

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS POPULAÇÕES DE
Melipona subnitida DUCKE, 1910 (APIDAE, MELIPONINI)**

FLAVIANE SANTOS DE SOUZA

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
MAIO - 2015**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS POPULAÇÕES DE
Melipona subnitida DUCKE, 1910 (APIDAE, MELIPONINI)**

FLAVIANE SANTOS DE SOUZA

Bióloga

Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

Coorientador: Prof. Dr. Eddy José Francisco de Oliveira

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA

MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

S729c Souza, Flaviane Santos de.
Caracterização molecular das populações de *Melipona subnitida* Ducke, 1910 (Apidae, Meliponini) / Flaviane Santos de Souza. _ Cruz das Almas, BA, 2015.
61f.; il.

Orientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa.
Coorientador: Carlos Alfredo Lopes de Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Abelha sem ferrão – Criação. 2.Abelha – Melipona. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Oliveira, Eddy José Francisco de. III.Título.

CDD: 638.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
FLAVIANE SANTOS DE SOUZA

Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Membro Presidente: Profa. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Instituição: UFRB

Ana Maria Waldschmidt
Membro Externo à Instituição: Profa. Dra. Ana Maria Waldschmidt
Instituição: UESB

Márcia de Fátima Ribeiro
Membro Externo à Instituição: Profa. Dra. Márcia de Fátima Ribeiro
Instituição: Embrapa Semiárido

Homologada em / / .

À minha família com muito amor.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação é o esforço conjunto de diversas pessoas que tenho muito a agradecer:

À orientadora Maria Angélica e aos meus Coorientadores Carlos Alfredo e Eddy, pelo exemplo de profissionalismo, amizade e oportunidades.

À UFRB (Universidade Federal do Recôncavo da Bahia), pelo apoio e suporte à pesquisa, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias.

Aos amigos e companheiros do NUATE (Núcleo de Apoio Técnico Específico) da UFRB / CCS (Centro de Ciências da Saúde), os nuatenses: Linsmar, Fabrine, Lucilene, Gabriela, Esteva, Claudiana, Rosangela, Alex, Roverval, Vagner, Valdemir, Nanci, Carliene, Alisson, Taiana, Mario, Camillo e Glauber.

Ao INSECTA pelo suporte laboratorial e novas perspectivas de pesquisa.

Aos meus amigos do LENT/UEFS pelo convívio e conselhos de protocolos.

À Cândida Beatriz pela amizade e abelhas coletadas.

Ao Macroprojeto da Rede Jandaíra da Embrapa Meio Norte, Coordenado pelo Dr. Bruno de Almeida Souza, pela oportunidade.

Aos criadores da abelha Jandaíra, que nos forneceram as informações, ajuda e contatos para realização deste estudo.

Ao IBAMA, pela permissão para visitar a ilha e coletar as informações, aos funcionários do ICMBio e ao DAI/DEFN, pela liberação da documentação necessária, auxílio e permissão de visita aos parques da ilha. Ao Diretor de Articulação e Infraestrutura do Distrito Estadual de Fernando de Noronha (ADEFN), pela permissão para visita científica à ilha. Ao Projeto Tamar pela disponibilidade e oportunidade de divulgar o nosso trabalho.

À minha valiosa família: meus pais, José e Antônia, irmãos, Flavio e Fábio, avó Margarida e tio Raimundo, pelo amor, carinho, dedicação e incentivo incondicional nos meus estudos.

A Helton, pelo amor incondicional e companheirismo.

A todos, que direta e indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho, meu muito obrigada.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	01
Capítulo 1	
DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Melipona subnitida</i> DUCKE, 1910 (APIDAE, MELIPONINI) NO LIMITE SUL DE DISTRIBUIÇÃO NATURAL: ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL.....	10
Capítulo 2	
DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE <i>Melipona subnitida</i> EM ILHA E CONTINENTE NO NORDESTE DO BRASIL: ANÁLISE DE DNA MITOCONDRIAL.....	31
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
ANEXOS.....	60

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS POPULAÇÕES DE *Melipona subnitida* DUCKE, 1910 (APIDAE, MELIPONINI)

Autora: Flaviane Santos de Souza.

Orientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

Coorientador: Prof. Dr. Eddy José Francisco de Oliveira

RESUMO: A abelha-sem-ferrão *Melipona subnitida* Ducke (1910), popularmente conhecida por Jandaíra, é endêmica da região Nordeste do Brasil e sua criação incrementa a renda dos agricultores familiares, como atividade de relevância ecológica e econômica, pela exploração dos seus produtos e pelos serviços de polinização nas comunidades vegetais da Caatinga. A fragmentação de ecossistemas pode levar ao isolamento das espécies de seus recursos essenciais, perda da variabilidade genética das populações, mudanças nas frequências haplotípicas e limitar o potencial adaptativo. O conhecimento sobre a diversidade desses meliponíneos por meio de ferramentas moleculares pode ser utilizado para entender os processos que moldam ou moldaram as populações, possibilitando delinear estratégias para o manejo, exploração racional e conservação. O trabalho teve por objetivo estudar as populações de *M. subnitida* residentes no limite sul da sua área de distribuição natural e avaliar as populações desta espécie isoladas há 31 anos na Ilha de Fernando de Noronha-PE, utilizando análise do DNA mitocondrial para o gene COI (citocromo oxidase I). Os resultados revelaram que no continente a divergência genética encontrada entre as populações é baixa se mantendo em torno de 17%, e abrigam cinco haplótipos mitocondriais, destes, quatro são haplótipos novos, embora variem por poucos passos mutacionais. Observou-se baixa diversidade haplotípica e nucleotídica nas populações da ilha de Fernando de Noronha em relação às populações continentais. Dos 14 haplótipos identificados no continente, apenas um (H4) é compartilhado pelas populações da ilha de Fernando de Noronha. Nas populações do continente foram identificados três novos haplótipos (H12, H13 e H14).

Palavras-chave: Meliponicultura; Abelha - Jandaíra; DNA mitocondrial; Variabilidade populacional.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF POPULATIONS *Melipona subnitida* DUCKE, 1910 (APIDAE, MELIPONINI)

Author: Flaviane Santos de Souza.

Adviser: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

Co-adviser: Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

Co-adviser: Prof. Dr. Eddy José Francisco de Oliveira

ABSTRACT: The stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (1910), mostly known as Jandaíra, is endemic to Northeastern Brazil. Keeping such species is an activity of ecological and economic importance for the pollination services that bees provide to plant communities of Caatinga and also for the exploitation of their products, both of which increase the income of farms. Habitat fragmentation can decrease the availability of essential resources and the genetic variability of populations, as well as can cause changes in haplotype frequencies and reduce the adaptive potential of the species. Knowledge about the diversity of stingless bees by means of molecular tools would contribute to the understanding of processes that shape or have shaped their populations, giving insights on strategies for bee management, rational exploitation and conservation. This work aimed to study the populations of *M. subnitida* from the southern limit of its natural distribution, and to assess populations of this species that have been isolated for 31 years in the Fernando de Noronha Archipelago (Pernambuco state), using analysis of mitochondrial DNA for the COI gene (cytochrome oxidase I). The results showed that the continent genetic divergence found among populations is low staying around 17%, and shelter five mitochondrial haplotypes, these four are new haplotypes, although they vary for a few mutation steps. There was a low haplotype and nucleotide diversity in the Fernando de Noronha populations in relation to the continental populations. Of the 14 haplotypes identified on the mainland, only one (H4) is shared by the Fernando

de Noronha population. Three new haplotypes (H12, H13 and H14) were identified in the continent populations.

Keyword: Meliponiculture; Jandaíra bee; Mitochondrial DNA; Population variability.

INTRODUÇÃO

As abelhas são um dos mais importantes e especializados grupos de insetos polinizadores (DANFORTH et al., 2006) de plantas nativas e cultivadas em diversos ecossistemas terrestres (BUCHMANN e NABHAN, 1996; KLEIN et al., 2007). A publicação do catálogo Moure (MOURE et al., 2007) reconhece a diversidade da fauna de abelhas para a região neotropical, que apresenta 5.000 espécies catalogadas e, Ascher e Pickering (2015) estimam em mais de 20.092 o número de espécies de abelhas no mundo.

As abelhas-sem-ferrão (Apidae, Meliponini) formam um grupo de abelhas altamente eussociais, nativas do Novo Mundo, com distribuição pantropical e exibem notável riqueza na região Neotropical com 33 gêneros exclusivos (FREITAS et al., 2009; MICHENER, 2000; CAMARGO e PEDRO, 2013). Os meliponíneos formam colônias perenes, com sobreposição de gerações, divisão de trabalho reprodutivo em um sistema de castas, cuidado cooperativo da prole e as fêmeas apresentam o ferrão e as estruturas associadas à ele extremamente reduzidas, o que as tornam incapazes de ferocar (KERR e LELLO, 1962) e, por isso são conhecidas como “abelhas-sem-ferrão”.

De acordo com Menezes (2006), uma das principais espécies de abelhas sem-ferrão-nativa da região Nordeste é *Melipona subnitida* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) (Figura 1), popularmente conhecida por Jandaíra, com distribuição nos Estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Paraíba, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte (CAMARGO e PEDRO, 2007). Seu manejo é bastante simples, sendo muito fácil a multiplicação de colônias, e um dos seus atributos é o mel de boa qualidade e alto valor agregado. Ressalta-se também sua importância na transferência do pólen, por ser uma espécie nativa, e responsável por

aproximadamente 50% da polinização da flora silvestre da Caatinga (FERRAZ et al., 2008; LOPES et al., 2007).



