determinada pela medida da absorvância a 260 nm, como descrito anteriormente.

4.8. Seqüenciamento parcial da região ITS1 do DNA ribossômico nuclear purificado

Os produtos de PCR amplificados e purificados foram seqüenciados apenas na direção reversa (3'→ 5'), de acordo com o método da terminação da cadeia pelo didesoxinucleotídeo ou ddNTP (SANGER *et al.*, 1977), em reações de 10 µl, com o uso do kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (*Amersham Biosciences Corp.*, Piscataway – NJ, EUA), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Em cada reação de seqüenciamento, utilizou-se relacionando a quantidade de DNA dupla fita, 1/10 do tamanho estimado da região ITS-1 de cada amostra. Por exemplo, se a região ITS-1 de determinada amostra fosse estimada em 1500 pb utilizava-se apenas 1/10 dela, ou seja, 150 ng do DNA previamente purificado e apenas o oligonucleotídeo ITS-2, um dos utilizados durante as reações de PCR. Realizaram-se oito repetições para cada amostra, a fim de se maximizar a exatidão das seqüências determinadas bem como se eliminar ao máximo as ambigüidades que invariavelmente surgem durante a análise e montagem das mesmas.

Ao término da reação de seqüenciamento, os produtos foram precipitados com 20 µl isopropanol 80% e deu-se um vortex na velocidade máxima, por 20 s e então centrifugou-se a 4000 rpm, mantendo uma temperatura de 4°C, numa centrífuga 5804 R Eppendorf® (Hamburg, Alemanha), para a remoção de sais e componentes do kit não incorporados. Posteriormente, retirou-se o sobrenadante e fez-se uma centrifugação invertida breve (5 s) e então se realizou uma lavagem com etanol 70%. Após a lavagem e remoção do excesso de etanol através de uma centrifugação invertida breve, esperou-se a completa evaporação do etanol ao ar livre (10 min), para posterior ressuspensão do precipitado da reação em 10 µl de

Loading solution (70% de formamida, 1 mM de EDTA - *Amersham Biosciences Corp.*, Piscataway – NJ, EUA) e finalizava-se o processo de precipitação com um vortex por 20 s .

Então as amostras foram submetidas a um seqüenciador automático (MEGABACE 1000, *Amersham Biosciences Corp.*, Piscataway – NJ, EUA) nas seguintes condições de injeção e corrida, 2 KV por 65 s, 2 KV por 75 s e 6 KV por 200 min, respectivamente. Inicialmente, a análise dos dados obtidos do seqüenciamento é realizada através de uma série de programas, “MEGABACE™ DNA Sequencing System” (*Amersham Biosciences Corp.*, Piscataway – NJ, EUA), que fornece dois tipos principais de dados: a seqüência de nucleotídeos composta pelas quatro bases nitrogenadas (A, T, G e C) e um eletroferograma, que é a representação gráfica do sinal de cada ddNTPs detectado pelo laser, representando cada nucleotídeo incorporado na seqüência. Na geração das seqüências finais, o programa excluiu as regiões que ele considerou de baixa qualidade, que seriam as regiões que possuíam sítios nucleotídicos de baixo sinal, sendo apenas as seqüências de boa qualidade consideradas.

4.9. Montagem das seqüências obtidas (obtenção das seqüências consenso)

Após o seqüenciamento, os dados brutos gerados são processados para originar uma seqüência, processo esse chamado de *basecalling*. As seqüências determinadas de cada amostra foram então submetidas a um pacote de programas para montagem e obtenção de seqüências consenso.

O pacote de programas Phred (EWING *et al.*, 1998; EWING & GREEN, 1998) e Phrap (Phil Green, *University of Washington*, EUA) é utilizado para a leitura dos dados brutos e montagens das seqüências consenso em ambiente operacional LINUX. Através de análise de Fourier, o programa Phred lê todos os dados brutos do seqüenciamento e calcula a probabilidade de erro para cada *basecall*. Os escores oriundos do Phred são obtidos em logaritmo negativo da probabilidade de que aquele *basecall* esteja errado. Portanto, quanto maior for o escore do Phred, menor é a probabilidade que um erro seja cometido (EWING & GREEN, 1998; LIMA, 2003). O programa Phrap, então utiliza essas probabilidades de erro para determinar seqüências consenso altamente precisas. Ele estuda cada sítio da seqüência de DNA, utilizando a seqüência de maior qualidade para determinar os nucleotídeos em cada posição na seqüência consenso (BROWN, 2000).

Posteriormente, o pacote Consed (GORDON *et al.*, 1998; 2001) fornece a interface gráfica para a visualização e edição das seqüências consenso montadas pelo programa Phrap.

4.10. Busca por similaridades das seqüências consenso geradas, em um banco de dados de seqüências nucleotídicas

As seqüências consenso geradas foram submetidas à busca por similaridade no *GenBank* (NCBI – *National Center for Biotechnology Information*) através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL *et al.*, 1997), disponível no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>. O objetivo foi determinar se as seqüências consenso obtidas realmente correspondiam à região desejada, através da busca por similaridade com outras seqüências já depositadas e identificadas no *GenBank*.

4.11. Seqüências importadas do *GenBank*

Foram importadas do *GenBank*, todas as seqüências existentes do nrDNA ITS1 referente ao gênero *Melipona* Illiger, além de outras seqüências de três espécies retiradas do trabalho de FERNANDES-SALOMÃO *et al.* (2005), com o intuito de alinhá-las com as novas seqüências geradas no presente trabalho, para assim poder proceder com as análises filogenéticas, além da construção de uma árvore filogenética das espécies do táxon *Melipona* baseada na região ITS1 parcial do rDNA (TABELA 05).

TABELA 05 – Sequências importadas e posteriormente integradas às sequências obtidas no laboratório de genética molecular (LGM) para incrementar as análises filogenéticas do táxon *Melipona*.

Subgênero	Espécie	Local de origem	Autor/Ano	Nº de tombo	Nº de acesso no GenBank
<i>Melipona</i>	<i>Melipona subnitida</i>	Quixadá-CE	Cruz <i>et al.</i> , 2005	MGPA0503	DQ078726
<i>Melipona</i>	<i>Melipona subnitida</i>	Sousa-PB	Cruz <i>et al.</i> , 2005	MGPA0703	DQ078727
<i>Melipona</i>	<i>Melipona subnitida</i>	Ocara-CE	Cruz <i>et al.</i> , 2005	MGPA1305	DQ078728
<i>Melipona</i>	<i>Melipona subnitida</i>	Mossoró-RN	Cruz <i>et al.</i> , 2005	MGPA1404	DQ078729
<i>Melipona</i>	<i>Melipona subnitida</i>	Russas-CE	Cruz <i>et al.</i> , 2005	MGPA0603	DQ078730
<i>Melipona</i>	<i>Melipona subnitida</i>	Sobral-CE	Cruz <i>et al.</i> , 2005	MGPA0103	DQ078731
<i>Melipona</i>	<i>Melipona subnitida</i>	Milhã-CE	Cruz <i>et al.</i> , 2005	MGPA0104	DQ078732
<i>Melipona</i>	<i>Melipona subnitida</i>	Quixelô-CE	Cruz <i>et al.</i> , 2005	MGPA0203	DQ078733
<i>Melipona</i>	<i>Melipona subnitida</i>	Aracati-CE	Cruz <i>et al.</i> , 2005	MGPA0403	DQ078734
<i>Melipona</i>	<i>Melipona subnitida</i>	Aracoiaba-CE	Cruz <i>et al.</i> , 2005	MGPA0303	DQ078735
<i>Melipona</i>	<i>Melipona subnitida</i>	João Câmara-RN	Cruz <i>et al.</i> , 2005	MGPA1304	DQ078736
<i>Melipona</i>	<i>Melipona subnitida</i>	Chorozinho-CE	Cruz <i>et al.</i> , 2005	MGPA1104	DQ078737
<i>Melipona</i>	<i>Melipona subnitida</i>	Araioses-MA	Cruz <i>et al.</i> , 2005	MGPA1704	DQ078738
<i>Melikerria</i>	<i>Melipona quinquefasciata</i>	Crato-CE (Flona 1)	Freitas & Grangeiro, 2007	MGPA0803	EU073753
<i>Melikerria</i>	<i>Melipona quinquefasciata</i>	Crato-CE (Flona 2)	Freitas & Grangeiro, 2007	MGPA0903	EU073754
<i>Melikerria</i>	<i>Melipona quinquefasciata</i>	Crato-CE (Flona 3)	Freitas & Grangeiro, 2007	MGPA1003	EU073755
<i>Melikerria</i>	<i>Melipona quinquefasciata</i>	Araripe-CE (Araripe 1)	Freitas & Grangeiro, 2007	MGPA0604	EU073751
<i>Melikerria</i>	<i>Melipona quinquefasciata</i>	Araripe-CE (Araripe 3)	Freitas & Grangeiro, 2007	MGPA0804	EU073752
<i>Melikerria</i>	<i>Melipona quinquefasciata</i>	São Benedito-CE	Freitas & Grangeiro, 2007	MGPA0205	EU073758
<i>Melikerria</i>	<i>Melipona quinquefasciata</i>	Jardim-CE (Jardim 1))	Freitas & Grangeiro, 2007	MGPA0204	EU073756
<i>Melikerria</i>	<i>Melipona quinquefasciata</i>	Canto do Buriti-PI	Freitas & Grangeiro, 2007	MGPA0305	EU073757
<i>Melikerria</i>	<i>Melipona quinquefasciata</i>	Luziânia-GO	Freitas & Grangeiro, 2007	MGPA0404	EU073759
<i>Melipona</i>	<i>Melipona mandacaia</i>	São R. Nonato-PI	Fernandes-Salomão <i>et al.</i> ,2005	-	-
<i>Melipona</i>	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	Viçosa-MG	Fernandes-Salomão <i>et al.</i> ,2005	-	-
<i>Michmelia</i>	<i>Melipona scutellaris</i>	Lençóis-BA	Fernandes-Salomão <i>et al.</i> ,2005	-	-

4.12. Alinhamento múltiplo e edição das seqüências consenso

O alinhamento múltiplo de todas as seqüências foi realizado com o auxílio do programa CLUSTALX, versão 1.83 (THOMPSON, 1997). A edição do alinhamento, realizada com o auxílio do programa Bioedit, versão 7.0.5.3 (HALL, 1999), se baseia na remoção ou inserção de *gaps* adicionais, ou seja, um espaço entre dois nucleotídeos, buscando assim otimizar e facilitar a identificação de sítios homólogos.

Após a edição de todas as seqüências estudadas, realizou-se a análise de composição nucleotídica e conteúdo G+C com o auxílio do programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*), versão 3.1 (KUMAR *et al.*, 2004).

4.13. Análise de saturação de substituições

Após o alinhamento múltiplo de todas as seqüências, a análise de saturação de substituições foi realizada com o auxílio do programa DAMBE (Data Analysis Molecular Biology and Evolution) versão 4.065 (XIA & XIE, 2001).

Para verificar se o número de transições e de transversões atingiu o nível de saturação, isto é, se ocorreu mais do que uma substituição em determinados sítios, foi construído, através do programa DAMBE (XIA & XIE, 2001), um gráfico onde a coordenada representa os valores das distâncias de cada par de táxons usados e a abscissa o número de transição (X_s) ou de transversão (Δv) presentes em cada par de táxons. No caso de não haver saturação, a relação entre estes parâmetros é linear, isto é, com o aumento da distância, há o aumento do número de X_s ou Δv . Se houver substituições múltiplas, o gráfico atinge um platô no qual aumentando-se a distância, não há o aumento no número de X_s ou Δv (PEREIRA, 2000).

4.14. Análises dos agrupamentos taxonômicos

O primeiro teste a ser realizado a partir do alinhamento múltiplo editado foi o teste do modelo, utilizando o programa *ModelTest* (POSADA & CRANDALL, 1998), que é executado como uma sub-rotina do programa PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) (SWOFFORD, 1998). Este programa foi utilizado com o objetivo de verificar qual o modelo de substituição mais adequado aos dados obtidos.

Para a construção de todos os cladogramas utilizou-se como grupo externo do táxon *Melipona* a espécie *Scaptotrigona* sp., a qual pertence ao mesmo gênero utilizado por FERNANDES-SALOMÃO *et al.* (2005) para análise da filogenia do mesmo táxon.

A análise filogenética envolvendo os métodos algorítmicos do vizinho mais próximo (*Neighbor-joining* - NJ) e de máxima parcimônia (MP) foi realizada com o auxílio do programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*), versão 3.1 (KUMAR *et al.*, 2004).

A análise de máxima verossimilhança (MV) foi realizada através do programa PAUP* (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*), versão 4.0b10 (SWOFFORD, 1998), utilizando o modelo mais apropriado de acordo com teste do modelo (*ModelTest*) descrito acima. Os cladogramas gerados pelo programa PAUP* foram visualizados e editados pelo programa TreeView (PAGE, 1996).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração e isolamento do DNA genômico das amostras

Através da eletroforese em gel de agarose 0,8%, corada com brometo de etídio e visualizada em luz ultravioleta (UV), pôde-se observar uma única banda, para todas as amostras extraídas no laboratório, correspondente a um DNA genômico com aproximadamente 23.000 pb (FIGURA 02).

De fato, contaminações por DNAses endógenas podem ser constatadas pela visualização do estado aparente do DNA genômico em gel de agarose. Quando isto ocorre, a banda que representa o DNA genômico aparece com um arrastado, sinal indicativo de degradação (ROMANO, 1998). No entanto, esses sinais não foram observados nas amostras extraídas no laboratório (FIGURA 02). As bandas de todas as amostras apresentaram-se bastante integras e bem definidas. Esse bom estado apresentado pelas bandas mostra que através do método que usa o reagente CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio), o qual é um detergente muito utilizado nas extrações de DNA de uma grande variedade de organismos (STEINER & DREYER, 2002), pôde-se extrair e isolar, a partir do mesossoma das abelhas, um DNA genômico com pouca degradação aparente (FIGURA 02).

Resultados semelhantes foram encontrados por JORGE (2004), CRUZ *et al.* (2006) e PEREIRA (2006), que utilizaram o mesmo reagente, para extração e isolamento de DNA genômico do mesossoma de abelhas, cujo material também se mostrou com poucas degradações aparentes e com o tamanho aproximado de 23 kb.

Um indicativo de contaminação por polissacarídeos é a presença de certa quantidade de DNA retido nos poços do gel após a corrida eletroforética (ROMANO & BRASILEIRO, 2003). Esse sinal pôde ser bem notado em *Melipona fasciculata* (amostra 1), *M. flavolineata* (amostra 2) e *M. mondury* – Rio Vermelho (amostra 3), enquanto no restante das amostras, extraídas no laboratório, foi observado pouca contaminação por polissacarídeos (FIGURA 02), contudo, o mesmo não impediu que ocorresse uma boa amplificação da região alvo pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR – Polimerase Chain Reaction), como pode ser visto na FIGURA 03.

A razão das leituras nos comprimentos de onda A260 nm e A280 nm pôde fornecer dados além dos apresentados pela eletroforese em gel de agarose 0,8%. Uma vez que essa razão revela a pureza das amostras. De modo que, um DNA puro deve ter a razão entre 1,8 e 2,0, uma razão menor significa contaminação por proteínas, e razão maior indica contaminação com fenol (ROMANO, 1998). Então, pode-se observar na TABELA 06 que apenas as amostras *Melipona fasciculata* (amostra 1) e *Scaptotrigona* sp. (amostra GE) apresentaram um DNA dentro da faixa considerada pura. O restante das amostras extraídas no laboratório mostrou certo nível de contaminação por proteínas.

Segundo BALDWIN *et al.* (1995), a qualidade do DNA é de extrema importância para estudos filogenéticos ou populacionais, devido às modificações ou degradações que o mesmo pode sofrer durante sua extração e purificação. Então, sabendo-se que a viabilidade de estudos moleculares envolvendo ácidos nucléicos, depende tanto da qualidade como também da quantidade de DNA extraído das espécies em estudo, cabe ao pesquisador adaptar as metodologias descritas por outros autores às particularidades bioquímicas das espécies estudadas (LIMA, 2003).

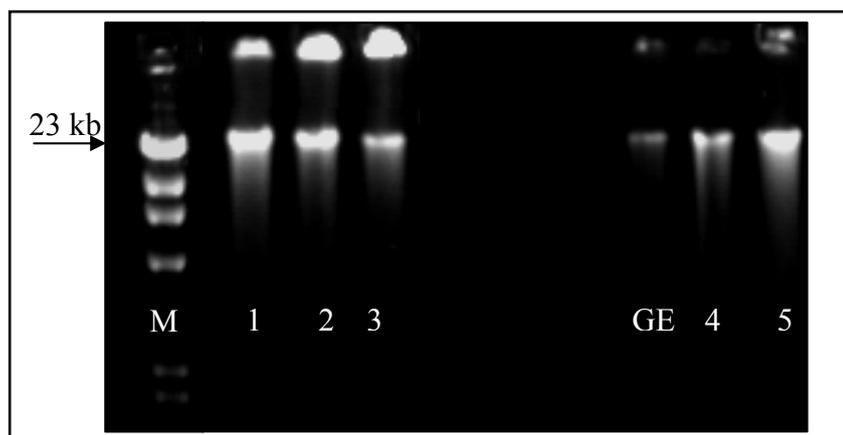


FIGURA 02- Eletroforese a 0,8% em presença de EtBr a 0,5 μ g/ml visualizado em luz UV (ultravioleta). Poços/Amostras: M/Marcador de alto peso molecular (DNA de fago λ digerido com *Hind* III – Amersham Biosciences Corp., Piscataway – NJ, EUA); 1/*Melipona fasciculata*; 2/*Melipona flavolineata*; 3/*Melipona mondury* (Rio Vermelho-MG); 4/*Melipona mondury* (Pacoti-CE); 5/*Melipona mondury* (Guaramiranga-CE); GE/*Scaptotrigona* sp. (Grupo Externo).

TABELA 06 – Valores das leituras de absorvância a 260 nm, 280 nm, a razão entre $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ e a concentração de ácidos nucleicos (η g/ul) para as amostras extraídas no laboratório.

Amostra	Espécie	Local	Razão A_{260}/A_{280}	$A_{260\text{nm}}$	$A_{280\text{nm}}$	Concentração [η g/ul]
1	<i>Melipona fasciculata</i>	Belém-PA	1,806	0,990	0,548	990
2	<i>Melipona flavolineata</i>	Belém-PA	1,773	0,500	0,282	500
3	<i>Melipona mondury</i>	Rio Vermelho-MG	1,607	0,434	0,270	434
4	<i>Melipona mondury</i>	Pacoti-CE	1,616	0,461	0,293	461
5	<i>Melipona mondury</i>	Guaramiranga-CE	1,418	0,130	0,082	130
GE	<i>Scaptotrigona</i> sp.	Maranguape-CE	1,803	0,204	0,112	204

5.2. Amplificação da região ITS1 do nrDNA por PCR

Através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), que é uma técnica rápida, simples e de grande sensibilidade para multiplicação *in vitro* de seqüência(s) alvo de DNA (GAMA, 1998), foi amplificada a região ITS1, de cada amostra extraída no laboratório, usando os iniciadores (*primers*) ITS2 e ITS5, cujos produtos de PCR correspondentes à amplificação da região ITS1 completa foram visualizados a partir de uma eletroforese em gel de agarose 1%. Segundo GAMA (1998), para que ocorra a amplificação da(s) seqüência(s) alvo é necessário que a(s)

amostra(s) sejam de alta qualidade, ou seja, com poucos contaminantes e degradação. Já que todas as amostras apresentaram amplificação da seqüência alvo, então, isso mostra que, apesar de algumas contaminações ocorridas durante a fase de extração e isolamento do DNA, mesmo assim, as amostras extraídas mostraram ser de boa qualidade.

A partir da análise da eletroforese, revelou-se a amplificação de um único fragmento de DNA (única banda) para quase todas as amostras do laboratório, exceto para *Melipona fasciculata* (amostra 1), que apresentou mais de uma banda. Porém, o fragmento principal desta amostra se mostrou bem mais intenso do que os demais fragmentos que apareceram na mesma.

Somente com o seqüenciamento total da região ITS1 se poderia estimar o real tamanho de cada seqüência alvo, contudo com base na visualização do produto de PCR por meio de eletroforese em gel de agarose 1% pode-se notar diferenças entre o tamanho dos fragmentos amplificados e junto aos marcadores de massa molecular pode-se inferir com aproximação dos valores reais. Com base nisso, os resultados mostraram que o tamanho do fragmento variou entre algumas amostras indo desde um pouco menos de 1500 pb (*Scaptotrigona* sp. e *M. fasciculata*) até próximo de 2000 pb (*M. flavolineata*; *M. mondury* - Rio Vermelho; *M. mondury* - Pacoti e *M. mondury* - Guaramiranga) (FIGURA 03). Baseado no tamanho estimado através da eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de DNA amplificados, FERNANDES-SALOMÃO *et al.* (2002) trabalhando com 11 espécies pertencentes ao gênero *Melipona*, distinguiram-nas em quatro grupos: 1) *M. quadrifasciata*, *M. mandacaia*, *M. favosa*, *M. bicolor*, *M. quinquefasciata* e *M. compressipes* com 1430 pb; 2) *M. scutellaris*, *M. capixaba* e *M. seminigra* com 1540 pb; 3) *M. marginata* com 1640 pb e 4) *M. rufiventris* (1940 pb). Essa variação no tamanho da região ITS1 entre espécies do mesmo gênero já foi relatada para vários organismos, incluindo insetos (VON DER SCHULENBURG *et al.*, 2001). Segundo FERNANDES-SALOMÃO *et al.* (2005), o comprimento variável da região ITS1 está relacionado principalmente a eventos de inserção e deleção (indels), além de seqüências repetidas de um, dois, três e quatro nucleotídeos.

Pode ainda se constatar, pela FIGURA 03, que não houve contaminação entre as amostras durante a realização dos procedimentos da PCR, uma vez que o controle negativo (Br) não amplificou.

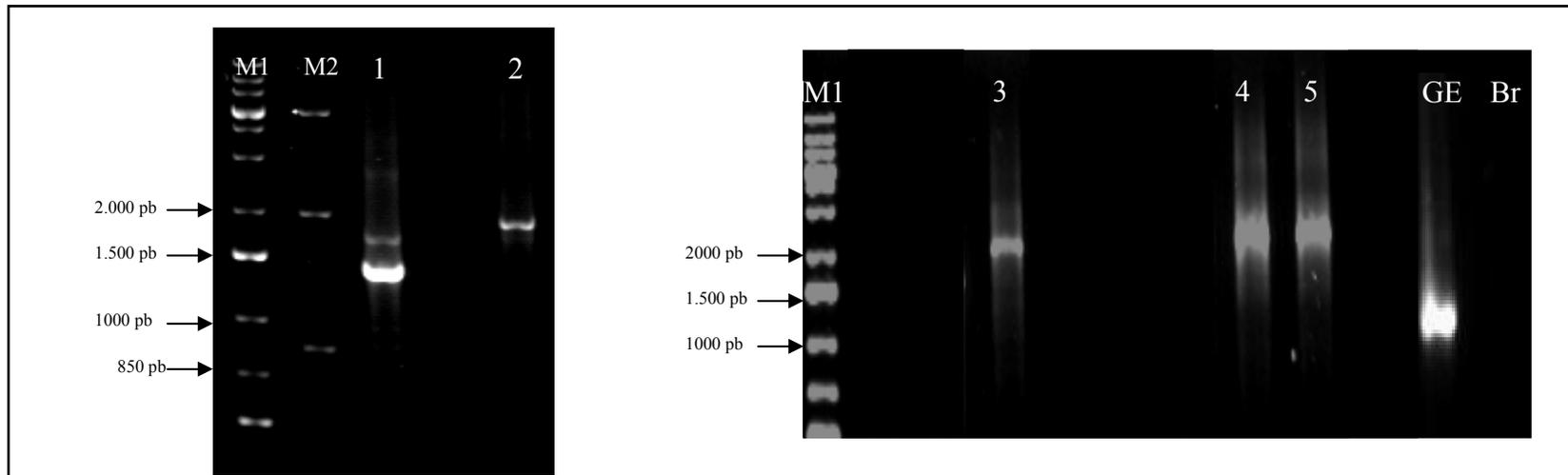


FIGURA 03 – Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com EtBr a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e na presença de luz UV (ultravioleta), dos produtos de PCR da região ITS1 do nrDNA. Poços/Amostras: M1/Marcador molecular (Gene ruler 1kb DNA ladder plus); M2/Marcador molecular (Fastruler™ DNA ladder middle range); 1/*Melipona fasciculata*; 2/*Melipona flavolineata*; 3/*Melipona mondury* (Rio Vermelho-MG); 4/*Melipona mondury* (Pacoti-CE); 5/*Melipona mondury* (Guaramiranga-CE); GE/*Scaptotrigona* sp. (Grupo Externo); Br/Branco(controla negativo com adição de água Milli-Q no lugar do DNA genômico).

5.3. Seqüenciamento da região nrDNA ITS1 parcial e obtenção das seqüências consenso

Como para a reação de seqüenciamento utilizou-se apenas o *primer* ITS2, e também como a capacidade do seqüenciador automático MEGABACE 1000 (*Amersham Biosciences Corp.*, Piscataway – NJ, EUA) era de apenas 600 pb, então foi obtido somente seqüências parciais da região ITS1 do nrDNA. O esperado era que, mesmo após a montagem das seqüências consenso pelo pacote de programas Phred, Phrap e Consed, fosse obtido seqüências com o comprimento pelo menos próximo a 500 pb para todas as amostras, assim como encontrado por PEREIRA (2006) que trabalhou apenas com a espécie *Melipona quinquefasciata* encontrada em diferentes localidades do país. Entretanto, os resultados do seqüenciamento das amostras extraídas no laboratório, tanto das cinco amostras do gênero *Melipona* como do grupo externo, geraram seqüências parciais de tamanhos bastante variados e menores do que o esperado.

Essa variação no tamanho dos fragmentos deveu-se principalmente a fatores não identificados que atrapalharam o processo de seqüenciamento. Esses fatores causaram principalmente uma interrupção prematura no seqüenciamento de algumas amostras. Devido a essa interrupção prematura não ter obedecido nenhum padrão normal entre as amostras, não foi possível a descoberta dos verdadeiros fatores responsáveis pela mesma. Fatores esses que podem ser intrínsecos a cada espécie ou mesmo a cada amostra extraída no laboratório.

Apenas *M. fasciculata* e *Scaptotrigona* sp. apresentaram seqüências com comprimento superior ao valor encontrado por PEREIRA (2006), cada uma com, respectivamente, 511 pb e 566 pb. As demais amostras apresentaram seqüências de tamanho curto variando desde 181 pb em *M. mondury* – Rio vermelho e *M. mondury* – Guaramiranga até 421 pb em *M. flavolineata* (TABELA 07). Contudo, essas seqüências consenso geradas pelo pacote de programas mencionado acima, que tem por finalidade eliminar as seqüências de má qualidade, apesar de terem sido pequenas obtiveram boa qualidade (Phred > 20) para todos os genótipos analisados (FIGURA 4). Segundo ROKAS & HOLLAND (2000), seqüências de baixa qualidade podem possuir nucleotídeos inseridos incorretamente, o que poderia gerar inferências equivocadas.