Figura 1. Abelha operária de *Melipona subnitida* Ducke (1910).

As abelhas nativas na região neotropical sofrem os impactos diretos e/ou indiretos da atividade humana, como a fragmentação e perda de habitat, a ação predatória de meleiros, as invasões biológicas e uso intensivo de herbicidas e pesticidas (FREITAS et al., 2009; KERR et al., 1999). Freitas et al. (2009) agrupam estas ameaças em três categorias principais: desmatamento, intensificação da agricultura e introdução/disseminação de espécies exóticas.

A relação de degradação e destruição de habitats parece ser o principal fator para o declínio da biodiversidade (FOLEY et al., 2005), sendo que o número de colônias de diferentes espécies de meliponíneos tem sido reduzido em diferentes regiões (BROWN e PAXTON, 2009).

Desta forma, a fragmentação de ecossistemas pode levar ao isolamento das espécies de seus recursos essenciais, como flores e locais de nidificação (KREMEN et al., 2002). Além disso, contribui para a perda da variabilidade genética das populações, mudanças nas frequências alélicas, isolamento genético e limita o potencial adaptativo das mesmas (ZAYED e PACKER, 2005; LANDE e BARROWCLOUGH, 1987), dentre outros. Assim, os estudos genéticos podem ser utilizados para entender processos que moldam ou moldaram as populações, e assim possibilite que estratégias possam ser traçadas para o manejo, conservação e exploração racional da espécie (COUCEIRO et al., 2011; ISHTIAQ et al., 2011; MOUTOU et al., 2011).

Até a metade da década de 1960, as análises populacionais eram baseadas em características fenotípicas, sendo que a maioria dos estudos utilizavam caracteres morfológicos. Em 1969 começaram a surgir os primeiros trabalhos com marcadores moleculares em abelhas, a exemplo do trabalho de Mestriner (1969), que verificou a variabilidade alélica em locos isoenzimáticos em amostras de *Apis mellifera ligustica*, espécie introduzida no Brasil, logo após a colonização pelos portugueses. Em 1990, Del Lama et al. verificaram alta similaridade em locos isoenzimáticos entre populações de abelhas africanizadas coletadas no Brasil, América Central e Europa, especificamente Itália (*Apis mellifera ligustica*) e Alemã (*Apis mellifera carnica*), com um fluxo gênico mais significativo entre as raças europeias nas amostras da América Central do que nas populações do Brasil.

Contudo, a utilização deste tipo de marcador em insetos sociais não é muito recomendado por apresentar baixa variabilidade nos locus isoenzimáticos (PAMILO e CROZIER, 1981). Em pouco tempo novos marcadores moleculares foram desenvolvidos, tais como o microssatélite, RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição), RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), DNAm (DNA mitocondrial), entre outros, os quais tornaram-se ferramenta importante no estudo da variabilidade genética em nível de DNA (LOWE et al., 2004).

Estudos sobre estrutura populacional, relações filogenéticas, aspectos evolutivos, diversidade genética intra e interespecífica e o entendimento de vários aspectos biológicos e evolutivos com abelhas são relatados em diversos trabalhos por meio dos marcadores microssatélites (ESTOUP et al., 1993), PCR+RFLP (BRITO e ARIAS, 2005); RFLP (MURRAY et al., 2007); RAPD (TAVARES et al., 2008); ISSR (NASCIMENTO et al., 2010); DNAm (ASSIS, 2010).

A mitocôndria é a única organela em células animais que possui seu próprio genoma e sua utilização como marcador molecular possui características vantajosas que o distingue de outros marcadores moleculares, tal como herança materna, haploidia e ausência de recombinação. Além disso, este genoma possui pequeno tamanho quando comparado ao DNA nuclear e tem simples estruturação, apresentando 37 genes e 17kpb (WILSON et al., 1985; MORITZ et al., 1987; AVISE, 1991; WELLS e STEVENS, 2008). Destes 37 genes, 22 são transcritos em RNA transportadores, 2 em RNA ribossômicos e 13 são transcritos e codificados em proteínas que integram o complexo enzimático responsável pelo transporte de

elétrons que ocorre no interior da mitocôndria. A função da organela envolve a oxidação do piruvato e dos ácidos graxos e a produção de energia celular na forma de moléculas de ATP (trifosfato de adenosina) (MORITZ et al., 1987; CROZIER e CROZIER, 1993) (Figura 2). A caracterização do DNAm_t envolvendo abelhas datam o ano de 1990 com linhagens de *Apis mellifera scutellata* (africana) e *A. mellifera ligustica* (italiana) (ARIAS et al., 1990).