TABELA 07 – Relação das seqüências consenso, da região do rDNA ITS1 parcial das amostras do laboratório, mostrando seus respectivos comprimentos em pares de bases (pb), obtidas através do pacote de programas Phred, Phrap e Consed.

Amostra	Comprimento (pb)
<i>Melipona fasciculata</i>	511
<i>Melipona flavolineata</i>	421
<i>Melipona mondury</i> - Rio Vermelho	181
<i>Melipona mondury</i> – Pacoti	241
<i>Melipona mondury</i> – Guaramiranga	181
<i>Scaptotrigona</i> sp.	566



FIGURA 04 – Visualização através do programa Consed das montagens das seqüências consenso realizadas pelo pacote de programas Phred e Phrap. As seqüências utilizadas como exemplo para ilustração foram da região ITS1 parcial do nrDNA de *Melipona fasciculata*.

5.4. Busca por similaridades das seqüências consenso geradas, em um banco de dados de seqüências nucleotídicas (*GenBank*)

Apenas 22 seqüências do banco de dados do *GenBank* produziram alinhamentos com similaridades consideradas significantes às seqüências consenso do laboratório. Todas essas seqüências do banco de dados eram pertencentes à região ITS1 do nrDNA de apenas duas espécies de abelhas do táxon *Melipona*, sendo estas: *M. subnitida* com 13 seqüências depositadas por CRUZ *et al.* (2005) e *M. quinquefasciata* com nove, depositadas por FREITAS & GRANGEIRO (2007), cujas seqüências foram posteriormente utilizadas para as análises filogenéticas junto as seqüências obtidas no laboratório. Segue na FIGURA 05 uma ilustração dos resultados obtidos com a ferramenta BLASTn.

```
>gb|EU073757.1| Melipona quinquefasciata voucher MGPA 0305 internal transcribed
spacer 1, partial sequence
Length=564

Score = 627 bits (339), Expect = 2e-176
Identities = 368/380 (96%), Gaps = 10/380 (2%)
Strand=Plus/Plus

Query 139 CTCTCCGGGTAACCTGGAACCAATGTTGCAATGTGTGGAATGTGCGCCCGTTTCGTCGCT 198
          |||
Sbjct 1 CTCTCCGGGTAACCTGGAACCAATGTTGCAATGTGTGGAATGTGCGCCCGTTTCGTCGCT 60

Query 199 TCTCGTCGAAATTTTGCTCGAAAATTCCTTCGTTCCGAGATGGACCGGCTGTGCAGCCCC 258
          |||
Sbjct 61 TCTCGTCGAAATTTTGCTCGAAAATTCCTTCGTTCCGAGATGGACCGGCTGTGCAGCCCC 120

Query 259 TTTTT-----CTCGAACTCCAACGCTTTCTCGAAAGGCATCTTCGGGGCCGGCTGTGC 313
          |||
Sbjct 121 TTTTTTTTTCTCGAACTCCAACGCTTTCTCGAAAGGCATCTTCGGGGCCGGCTGTGC 180

Query 314 GTCCTCGATCGAACTATTCGATCCGAACGTGCGTGT-TT-CGTCCCTACCTCGAACGTCG 371
          |||
Sbjct 181 GTCCTCGATCGAACTATTCGATCCGAACGTGCGTGTGTTTCGTCCCTACCTCGAACGTCG 240

Query 372 CCGTTCGGTAAGGTGAAAGCGCGCGGGCCAGCCACGACGGCGCAATGGTTCGCGAGATCG 431
          |||
Sbjct 241 CCGTTCGGTGAGGTGAAAGCGCGCGGGCCAGCCACG--G-CGCAATGGTTCGCGAGATCG 297

Query 432 TGCGTAGAACAGGATTCAGTAACGGACGAATCACTTCCCCTCGTTTCCTTACGTTCCGCG 491
          |||
Sbjct 298 TGCGTAGAACAGGATTCAGTAACGGACGAATCACTTCCCCTCGTTTCCTTACGTTCCGCG 357

Query 492 ATTCTCGTTGGTATATTA 511
          |||
Sbjct 358 ATTCTCGTTGGTATATTA 377
```

FIGURA 05 – Ilustração de um dos resultados da busca por similaridade com a ferramenta BLASTn. A seqüência Query utilizada como exemplo para ilustrar essa busca por similaridade foi a da região ITS1 parcial do nrDNA de *Melipona fasciculata* e a seqüência Subject corresponde à região ITS1 parcial do nrDNA de *Melipona quinquefasciata* com o nº de acesso EU073757.1 no *GenBank*.

5.5. Alinhamento múltiplo de seqüências e identificação de posições homólogas

Para fazer o alinhamento se juntou às seqüências obtidas no laboratório outras seqüências parciais da região ITS1 de abelhas do táxon *Melipona*. Estas foram: 22 seqüências importadas do *GenBank* (13 de *M. subnitida* e nove de *M. quinquefasciata*) e mais três retiradas de FERNANDES-SALOMÃO *et al.* (2005), totalizando 31 seqüências. Como havia uma variação muito grande entre os tamanhos das seqüências, tanto do laboratório quanto das importadas, então se fez um corte, nas extremidades 5' e 3' do alinhamento geral, com a finalidade de uniformizar o tamanho das seqüências. Para se fazer o corte, levou-se em consideração apenas a zona de interseção central entre o alinhamento geral de todas as seqüências estudadas, o que correspondia a 141 sítios incluindo 17 *gaps* (espaços).

O alinhamento entre seqüências de ácidos nucléicos é, em essência, um procedimento pelo qual potenciais homologias podem ser inferidas e identificadas (PHILLIPS *et al.*, 2000; PAGE & HOLMES, 2001) Em contraste com a maioria das seqüências codificadoras, o alinhamento das seqüências de ITS pode ser complicado por mutações de inserção e remoção, as quais necessitam o posicionamento de *gaps* para preservar homologias posicionais de nucleotídeos (LIMA, 2003).

O resultado do alinhamento, chamado aqui de “interseção central”, revelou que além das substituições nucleotídicas (transições e transversões), também existiram eventos de remoção e inserção (*indels*) nucleotídicas nessas seqüências, o que mostra uma pressão seletiva para mudanças no tamanho da região (FIGURA 06).

Na TABELA 8 encontram-se as características do alinhamento, após a edição final das 31 seqüências estudadas, no qual foram encontrados 79 sítios conservados (59%) e 55 sítios variáveis o que reflete 41% de variabilidade entre as seqüências. Os resultados ainda mostram 32 sítios autopomórficos (24%) e apenas 19 informativos à parcimônia (14%). Todos esses resultados foram de fundamental importância para confecção da matriz de distância genética e das árvores filogenéticas. Já CRUZ *et al.* (2006), trabalhando com a mesma região, porém apenas com populações de *M. subnitida*, observaram, a partir do alinhamento geral entre as seqüências, um total de 75,9% de sítios conservados, 24,1% de sítios variáveis, 18,1% de sítios autopomórficos e 6,1% de sítios informativos a parcimônia.

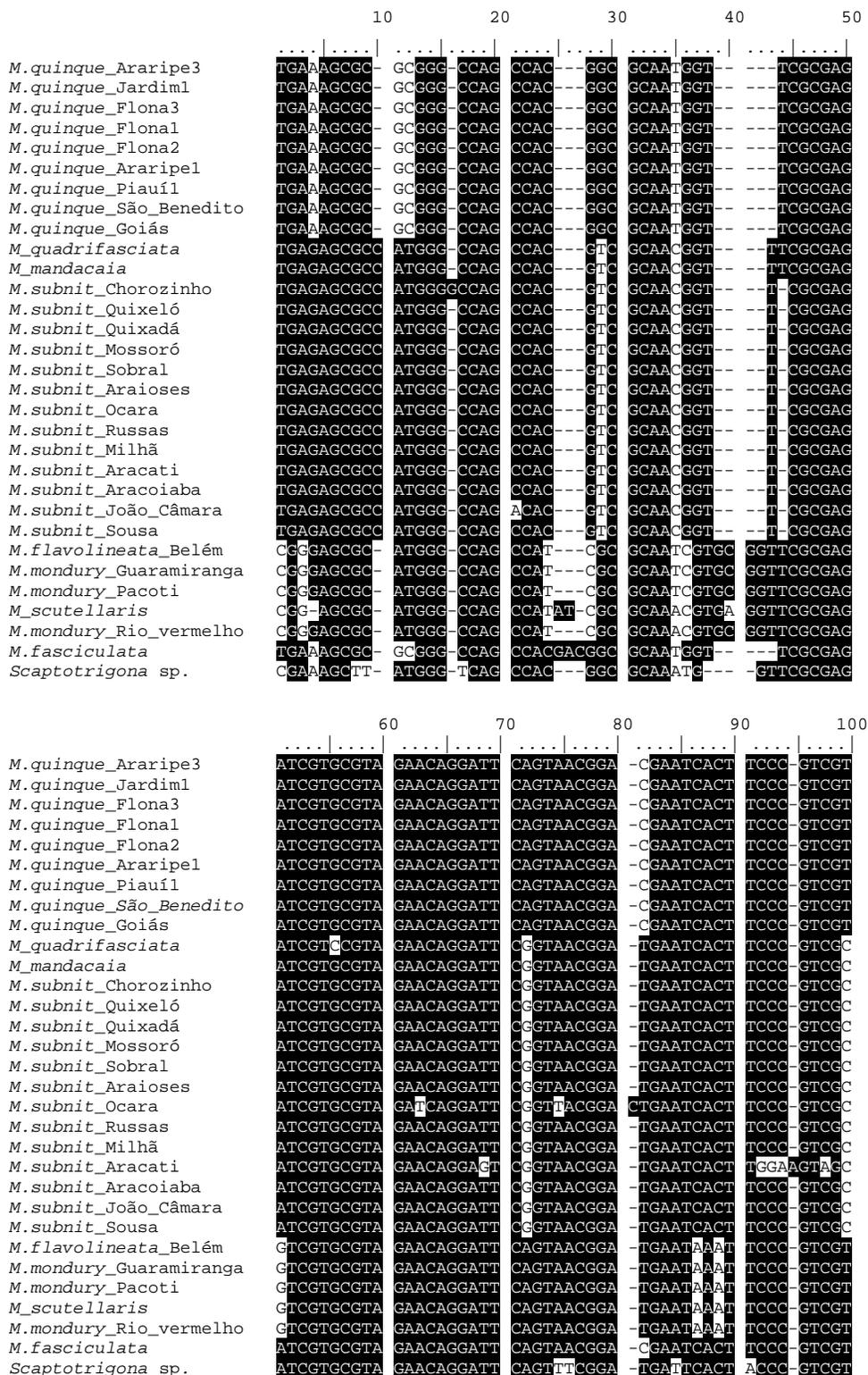


FIGURA 06 – Alinhamento múltiplo das seqüências estudadas da região ITS1 do nrDNA realizado com auxílio do programa MEGA.

	110	120	130	140		
<i>M. quinque_Araripe3</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGTTGG	TTATA--TTA	A
<i>M. quinque_Jardim1</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGTTGG	TTATA--TTA	A
<i>M. quinque_Flona3</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGTTGG	TTATA--TTA	A
<i>M. quinque_Flona1</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGTTGG	TTATA--TTA	A
<i>M. quinque_Flona2</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGTTGG	TTATA--TTA	A
<i>M. quinque_Araripe1</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGTTGG	TTATA--TTA	A
<i>M. quinque_Piauí1</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGTTGG	TTATA--TTA	A
<i>M. quinque_São_Benedito</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGTTGG	TTATA--TTA	A
<i>M. quinque_Goiás</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGTTGG	TTATA--TTA	A
<i>M. quadrifasciata</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGATGG	TTATT--TTA	A
<i>M. mandacaia</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGATGG	TTATT--TTA	A
<i>M. subnit_Chorozinho</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGATGG	TTATT--TTA	A
<i>M. subnit_Quixeló</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGATGG	TTATT--TTA	A
<i>M. subnit_Quixadá</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGATGG	TTATT--TTA	A
<i>M. subnit_Mossoró</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGATGG	TTATT--TTA	A
<i>M. subnit_Sobral</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGATGG	TTATT--TTA	A
<i>M. subnit_Araioses</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGATGG	TTATT--TTA	A
<i>M. subnit_Ocara</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGATGG	TTATT--TTA	A
<i>M. subnit_Russas</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGATGG	TTATT--TTA	A
<i>M. subnit_Milhã</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGATGG	TTATT--TTA	A
<i>M. subnit_Aracati</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGATGG	TTATT--TTA	A
<i>M. subnit_Aracoiaba</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGATGG	TTATT--TTA	A
<i>M. subnit_João_Câmara</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGATGG	TTATT--TTA	A
<i>M. subnit_Sousa</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGATGG	TTATT--TTA	A
<i>M. flavolineata_Belém</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGATGG	TTATT--TTA	A
<i>M. mondury_Guaramiranga</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGATGG	TTATT--TTA	A
<i>M. mondury_Pacoti</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGATGG	TTATT--TTA	A
<i>M. scutellaris</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGATGG	TTATT--TTA	A
<i>M. mondury_Rio_vermelho</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGATGG	TTATT--TTA	A
<i>M. fasciculata</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGTTGG	TTATA--TTA	A
<i>Scaptotrigona sp.</i>	TTCC	TTACG	TT-CCGCGAT	TCT-CGATGG	TTATT--TTA	A

FIGURA 06 – (Continuação).

TABELA 08 – Características do alinhamento da “interseção central” entre todas as seqüências do rDNA ITS1 parcial das amostras estudadas.

Características do alinhamento	
Comprimento do alinhamento	141
Nº de sítios conservados	79
Nº de sítios variáveis	55
Nº de sítios autopomórficos	32
Nº de sítios informativos à parcimônia	19
Transições (s)	5
Transversões (v)	4
Razão s/v	1,2
Distância média das seqüências (modelo Jukes-Cantor)	0,076*

*Para a distância média das seqüências foram comparadas apenas as espécies pertencentes ao táxon *Melipona*.

5.6. Análise do conteúdo Guanina + Citosina (conteúdo GC)

No presente trabalho o conteúdo GC entre as amostras pertencentes ao táxon *Melipona* variou de 50,4 a 55,5% em *M. scutellaris* e *M. subnitida*–Ocara, respectivamente, e apresentou um conteúdo GC médio de 53,3% (TABELA 10). Entre as amostras extraídas no LGM, o conteúdo GC foi de 48,8% em *S. bipunctata*, 52,7% em *M. flavolineata*, *M. mondury*–Rio Vermelho, *M. mondury*–Pacoti e *M. mondury*–Guaramiranga e 53,6% em *M. fascicutata*.

Resultados semelhantes foram encontrados por FERNANDES-SALOMÃO *et al.* (2005), que trabalharam com 11 espécies do gênero *Melipona*, cujo conteúdo G + C da região ITS1 parcial variou de 49 a 54%. CRUZ *et al.* (2006) e PEREIRA *et al.* (aceito), que trabalharam respectivamente com *M. subnitida* e *M. quinquefasciata*, também obtiveram conteúdo GC similar ao do presente trabalho, mesmo esse autores trabalhando com variações intraespecíficas, seus conteúdo GC, de seqüências parciais da região ITS1 nrDNA, variaram de 53 a 56,2% e 52,5 a 54,4%, respectivamente.

TABELA 09 – Relação da “interseção central” entre todas as seqüências obtidas da região do rDNA ITS1 parcial das amostras o laboratório somadas às amostras importadas do *GenBank*, mostrando seus respectivos tamanhos em pares de bases (pb), composição nucleotídica e conteúdo GC (Guanina + Citosina).

Espécie	Nucleotídeos (%)				Conteúdo G+C (%)	Tamanho (pb)
	T	C	A	G		
<i>Melipona fasciculata</i>	24,4	26,0	22,0	27,6	53,6	127
<i>Melipona flavolineata</i>	26,4	24,0	20,9	28,7	52,7	129
<i>Melipona mondury</i> -Rio Vermelho	25,6	24,0	21,7	28,7	52,7	129
<i>Melipona mondury</i> -Pacoti	26,4	24,0	20,9	28,7	52,7	129
<i>Melipona mondury</i> -Guaramiranga	26,4	24,0	20,9	28,7	52,7	129
<i>Melipona scutellaris</i>	26,4	23,3	23,3	27,1	50,4	129
<i>Melipona quinquefasciata</i> -São Benedito	25,0	25,8	21,8	27,4	53,2	124
<i>Melipona quinquefasciata</i> -Jardim1	25,0	25,8	21,8	27,4	53,2	124
<i>Melipona quinquefasciata</i> -Flona1	25,0	25,8	21,8	27,4	53,2	124
<i>Melipona quinquefasciata</i> -Flona2	25,0	25,8	21,8	27,4	53,2	124
<i>Melipona quinquefasciata</i> -Flona3	25,0	25,8	21,8	27,4	53,2	124
<i>Melipona quinquefasciata</i> -Araripe1	25,0	25,8	21,8	27,4	53,2	124
<i>Melipona quinquefasciata</i> -Araripe3	25,0	25,8	21,8	27,4	53,2	124
<i>Melipona quinquefasciata</i> -Piauí	25,0	25,8	21,8	27,4	53,2	124
<i>Melipona quinquefasciata</i> -Goiás	25,0	25,8	21,8	27,4	53,2	124
<i>Melipona subnitida</i> -Chorozinho	25,4	26,2	20,6	27,8	54,0	126
<i>Melipona subnitida</i> -Quixelô	25,6	26,4	20,8	27,2	53,6	125
<i>Melipona subnitida</i> -Quixadá	25,6	26,4	20,8	27,2	53,6	125
<i>Melipona subnitida</i> -Mossoró	25,6	26,4	20,8	27,2	53,6	125
<i>Melipona subnitida</i> -Sobral	25,6	26,4	20,8	27,2	53,6	125
<i>Melipona subnitida</i> -Araioses	25,6	26,4	20,8	27,2	53,6	125
<i>Melipona subnitida</i> -Ocara	23,4	25,8	21,1	29,7	55,5	128
<i>Melipona subnitida</i> -Russas	25,6	26,4	20,8	27,2	53,6	125
<i>Melipona subnitida</i> -Milhã	25,6	26,4	20,8	27,2	53,6	125
<i>Melipona subnitida</i> -Aracati	22,5	23,3	22,5	31,8	55,1	129
<i>Melipona subnitida</i> -Aracoiaba	25,6	26,4	20,8	27,2	53,6	125
<i>Melipona subnitida</i> -João Câmara	25,6	25,6	21,6	27,2	52,8	125
<i>Melipona subnitida</i> -Sousa	26,4	25,6	20,8	27,2	52,8	125
<i>Melipona quadrifasciata</i>	26,2	27,0	20,6	26,2	53,2	126
<i>Melipona mandacaia</i>	25,8	27,3	20,3	26,6	53,9	128
<i>Scaptotrigona</i> sp.	29,6	23,2	21,6	25,6	48,8	125

T – Timina, C – Citosina, A – Adenina, G – Guanina.

5.7. Teste de saturação das substituições de bases

A análise de transições e transversões *versus* a divergência genética é imprescindível para qualquer estudo com seqüências de macromoléculas. Constituinto assim uma ferramenta importante para caracterizar se há ou não saturação de substituições entre as seqüências do mesmo gene para a categoria taxonômica em que se está

trabalhando, de modo a indicar a perda do sinal filogenético devido à presença de substituições múltiplas, o que irá determinar se o gene escolhido para reconstrução filogenética é apropriado ou não para inferir filogenias dos táxons estudados (SWOFFORD, 1996; HOLDER & LEWIS, 2003; FELSENSTEIN, 2004).

Então, através da FIGURA 07, pode-se perceber que não houve saturação de substituições entre as seqüências estudadas, uma vez que a taxa de transição/transversão se encontra aumentando de forma linear, por conseguinte, os dados podem ser utilizados para inferir filogenias.

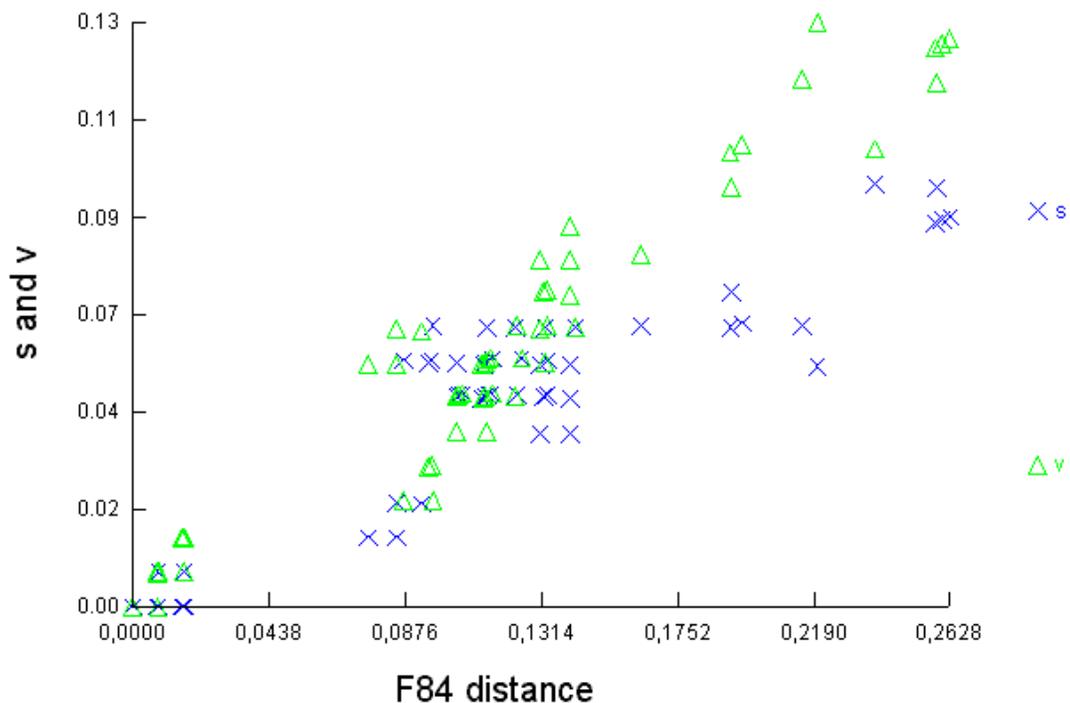


FIGURA 07 – Gráfico da taxa de transição (X s) e transversões (Δv) *versus* a divergência das seqüências utilizando o modelo F84 (FELSENSTINE, 1993), para os dados provenientes da interseção do alinhamento de todas as amostras estudadas, incluindo o grupo externo, da região nrDNA ITS1 parcial.

5.8. Teste do modelo

Todos os métodos filogenéticos realizam suposições, sejam elas explícitas ou implícitas, a respeito do processo de substituição de DNA (FELSENSTEIN, 1988). Conseqüentemente todos os métodos de inferência filogenética dependem de seus modelos

subjacentes. Para se ter confiança nas inferências é necessário ter confiança nos modelos (GOLDMAN, 1993). Portanto, todos os métodos baseados em modelos explícitos de evolução devem explorar aquele que melhor se adapta aos dados obtidos (RZHETSKY & NEI, 1992; POSADA & CRANDALL, 1998).

Segundo o teste do modelo realizado no presente trabalho pelo programa *ModelTest* (POSADA & CRANDALL, 1998), o modelo de substituição mais adequado para os dados obtidos através do alinhamento da “interseção central” entre todas as seqüências estudadas é o modelo matemático de JUKES & CANTOR (1969), que é um modelo baseado na distribuição de Poisson, que leva em consideração substituições múltiplas, além de considerar freqüências de base iguais (PEREIRA, 2001).

TABELA 10 – Resultados do teste do modelo, utilizando o programa *ModelTest*, para os dados da interseção do alinhamento das seqüências das amostras estudadas, incluindo o grupo externo, da região nrDNA ITS1 parcial.

Modelo selecionado:	Jukes-Cantor (+I +G)
Logaritmo da verossimilhança (-lnL)	493,4961
Freqüência de bases:	considerou freqüências iguais
Freqüência de A =	0,2500
Freqüência de C =	0,2500
Freqüência de G =	0,2500
Freqüência de T =	0,2500
Taxas de substituição:	Considerou taxas iguais para todas
Matriz de freqüências:	
R(a) [A-C] =	0,1666
R(b) [A-G] =	0,1666
R(c) [A-T] =	0,1666
R(d) [C-G] =	0,1666
R(e) [C-T] =	0,1666
R(f) [G-T] =	0,1666
Taxa de variação entre sítios:	
Proporção de sítios invariáveis (I) =	0
Proporção de sítios variáveis (G)	
parâmetro para forma da distribuição Gamma =	taxas iguais para todos os sítios

5.9. Matriz de distância genética das amostras do táxon *Melipona*

A matriz de distância das sequencias parciais da região ITS1 do nrDNA foi calculada utilizando o modelo de substituição de Jukes & Cantor, e os *indels* foram considerados como dados perdidos, assim sendo comparados apenas 121 pb. A média da distância genética entre todas as seqüências do táxon *Melipona* foi de 0,076 (TABELA

08), o que representa uma diferença aproximadamente de nove nucleotídeos (7,6%). Diferenças entre essas seqüências (excluindo *indels*) variaram de 0 a 32 (0% a 26,5%) nucleotídeos, assim representando uma máxima divergência ao redor de 26,5% (FIGURA 08).

A diferença genética das amostras do táxon *Melipona* extraídas no LGM foi de: 0% entre *M. flavolineata* e *M. mondury*-Pacoti, também entre *M. flavolineata* e *M. mondury*-Guaramiranga e entre *M. mondury*-Pacoti e *M. mondury*-Guaramiranga; 0,8% (1 nucleotídeo) entre *M. flavolineata* e *M. mondury*-Rio Vermelho, também entre *M. mondury*-Rio Vermelho e *M. mondury*-Pacoti, e entre *M. mondury*-Rio Vermelho e *M. mondury*-Guaramiranga; 11,6% (aproximadamente 14 nucleotídeos) entre *M. fasciculata* e *M. flavolineata*, também entre *M. fasciculata* e *M. mondury*-Pacoti e entre *M. fasciculata* e *M. mondury*-Guaramiranga; 12,6% (aproximadamente 15 nucleotídeos) entre *M. fasciculata* e *M. mondury*-Rio Vermelho.

FERNANDES-SALOMÃO *et al.* (2005), trabalhando com seqüências completas da região ITS1 do nrDNA observaram que a distância genética entre *M. mandacaia* e *M. quadrifasciata anthidioides* (ambas pertencentes ao subgênero *Melipona*) é apenas de 1,4%, enquanto que no presente trabalho, cujas seqüências foram apenas parciais, pode-se observar um valor de 0,8%. Os mesmos autores ainda observaram que tanto *M. mandacaia* quanto *M. quadrifasciata anthidioides*, quando eram comparadas com *M. scutellaris* (subgênero *Michmelia*) esse percentual da distância genética aumentava para 25%. Já no presente trabalho foi notado uma distância genética de 10,6% entre *M. mandacaia* e *M. scutellaris*; e de 11,6% entre *M. quadrifasciata* e *M. scutellaris*.

De acordo com SCNHEIDER (2003), nem todos os sítios evoluem na mesma taxa, ou seja, existe heterogeneidade para as taxas de substituições ao longo dos sítios. Portanto, esses resultados sugerem que o fragmento da região ITS1 seqüenciado no presente trabalho representa uma zona com menores percentuais de mudanças nucleotídicas, ou seja, mais conservado, quando comparado com a região ITS1 como um todo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30						
[1]																																				
[2]	0.116																																			
[3]	0.126	0.008																																		
[4]	0.116	0.000	0.008																																	
[5]	0.116	0.000	0.008	0.000																																
[6]	0.000	0.116	0.126	0.116	0.116																															
[7]	0.000	0.116	0.126	0.116	0.116	0.000																														
[8]	0.000	0.116	0.126	0.116	0.116	0.000	0.000																													
[9]	0.000	0.116	0.126	0.116	0.116	0.000	0.000	0.000																												
[10]	0.000	0.116	0.126	0.116	0.116	0.000	0.000	0.000	0.000																											
[11]	0.000	0.116	0.126	0.116	0.116	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																										
[12]	0.000	0.116	0.126	0.116	0.116	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																									
[13]	0.000	0.116	0.126	0.116	0.116	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																								
[14]	0.000	0.116	0.126	0.116	0.116	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																							
[15]	0.078	0.106	0.106	0.106	0.106	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078						
[16]	0.088	0.116	0.116	0.116	0.116	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.008						
[17]	0.230	0.265	0.265	0.265	0.265	0.230	0.230	0.230	0.230	0.230	0.230	0.230	0.230	0.230	0.230	0.230	0.230	0.230	0.230	0.230	0.230	0.230	0.230	0.230	0.136	0.145										
[18]	0.078	0.106	0.106	0.106	0.106	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.000	0.008	0.136									
[19]	0.078	0.106	0.106	0.106	0.106	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.000	0.008	0.136	0.000								
[20]	0.078	0.106	0.106	0.106	0.106	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.000	0.008	0.136	0.000	0.000								
[21]	0.078	0.106	0.106	0.106	0.106	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.000	0.008	0.136	0.000	0.000	0.000							
[22]	0.078	0.106	0.106	0.106	0.106	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.000	0.008	0.136	0.000	0.000	0.000	0.000						
[23]	0.156	0.197	0.197	0.197	0.197	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.078	0.088	0.219	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078						
[24]	0.078	0.106	0.106	0.106	0.106	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.000	0.008	0.136	0.000	0.000	0.000	0.000	0.078					
[25]	0.088	0.116	0.116	0.116	0.116	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.008	0.017	0.145	0.008	0.008	0.008	0.008	0.088	0.008				
[26]	0.078	0.106	0.106	0.106	0.106	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.000	0.008	0.136	0.000	0.000	0.000	0.000	0.078	0.000	0.008			
[27]	0.078	0.106	0.106	0.106	0.106	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.000	0.008	0.136	0.000	0.000	0.000	0.000	0.078	0.000	0.008	0.000		
[28]	0.088	0.116	0.116	0.116	0.116	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.008	0.017	0.145	0.008	0.008	0.008	0.008	0.088	0.008	0.017	0.008	0.008	
[29]	0.078	0.106	0.106	0.106	0.106	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.000	0.008	0.136	0.000	0.000	0.000	0.000	0.078	0.000	0.008	0.000	0.000	0.008
[30]	0.126	0.008	0.000	0.008	0.008	0.126	0.126	0.126	0.126	0.126	0.126	0.126	0.126	0.126	0.126	0.126	0.106	0.116	0.265	0.106	0.106	0.106	0.106	0.106	0.197	0.106	0.116	0.106	0.106	0.116	0.106	0.106	0.106	0.106	0.106	

1- *M. fasciculata*; 2- *M. flavolineata*; 3- *M. mondury*-Rio Vermelho; 4- *M. mondury*-Pacoti; 5- *M. mondury*-Guaramiranga; 6- *M. quinquefasciata*-Flona1; 7- *M. quinquefasciata*-Flona2; 8- *M. quinquefasciata*-Flona3; 9- *M. quinquefasciata*-Araripe1; 10- *M. quinquefasciata*-Araripe3; 11- *M. quinquefasciata*-Jardim1; 12- *M. quinquefasciata*-São Benedito; 13- *M. quinquefasciata*-Canto do Buriti; 14- *M. quinquefasciata*-Goiás; 15- *M. subnitida*-Quixadá; 16- *M. subnitida*-Sousa; 17- *M. subnitida*-Ocara; 18- *M. subnitida*-Mossoró; 19- *M. subnitida*-Russas; 20- *M. subnitida*-Sobral; 21- *M. subnitida*-Milhã; 22- *M. subnitida*-Quixeló; 23- *M. subnitida*-Aracati; 24- *M. subnitida*-Aracoiaba; 25- *M. subnitida*-João Câmara; 26- *M. subnitida*-Chorozinho; 27- *M. subnitida*-Araioses; 28- *M. quadrifasciata*; 29- *M. mandacaia*; 30- *M. scutellaris*.

FIGURA 08 – Matriz de distância genética com os respectivos coeficientes de dissimilaridade genética entre as seqüências parciais da região ITS1 do nrDNA das amostras do táxon *Melipona*, segundo o modelo matemático proposto por Jukes e Cantor (JC), calculada através do programa MEGA.

5.10. Árvores filogenéticas

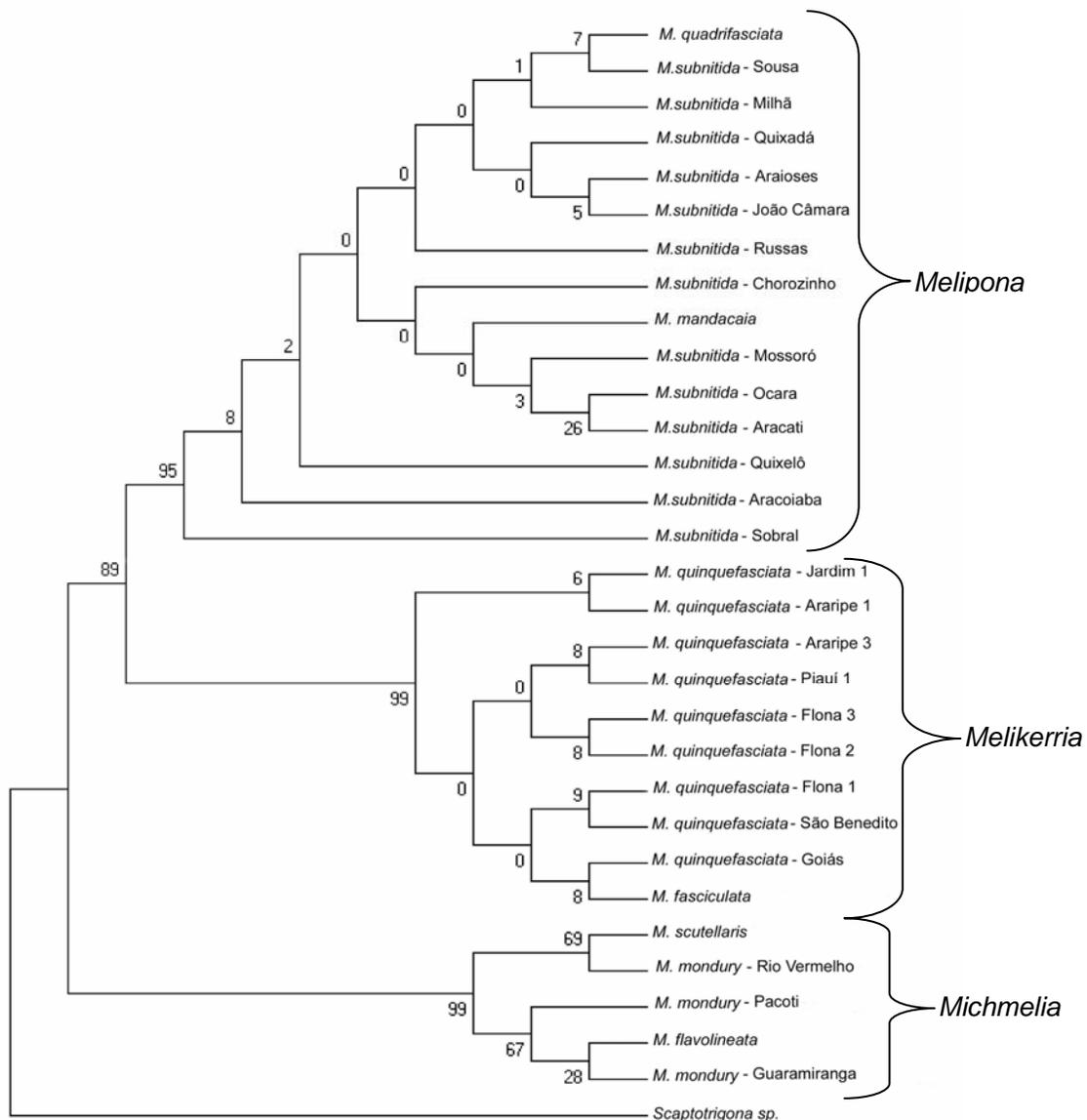


FIGURA 09 – Árvore consenso gerada pela análise do agrupamento do vizinho mais próximo (NJ), com *bootstrap* de 1000 replicações, da região ITS1 parcial do nrDNA para o táxon *Melipona*, utilizando como grupo externo *Scaptotrigona sp.*. Os valores de bootstrap encontram-se na base dos ramos.

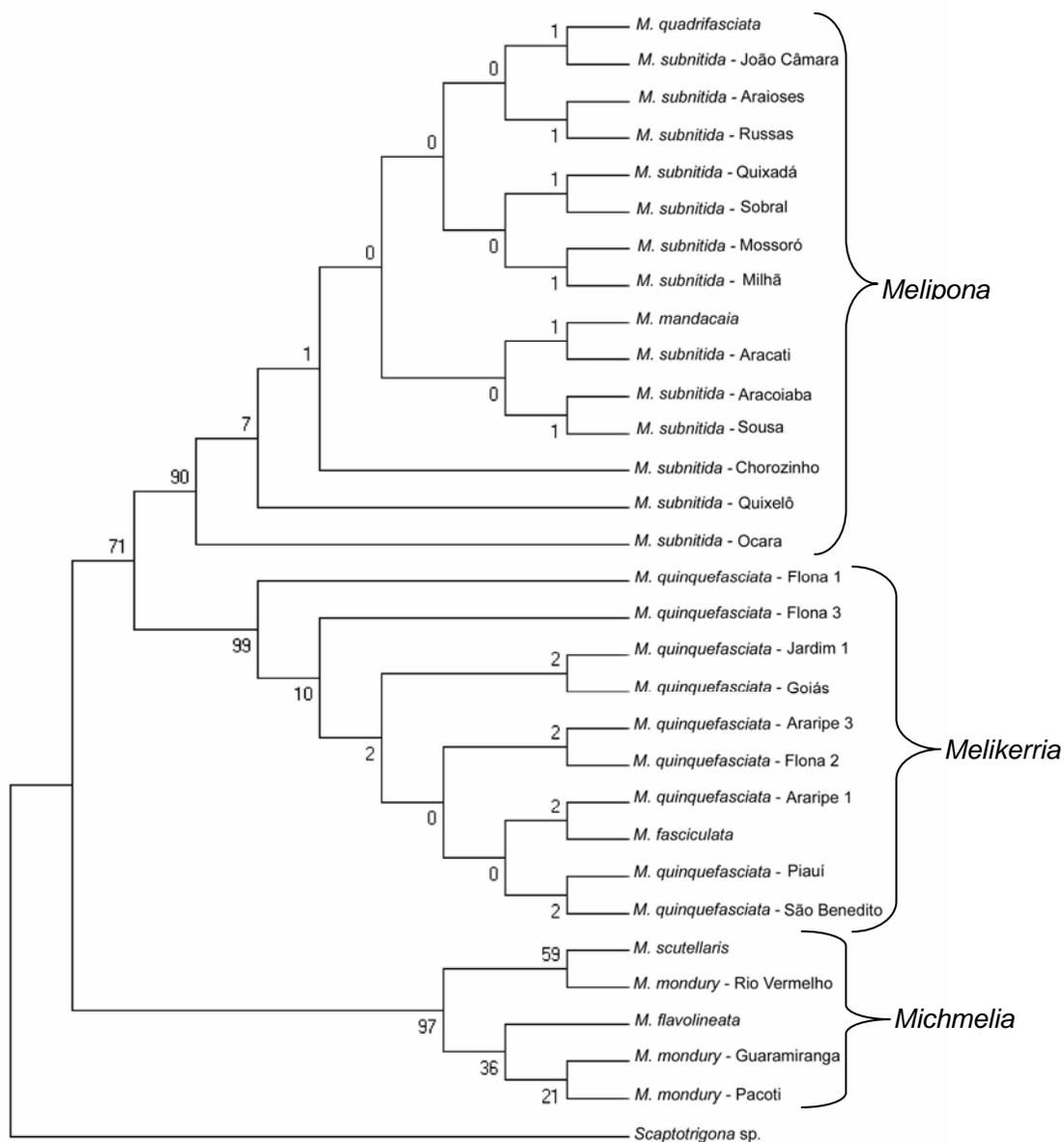


FIGURA 10 – Árvore consenso gerada pela análise de máxima parcimônia (MP), com *bootstrap* de 1000 replicações, da região ITS1 parcial do nrDNA para o táxon *Melipona*, utilizando como grupo externo *Scaptotrigona* sp. Os valores de bootstrap encontram-se na base dos ramos.

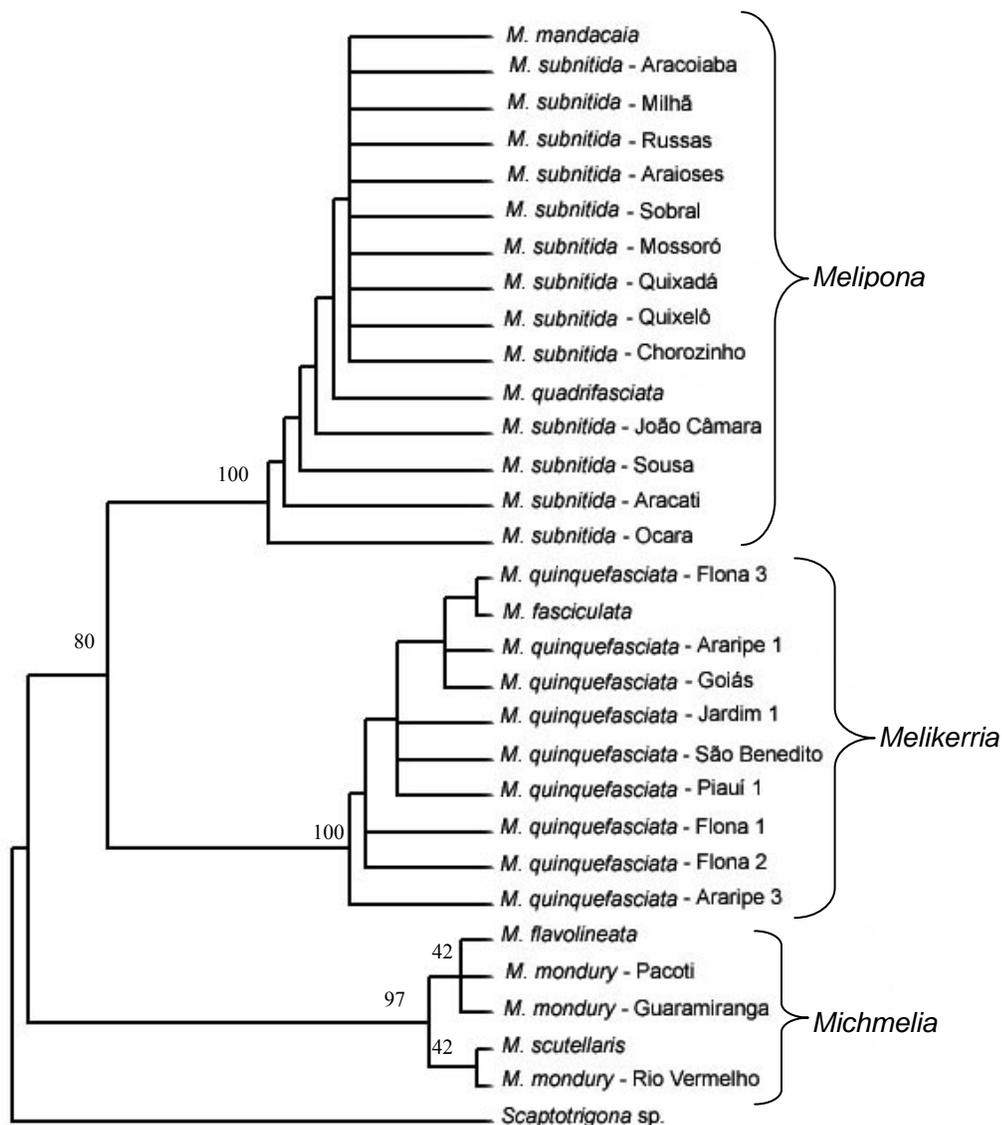


FIGURA 11 – Árvore consenso gerada pela análise de máxima verossimilhança (MV), com *bootstrap* de 100 replicações, da região ITS1 parcial do nrDNA para o táxon *Melipona*, utilizando como grupo externo *Scaptotrigona* sp. Os valores de bootstrap encontram-se na base dos ramos.

As árvores construídas usando algoritmos baseados nos métodos de agrupamento do vizinho mais próximo (NJ), máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (MV) para as seqüências parciais da região pesquisada mostraram essencialmente a mesma topologia (FIGURA 09, 10 e 11), com ligeiras variações tanto na resolução dos ramos terminais como nos valores de *bootstrap*. Contudo, incoerências entre topologias geradas por diferentes métodos podem levantar a questão de qual análise seria a mais confiável. Simulações computacionais realizadas por NEI (1991) *apud* NEI & KUMAR (2000), demonstraram que quando a divergência entre as seqüências é baixa, quando a taxa de substituição nucleotídica é relativamente constante e há um grande número de nucleotídeos a serem examinados, a análise de MP é melhor do que os métodos de distância para se obter a topologia real. Desse modo, as amostras estudadas preenchem todos os requisitos acima listados, implicando que o método de máxima parcimônia é bastante adequado para representar a topologia verdadeira.

A análise de máxima parcimônia incluiu 19 sítios informativos à parcimônia, considerando os *gaps* como dados perdidos e assim levando em consideração apenas 120 sítios do total de 141 alinhados. A árvore consenso do método MP foi gerada a partir de 480 árvores confeccionadas pelo programa, cujas árvores apresentaram índice de consistência (CI – consistency index) de 0.963 e índice de retenção (RI – retention index) de 0.985. Esta análise aliada ao teste estatístico do *bootstrap* com 1000 replicações gerou a árvore consenso presente na FIGURA 10.

Esses índices calculados ao final da análise de máxima parcimônia também indicam quando a topologia está bem determinada. Um CI próximo a 1 implica numa baixa quantidade de homoplasias nos sítios analisados, assim como, valores de RI próximos a 1 implicam que os sítios são bem informativos para a construção de árvores mais parcimoniosas (NEI & KUMAR, 2000; SCHNEIDER, 2003). Como todos os índices obtidos foram maiores que 0,963, a topologia gerada através deste método (MP) se encontra bem consistente no presente trabalho.

Três grupos principais, sustentados por altos valores de *bootstrap* ($\geq 95\%$), foram bem definidos nas três árvores confeccionadas e organizados como a seguir: Grupo 1- contendo as sequências de *M. subnitida*, *M. quadrifasciata* e *M. mandacaia* (todas pertencendo ao subgênero *Melipona*); grupo 2 – abrangendo as seqüências de *M.*

quinquefasciata e *M. fasciculata* (ambas pertencendo ao subgênero *Melikerria*); grupo 3 – tendo como representantes no presente trabalho, as seqüências de *M. mondury*, *M. flavolineata* e *M. scutellaris* (todas pertencentes ao subgênero *Michmelia*).

Através das três árvores apresentadas no presente trabalho ainda podemos notar a disposição do grupo 3 (representado pelas abelhas do subgênero *Michmelia*) em um ramo mais basal, enquanto que os outros dois grupos (subgêneros *Melipona* e *Melikerria*) encontram-se dispostos no ramos mais apicais.

Todas as árvores filogenéticas foram capazes de recuperar a monofilia tanto do gênero *Melipona* como também a dos três clados, que apareceram como grupos monofiléticos suportados por valores de *bootstrap* acima de 95%. Esses clados são compatíveis com os subgêneros, baseados em caracteres morfológicos, propostos por MOURE (1992) e SILVEIRA *et al.* (2002) e também são compatíveis com os mesmos subgêneros suportados e baseados em dados moleculares relatados por FERNANDES-SALOMÃO *et al.* (2005).

No entanto, os dados de seqüências parciais da região ITS1 do nrDNA das amostras estudadas foram insuficientes para distinguir as amostras estudadas em espécies distintas, suportadas por bons valores de *bootstrap* (acima de 75%) quando comparadas dentro do mesmo subgênero. Esse resultado deve-se, principalmente, ao fato de que o comprimento da “interseção central” obtida entre as 31 amostras estudadas (141 pb) foi bastante pequena quando comparada ao real tamanho da região ITS1 no táxon *Melipona*, que varia de 1400 até próximo a 2000 pb (FERNANDES-SALOMÃO *et al.*, 2002; FERNANDES-SALOMÃO *et al.*, 2005; CRUZ *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, aceito).

6. CONCLUSÕES

- O fragmento parcial da região ITS1 do nrDNA obtido no presente trabalho mostrou-se uma seqüência com grande potencial para uma melhor resolução dos problemas filogenéticos em nível de subgênero do táxon *Melipona*.
- Os três subgêneros estudados mostraram-se monofiléticos para todos os três métodos de reconstrução filogenética analisados (NJ, MP e MV).
- A “interseção central” das seqüências parciais, da região ITS1 do nrDNA, das amostras estudadas não foi capaz de desvendar os problemas filogenéticos e assim propor uma classificação em nível de espécie, baseada em dados moleculares para o táxon *Melipona*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES-DOS-SANTOS, I. . A vida de uma abelha solitária. **Ciência hoje**, Rio de Janeiro, v. 179, p. 60 - 62, 01 jan. 2002.
- AMORIM, D. S. **Fundamentos de sistemática filogenética**. Holos, Editora Ltda-ME. Ribeirão Preto - SP. 156p. 2002.
- ARIAS, M. C.; BRITO, R. M.; FRANCISCO, F. O.; MORETTO, G.; OLIVEIRA, F. F.; SILVESTRE, D.; SHEPPARD, W. S. Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. **Apidologie**, v. 37, p. 259-274, 2006.
- ARMBRUSTER, G. F. J. & KORTE, A. Genomic nucleotide variation in the ITS1 rDNA spacer of land snails, **Journal of molluscan studies**, v. 72, p. 211-219. 2006.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402. 1997.
- BALDWIN, B. G.; SANDERSON, M. J.; PORTER, J. M.; WOJCIECHOWSKI, M. F.; CAMPBELL, C. S.; DONOGHUE, M. J. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 82, p. 247-277. 1995.
- BARNI, G. S.; STRAPAZZON, R.; GUERRA, J. C. V. Jr.; MORETTO, G. Mitochondrial genome differences between the stingless bees *Melipona rufiventris* and *Melipona mondury* (Apidae: Meliponini). **Genetics and molecular research**, v. 6, n. 3, p. 8-14. 2007.
- BEZERRA, J. M. D. Meliponicultura: uma atividade essencial para a economia familiar do trópico úmido. *In: Agroambientes de transição : entre o trópico úmido e o semi-árido.* / org: MOURA, E. G. de. São Luís: UEMA, p. 144-203. 2002.

- BOSCHILIA, C. **Minimanual compacto de biologia: teoria e prática**. São Paulo: Rideel. 2001.
- BROCCHIERI, L. Phylogenetics Inference from Molecular Sequences: Review and critique. **Theoretical Population Biology** v. 59, p. 27-40. 2001.
- BROWN, S. M. Bioinformatics: a biologist's guide to biocomputing and the internet. Natick : **Eaton Publishing**. 188 p. 2000.
- BUSO, G. S. C. **Marcadores moleculares e análise filogenética**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 22p. 2005.
- CAMARA, J. Q.; SOUSA, A. H.; VASCONCELOS, W. E.; FREITAS, R. S.; MAIA, P. H. da S.; ALMEIDA, J. C. de; MARACAJÁ, P. B. Estudos de meliponíneos, com ênfase a *Melipona subnitida* D. no município de Jandaíra, RN. **Revista de biologia e ciência da terra**, v. 4, n.1. 2004.
- CAMARGO, J. M. F. & MOURE, J. S. Meliponinae neotropicais: os gêneros *Paratrigona* Schwarz, 1938 e *Aparatrigona* Moure, 1951 (Hymenoptera, Apidae). *Arquivos de zoologia*, v. 32, p. 33-109. 1994.
- CARVALHO, C. A. L. de; ALVES, R. M. de O.; SOUZA, B. de A. **Criação de abelhas sem ferrão: aspectos práticos**. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI – BA. 42p. 2003.
- CIDRACK, D. S.. **Distância genética entre genótipos de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp.) baseada nas seqüências dos espaçadores transcritos internos do DNA ribossômico nuclear**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza 2003.
- CORPET, F. & CHEVALET, C. Analyse informatique des données moléculaires. In: BIDÉ, B.; DUCOS, A.; GILLET, P.; ROY, P. L.; MANFREDI, E.; MULSANT, P.; LAAN, M. H. P. V. D.; ROGEL-GAILLARD, C.; SELLIER, VAIMAN, D.; YERLE,

- M. (Eds). Génétique moléculaire: princeps et application aus populations animales. Cap. 6. Versailles: **INRA** Editions, p. 187-195. 2000.
- CRUZ, D. O.; JORGE, D.M.M.; PEREIRA, J.O.P.; TORRES, D.C.; SOARES, C.E.A.; FREITAS, B.M.; GRANGEIRO, T.B. Intraspecific variation in the first internal transcribed spacer of the nuclear ribosomal DNA in *Melipona subnitida* (Hymenoptera, Apidae), an endemic stingless bee from northeastern Brazil. **Apidologie**, v. 37. 2006.
- DOYLE, J. J. Variation at DNA level: Uses and Potential in Legume Systematics. In: STIRTON, C. H. (eds.) Advances in Legume Systematics Part 3. p. 1-30. Royal **Botanical Gardens, Kew**. 466p. 1987.
- DUCKE, A. Enumeração dos hymenopteros colligidos pela comissão e revisão das espécies de abelhas do Brasil. Publicação **Comissão de Linhas Telegraficas Estrategicas de Matto Grosso ao Amazonas**. n. 35, anexo n. 5, Historia Natural, Zoologia, p. 1-175. 1916.
- EWING, B. & GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194. 1998.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C., & GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185. 1998.
- FELSENSTEIN, J. Phylogenies from molecular sequences: inferences and reliability. **Annual Review of Genetics**, v. 22, p. 521-565. 1988.
- FELSENSTEIN, J. **Inferring phylogenies**. Sinauer Associates, Sunderland, Mass. 2004.
- FERNANDES-SALOMÃO, T. M.; MURO-ABDA, J. I.; CAMPOS, L. A. O. & ARAÚJO, E. F. Brief report mitochondrial and nuclear DNA characterization in the *Melipona* species (Hymenoptera, Meliponini) by RFLP analysis. **Hereditas**. v. 137, p. 229-233. 2002.

- FERNANDES-SALOMÃO, T. M.; ROCHA, R. B.; CAMPOS, L. A. O. & ARAÚJO, E.F. The first internal transcribed spacer (ITS-1) of *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): characterization and phylogenetic analysis. **Insectes Sociaux**, v. 52, p. 11-18. 2005.
- FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª Edição. EMBRAPA-CENARGEN. 220p. 1998.
- FOSTER, G. R. & TWELL, D. **Plant Gene Isolation. Principles and Practice**. John Wiley & Sons Ltd. West Sussex, England. 426pp. 1996.
- FREITAS, B. M.. **A vida das abelhas**. Fortaleza: UFC. Craveiro& Craveiro. CD Rom. 1999.
- FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 631p. 2002.
- GAMA, M. I. C. Identificação de plantas transgênicas por PCR. In: BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. C. (eds.). **Manual de transformação genética de plantas**. EMBRAPA. Brasília, DF. p. 179 – 189. 1998.
- GOLDMAN, N. Statistical tests of models of DNA substitution. **J. Mol. Evol.** v. 36, p. 182-198. 1993.
- GORAB, E. Evolução dos genes nucleares de RNA ribossômico. *In*: MATIOLI, S. R. (ed.) **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora, cap. 6, p. 64 - 69. 2001.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A Graphical Tool for Sequence Finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202. 1998.
- GORDON, D.; DESMARAIS, C.; GREEN, P. Automated Finishing with Autofinish. **Genome Research**, v. 11, n. 4, p. 614-625. 2001.

- GRAUR, D. & LI, W. -H. **Fundamentals of Molecular Evolution**. Sinauer Associates, Inc. Second Edition. Sunderland, U. S. A. 481p. 2000.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98. 1999.
- HILLIS, D. M. & BULL, J. J. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence phylogenetic analysis. **Systematic Biology**, v. 42, p. 182-192. 1993.
- HOLDER, M. & LEWIS, P. O. Phylogeny estimation: traditional and bayesian approaches. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, p. 275-284.
- JOBES, D. V. & THIEN, L. B. A conserved motif in the 5,8S ribosomal RNA (rRNA) gene is a useful diagnostic marker for plant internal transcribed spacer (ITS) sequences. **Plant molecular biology reporter**, v. 15, p. 326-334. 1997.
- JORGE, D. M. M. **Filogenia molecular de Apidae (Insecta: Hymenoptera) baseada em seqüências do DNA ribossomal 18S**. Monografia (Bacharel em Biologia). Departamento de Biologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 129 f. 2004
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S. & STEVENS, P. F. **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach**. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, MA, USA. 1999.
- JUKES, T. & CANTOR, C. Evolution of protein molecules. *In: Mammalian Protein Metabolism* (Munro, H., ed.), p. 21–123. New York: Academic Press. 1969.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação**. 1. ed. Belo Horizonte: Fundação Acangaú, 1996. 144 p.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G.A.; COLETTO da SILVA, A.; PAIVA de ASSIS, M.G. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica - Biodiversidade, pesquisa e desenvolvimento na Amazônia. **Parcerias estratégicas**. n. 12. p. 22. 2001.

- KERR, W. E.; PISANI, J. F.; AILY, D. Aplicação de princípios modernos à sistemática do gênero *Melipona* lliger, com divisão em dois subgêneros (Hymenoptera, Apoidea). **Papéis Avulsos de Zoologia** (São Paulo), v. 20, p. 135-145. 1967.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, n. 2, p. 150-163. 2004.
- LIMA, J. P. M. S. **Estudos Taxonômicos Moleculares no táxon Phaseoleae DC. (Leguminosae, Papilionoideae) utilizando seqüências de DNA ribossômico (rDNA)**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Vegetal). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 136f. 2003.
- LIMA-VERDE, L.W. & FREITAS, B.M. Occurrence and biogeographic aspects of *Melipona quinquefasciata* in NE Brazil (Hymenoptera, Apidae). **Brazilian Journal Biology**, v. 62, n. 3, p. 479-486. 2002.
- MAI, J. C. & COLEMAN, A. W. Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness. **Journal of Molecular Evolution**. v. 45, n. 2, p. 168 -177. 1997.
- MARQUES, F. P. L. **Introdução à sistemática molecular**. Apostila de curso, 50p. 2001.
- MASCARA, D. Marcadores moleculares a partir do genoma de organismos endossimbiontes. **Biológico**. São Paulo, v. 69, sup. 2, p. 65. 2007
- MELO, G. A. R. Notas sobre meliponíneos neotropicais, com a descrição de três novas espécies (Hymenoptera, Apidae). *In*: G. A. R. Melo & I. Alves dos Santos, **Apoidea neotropica**: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure, pag 85 a 91. Editora UNESC, Criciúma. 2003.

- MEYER, D. Árvores evolutivas humanas – Uma discussão sobre inferência filogenética. *In: DUARTE, F. A. M. (ed). Série monografias* nº 3. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto – SP. p.1-162. 1996.
- MICHENER, C.D. **The bees of the world**. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London. 2000.
- MILLACH, S. C .K. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. *In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S .R. R., (ed.) Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste brasileiro.* (online). Versão 1.0. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido / Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível via Word Wide Web <http://www.cpatsa.embrapa.br>. 1999.
- MIYAKI, C. Y.; RUSSO, C. A. M.; PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética. Introdução e o método da parcimônia. *In: MATIOLI, S. R. (ed.) Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos Editora, cap. 9, p. 97-107. 2001.
- MOUNT, D W. Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis, 2nd Edition, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 692 p. 2004.
- MOURE, J. S. *Melikerria* e *Eomelipona*, dois subgêneros novos em *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera, Apidae). **Naturalia** (UNESP) (nº especial em homenagem aos 70 anos do prof. Kerr). P. 32-38. 1992.
- MOURE J. S. Notas sobre Meliponinae (Hymenoptera, Apoidea), **Dusenía**, v.2, p. 25-50. 1951.
- MOURE, J. S. & KERR, W. E. Sugestões para a modificação de sistemática do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apidae). **Dursenia**, v.2, p.105-131. 1950.
- NAHUM, L. A. Evolução dos genomas. *In: MATIOLI, S. R. (ed.) Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos Editora, cap. 8, p 82-96. 2001.

- NASCIMENTO, V. A.; MATUSITA, S. H.; KERR, W. E. Evidence of hybridization between two species of *Melipona* bees. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto SP Brasil, v. 23, n. 1, p. 79-81, 2000
- NEI, M. Relative efficiencies of different tree making methods for molecular data. *In*: MIYAMOTO, M. M. & CRACRAFT, J. L. (eds.) **Recent advances in phylogenetic studies of DNA sequences**, p. 133-147. Oxford University Press, Oxford, UK. 1991.
- NEI, M. & KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford University Press, Inc. New York, United States of America. 333 pp. 2000.
- NETTO, L. E. S. & MENCK, C. F. M. Estabilidade do material genético: mutagênese e reparo. *In*: MATIOLI, S. R. (ed.) **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora, cap. 4, p. 40-50. 2001.
- NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. Editora Nogueirapis. São Paulo. 445p. 1997.
- NOGUEIRA-NETO, P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; KLEINERT-GIOVANNINI, A.; VIANA, B. F.; CASTRO, M. S. **Biologia e manejo das abelhas sem ferrão**. São Paulo: Tecnapis, 54p. 1986.
- OLIVERIO, M., CERVELLI, M. & MARIOTTINI, P. ITS2 rRNA evolution and its congruence with the phylogeny of muricid neogastropods (Caenogastropoda, Muricoida). **Molecular Biology and Evolution**. vol. 25, p. 63-69. 2002.
- PAGE, R. D. M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, vol. 12, p. 357-358. 1996.
- PAGE, R. D. M. & HOLMES, E. C. **Molecular evolution: a phylogenetic approach**. Blackwell science, 346 p. 2001.
- PEREIRA, J. O. P. **Diversidade genética da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata* baseada no seqüenciamento das regiões ITS1 parcial e 18S do**

- DNA ribossômico nuclear.** Tese de doutorado (Doutorado em Zootecnia). Departamento de Zootecnia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 141f. 2006.
- PEREIRA, J. O. P.; FREITAS, B. M.; JORGE, D. M. M.; TORRES, D. C.; SOARES, C. E. A.; GRANGEIRO, T. B. Genetic variability in *Melipona quinquefasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) from northeastern Brazil as determined using the first internal transcribed spacer (ITS1). **Genetics and Molecular Research**, (ACEITO).
- PEREIRA, S. L **Filogenia molecular e evolução em Cracidae (Aves).** Tese de doutorado (Doutorado em Ciências). Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 184f. 2000.
- PEREIRA, S. L.; MIYAKI, C. Y. & RUSSO, C. A. de M. Reconstrução filogenética: Métodos probabilísticos. *In*: MATIOLI, S. R. (ed.) **Biologia molecular e evolução.** Ribeirão Preto: Holos, cap. 11, p. 117-129. 2001.
- PHILLIPS, A., JANIES, D. & WHEELER, W. Multiple Sequence Alignment in Phylogenetic Analysis. **Molecular Phylogenetics and Evolution** v.16, n.3, p. 317-330. 2000.
- POSADA, D. & CRANDALL, K. A. ModelTest: Testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, p. 817-818. 1998.
- PROSDOCIMI, F.; CERQUEIRA, G. C.; BINNECK, E.; SILVA, A. F.; REIS, A. N. dos; JUNQUEIRA, A. C. M.; SANTOS, A. C. F. dos; WUST, C. I.; CAMARGO-FILHO, F.; KESSEDJIAN, J. L.; PETRETSKI, J. H.; CAMARGO, L. P.; FERREIRA, R. de G. M.; LIMA, R. P.; PEREIRA, R. M.; JARDIM, S.; SAMPAIO, V. de S.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A. V. **Bioinformática: manual do usuário.** **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, nº 29. 2003.
- RASMUSSEN, C. & CAMERON S. A. A molecular phylogeny of old world stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) and the non-monophyly of the large genus *Trigona*. **Systematic entomology**, v. 32, p. 26-39. 2007.

- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Sexta edição. Ed. Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro – RJ. 906 pp. 2001.
- ROKAS, A. & HOLLAND, P. W. H. Rare genomic changes as a tool for phylogenetics. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 15, p. 454-459. 2000.
- ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos Vegetais. *In*: BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. C. (eds.) **Manual de Transformação de genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-Cenargen, cap. 11, p. 163-177. 1998.
- ROMANO, E. & BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 5, n. 29. 2003.
- ROUBIK, D. W. **Ecology and natural history of tropical bees**. New York: Cambridge University Press. 514p. 1992.
- RUSSO, C. A. M. Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos. *In*: MATIOLI, S. R. (ed.) **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, cap. 12, p. 130-136. 2001.
- RUSSO, C. A. M.; MIYAKI, C. Y.; PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética: Métodos geométricos. *In*: MATIOLI, S. R. (ed.) **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora, cap. 10, p. 108-116. 2001.
- RZHETSKY, A., NEI, M., 1992. A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. **Mol. Biol. Evol.**, v. 9, p. 945–967.
- SAITOU, N. & NEI, M.. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425. 1987.
- SAKAGAMI, S. F. Stingless bees. *In*: Hermann H.R. **Social Insects**. Academic Press Inc., v.3, p. 361-423. 1978.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning. A laboratory manual**. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467. 1977.
- SCHNEIDER, H. **Métodos de Análise Filogenética: Um Guia Prático**. 2ª edição. Holos Editora, Ribeirão Preto – SP. 114 pp. 2003.
- SCHWARZ, H.F. The genus *Melipona*: The type genus of the Meliponidae or stingless bees. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 63, p. 231-460. 1932.
- SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. 1ª. ed. Belo Horizonte. 253p. 2002.
- SILVESTRE, D. **Seqüenciamento e análise do genoma mitocondrial de *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo, 119f. 2002.
- SOARES, C. E. A. **Polimorfismo nas seqüências da região ITS/5,8S e mapas protéicos bidimensionais de genótipos de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*): feramentas para conservação e melhoramento da cultura**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 131 f. 2005.
- SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. (ed.) **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, cap. 17, p. 172-192. 2001.
- SOUSA, C. S. de; KERR, W. E.; BONETTI, A. M.; SOUZA, C. S. de; SANTANA, F. A.; GOULART, L. R.; OLIVEIRA, R. de C.; VIEIRA, C. U.; VASCONCELOS, S. M. Comparação das técnicas de SSCP, DS-PCR, PCR-RFLP para detecção de mutação no

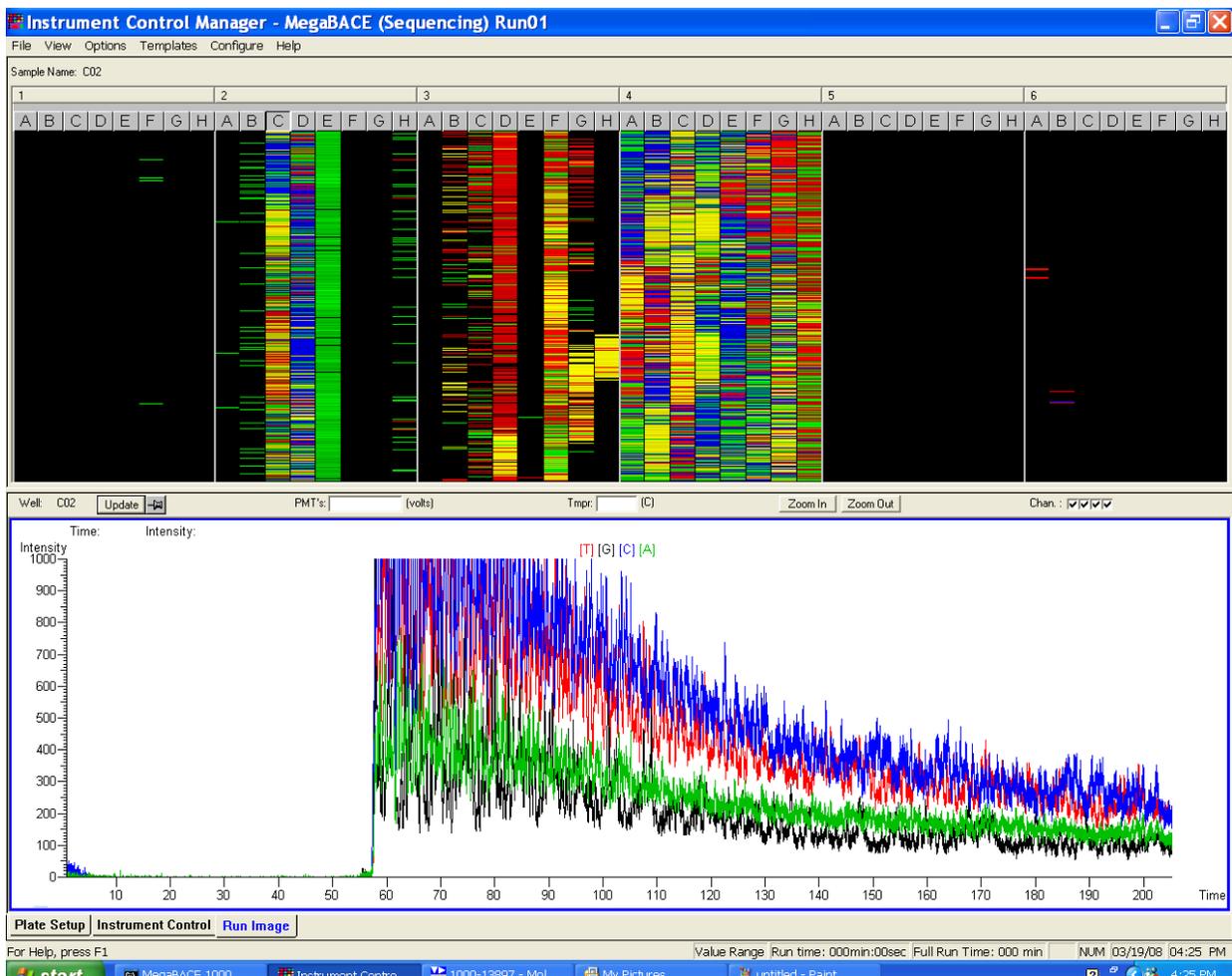
- gene mitocondrial 16S rRNA em populações de *Melipona rufiventris*. **Bioscience Journal**, v. 19, n. 1, p. 65-70. 2003.
- STEINER, G.; DREYER, H. Molecular phylogeny of Scaphopoda (Mollusca) inferred from 18S rDNA sequences: support for a Scaphopoda-Cephalopoda clad. **Zoologica Scripta**. v. 32, p. 343-356. 2002.
- SWOFFORD, D. L. **PAUP***. **Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)**. Version 4.0 b. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA. 1998.
- TAVARES, M. G. ; DIAS, L. A. S. ; BORGES, A. A. ; LOPES, D. M. ; BUSSE, A. H. P.; COSTA, R. G. ; SALOMÃO, T. M. F. ; CAMPOS, L. A. O. Genetic divergence between populations of the stingless bee urucu amarela (*Melipona rufiventris* group, Hymenoptera, Meliponini): Is there a new *Melipona* species in the Brazilian state of Minas Gerais? **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 667-675, 2007.
- TEMPLETON, A. R. Mechanism of speciation a population genetic approach. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 12, p. 23-48. 1981.
- TEMPLETON, A. R. The role of molecular genetics in speciation studies. **Molecular Ecology Evolution**, v. 15, p. 455-477. 1994.
- THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876-4882. 1997.
- TORRES, D. C. **Estudo filogenético de *Chamaecrista (breyne)* Moench (Leguminosae: Cassiinae) baseado em seqüências do espaçador intergênico trn^{ggu}-trn^{euuc} do DNA cloroplastial**. Monografia (Bacharel em Biologia). Departamento de Biologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 99 f. 2007.

- VAN NUES, R. W., VENEMA, J., RIENTJES, J. M. J., DIRKS-MULDER, A. & RAUE, H. A. Processing of eukaryotic pre-rRNA: the role of the transcribed spacers. **Biochem. Cell Biol.** v.73, p. 789-801. 1995.
- VELTHUIS, H. H. W. **Biologia das abelhas sem ferrão**. IB-USP e Univ. Utrecht. 33p. 1997.
- VELTHUIS, H. H. W.; LAURINO, M. C.; PEREBOOM, Z.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The conservative egg of the genus *Melipona* and its consequences for speciation *In: G. A. R. Melo & I. Alves-dos-Santos, Apoidea neotropica: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure*, p. 171 - 176. Editora UNESC, Criciúma. 2003.
- VENTURIERI, G. C. Criação de abelhas indígenas sem ferrão. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 36p. 2004.
- VIANA, G. V. R. **Técnicas para construção de árvores filogenéticas**. Tese de doutorado (Doutorado em Ciência da Computação). Departamento de Computação. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza 204f. 2007.
- VOGLER, A. P. & DESALLE, R. Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle *Cicindela dorsalis*. **Molecular biology evolution**, v. 11, n. 3, p. 393-405. 1994.
- VON DER SCHULENBURG, J. H. G.; HANCOCK, J. M.; PAGNAMENTA, A.; SLOGGETT, J. J.; MAJERUS, M. E. N.; HURST, G. D. D. Extreme length and length variation in the first ribosomal internal transcribed spacer of ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae), **Mol. Biol. Evol.**, v.18, n.4, p. 648-660. 2001.
- WALDSCHMIDT, A. M.; BARROS, E. G.; CAMPOS, L. A. O. Molecular marker distinguishes subspecies *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Journal of Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 23, n. 3, p. 609-611, 2000.

- WALDSCHMIDT, A. M.; MARCO-JÚNIOR, P.; BARROS, E. G.; CAMPOS, L. A. O. Genetic analysis of *Melipona quadrifasciata* LEP. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) with RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4B, p. 923-928. 2002.
- WEINLICH, R.; FRANCISCO, F.O. & ARIAS, M.C. Mitochondrial DNA restriction and genomic maps of seven species of *Melipona* (Apidae: Meliponini). **Apidologie**, v. 35, p. 365-370. 2004.
- XIA, X. & XIE, Z., DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**. v. 92, p. 371-373. 2001.
- YANG, Z. Phylogenetic analysis using parsimony and likelihood methods. **Journal of Molecular Evolution**, v. 42, p. 294-307. 1996.
- ZHANG, J. Performance of likelihood ratio tests of evolutionary hypotheses under inadequate substitution models. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 6, p. 868-875. 1999.

8. ANEXOS

ANEXO 1 – Interface do Instrument Control Manager (ICM) – Visualização da corrida das amostras seqüenciadas no LGM, onde cada letra indica um poço da placa aplicada.



ANEXO 2 – Sequências consenso da região ITS1 parcial das amostras obtidas no LGM.

>*Melipona fasciculata* Belém-PA

TTAATATAACCAACGAGAATCGCGGAACGTAAGGAAACGACGGGAAGTGA
 TTCGTCCGTTACTGAATCCTGTTCTACGCACGATCTCGGAACCATTGCG
 CCGTCGTGGCTGGCCCGCGGCTTTACCTTACCGAACGGCGACGTTCGA
 GGTAAGGACGAAACACGCACGTTTCGGATCGAATAGTTTCGATCGAGGACGC
 ACAGCCGGCCCCGAAGATGCCTTTTCGAGAAAGGCAGTTGGAGTTTCGAGAA
 AAAGGGGCTGCACAGCCGGTCCATCTCCGAACGAAGGAATTTTCGAGCAA
 AATTTTCGACGAGAAGCGACGAAACGGGCGCACATTCCACACATTGCAACA
 TTGGTTCCAGGTTACCCGGAGAGCCACGTATCGAACGTGGCTCCGTTTCGC
 TCGAACATCTTTCTGCAATCGACGAAGTACGCAGGCCCGATTGGTAGGCA
 GCTCTTCGAGAGCCAGTAGTTTCGATCCAAAGGGGCAGGTCCTCCGACATA
 TATATCCCCGT

>*Melipona flavolineata* Belém-PA

CAGACGACACAAGTGCCTGCTCGAGACGAAATCCGTCAACGAGGACGGAC
 GGGCGTAAAGTTCATTTAAAATAACCATCGAGAATCGCGGAACGTAAGGA
 AACGACGGGAATTTATTCATCCGTTACTGAATCCTGTTCTACGCACGACC
 TCGGAACCGCACGATTGCGCGATGGCTGGCCCATGCGCTCCCGCCGAGG
 GAGATGACGTTTCGAGTTAACAACGTTTCGGACGATAGTTTCGATCGAAGACT
 CACAGCCGGCCCCGATTGTTGTCTTTTCAGGATTGAAGGACAGTTTGAGTT
 CGAGCATAAAAAAAGAACGGGGCTGCGCAGCCGGTCCTCCTCCGAACGG
 ATTTTCAACCAAATCTCGGCGAGATGCGACGAAACGGGCGCACGTTCCA
 CTCGCCGCAAACATCCCGTGC

>*Melipona mondury* Rio Vermelho-MG

TGCGTGCTCGAGACGAAATCCGTCAACGAGGACGGACGGGCGTAAAGTTC
 ATTTAAAATAACCATCGAGAATCGCGGAACGTAAGGAAACGACGGGAATT
 TATTCATCCGTTACTGAATCCTGTTCTACGCACGACCTCGGAACCGCAC
 GTTTTCGCGATGGCTGGCCCATGCGCTCCCG

>*Melipona mondury* Pacoti-CE

GCTCGAGACGAAATCCGTCAACGAGGACGGACGGGCGTAAAGTTCATTTA
 AAATAACCATCGAGAATCGCGGAACGTAAGGAAACGACGGGAATTTATTC
 ATCCGTTACTGAATCCTGTTCTACGCACGACCTCGGAACCGCACGATTG
 CGCGATGGCTGGCCCATGCGCTCCCGCCGAGGGAGATGACGTTTCGAGTTA
 ACAACGTTTCGGACGATAGTTTCGATCGAAGACTCACAGCCGG

>*Melipona mondury* Guaramiranga-CE

TCAACGAGGACGGACGGGCGTAAAGTTCATTTAAAATAACCATCGAGAAT
 CGCGGAACGTAAGGAAACGACGGGAATTTATTCATCCGTTACTGAATCCT
 GTTCTACGCACGACCTCGGAACCGCACGATTGCGCGATGGCTGGCCCAT
 GCGCTCCCGCCGAGGGAGATGACGTTTCGAGT

>*Scaptotrigona bipunctata* Maranguape_CE
CCAAACGGGGAAACGAAGATTCGGGCGTCGCCGCATCGCACCGCGCAGAA
CGCGGTGGCGATTGACGACACAAAGTGTTGAGACGAAATCCGTCAACGA
CGGGCGGGCGGAAAGTTCATTTAAAATAACCATCGAGAATCGCGGAACGT
AAGGAAACGACGGGTAGTGAATCATCCGAAACTGAATCCTGTTCTACGCA
CGATCTCGCGAACCATTTGCGCCGTGGCTGACCCATAAGCTTTCGCCAG
AAAAAAAATAGAAAAAGTTTGAAGAAAGTTGATTATACGGTTCGAATC
TGGGCGAGAAGCTACGAAACGGGTGCACAATTCCACTCGGTGCAACATTG
GTTCCAGGTTACCCGGGCACACGTGTAAAAACGTGGCTTCGTTCGAACAT
CTTTCTGTTAAGAAAGATCAACGAAGGACACAGGCCCAATGGGTAGGCAG
CACTTACGCTTGCAGTTCGATCCCAAGGGGCAGGTCTTCGATATCCCGTT
GTTCTCGAGCGAGCGAACACACTCAGATCGCACGAAAACGAAGAAGGTGC
AACATCCAGGTCTCTC