Figura 2. Mapa do genoma mitocondrial de *Apis mellifera*. A região do gene Citocromo oxidase I (COI) está destacada em verde (Crozier e Crozier, 1993).

O DNAm_t tem sido utilizado na bioidentificação global para animais, por meio do sequenciamento do gene COI que correspondente à subunidade I da citocromo oxidase do DNAm_t, que contém aproximadamente 658 pb (pares de bases) (HEBERT et al., 2003). Essa tecnologia tem como objetivo a identificação rápida, exata e automática das espécies (HEBERT e GREGORY, 2005). Este sistema também tem o propósito ser um banco de dados com a contribuição e união de esforços científicos, através da globalização de informações (HEBERT et al., 2003). Contudo, apesar dos avanços em estudos mitocondriais, a caracterização desta

molécula envolvendo abelhas brasileiras é recente e está restrita a poucos gêneros (FRANCISCO et al., 2001; ARIAS et al., 2003).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estimar a variabilidade genética de populações de *Melipona subnitida* Ducke, 1910 (Apidae, Meliponini) localizadas nos Estados de Pernambuco, Alagoas e Bahia, por representar o limite sul de distribuição natural para esta espécie, utilizando sequências do gene COI do DNA mitocondrial. Analisar também a diversidade genética intra e interpopulacional de *M. subnitida* em populações de ilha e continente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIAS, M. C. et al., Improvements to the mitochondrial restriction maps for Italian and Africanized honey bees. **Revista Brasileira de Genética**, v.13, p.501-507, 1990.

ARIAS, M. C.; FRANCISCO, F. O.; SILVESTRE, D. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. In: MELO, G. A. R.; ALVES-DOS-SANTOS, I. (eds) Apoidea Neotropica: homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure. Criciúma: UNESC, 2003.

ASCHER, J. S.; PICKERING, J. Discover Life bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). Available from http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species (2015). (data de acesso: 1 maio, 2015).

ASSIS, A. F. Estudo populacional e molecular de *Nannatrigona testaceicornis* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) através do DNA mitocondrial. Dissertação, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto- Brasil, 2010. 77p.

AVISE, J.C. Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetics findings on mitochondrial DNA. **Annual Review of Genetics**, v. 25, p. 45-69, 1991.

BRITO, R. M.; ARIAS, M. C. Mitochondrial DNA characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by PCR+RFLP and sequencing.

Apidologie, v.36, n.3, p.431-438, 2005.

BROWN, M. J. F.; PAXTON, R. J. The conservation of bees: a global perspective.

Apidologie, v.40, n.3, p. 410-446, 2009.

BUCHMANN, S. L.; NABHAN, G. P. The Forgotten Pollinators. Washington-USA:

Island Press. 1996.

CAMARGO, J.M.F; PEDRO, S.R.M. *Meliponini* Lepeletier, 1836. In: J.S. Moure, D.

Urban & G.A.R. Melo (Eds.), Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. 2013. (data de acesso: 12 setembro, 2014).

COUCEIRO, L.; MANEIRO, I.; RUIZ, J. M.; BARREIRO, R. Multiscale genetic structure of an endangered seaweed *Ahnfeltiopsis pusilla* (Rhodophyta):

implications for its conservation. **Journal of Phycology**, v.47, p.259–268, 2011.

CROZIER, R. H.; CROZIER, Y. C. The mitochondrial genome of the honeybee

Apis mellifera: complete sequence and the genome organization. **Genetics**, v.133, n.1, p.97-117, 1993.

DANFORTH, B. N. et al. The history of early bee diversification based on five

genes plus morphology. **Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n.41, p.15118-23, 2006.

DEL LAMA, M.A.; LOBO, J. A.; SOARES, A. E. E.; DEL LAMA, S. N. Genetic

differentiation estimated by isosymy analyses of africanized honeybee population from Brazil and from Central America. **Apidologie**, n. 21, p. 271-280, 1990.

ESTOUP, A.; SOLIGNAC, M.; HARRY, H.; CORNUET, J. M. Characterization of

(GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insects species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. **Nucleic Acids Research**, v. 21, p.1427-1431, 1993.

FERRAZ, R. E.; LIMA, P. M.; PEREIRA, D. S.; FREITAS, C. C. O.; FEIJÓ, F. M. C. Fungi microbiot of *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae).

Neotropical Entomology, v.37, n.3, p.345-346, 2008.

FOLEY, J.A. et al. Global consequences of land use. **Science**, v.309, n. 5734, p.570-574, 2005.

FRANCISCO, F. O.; SILVESTRE, D.; ARIAS, M. C. Mitochondrial DNA characterization of five species of *Plebeia* (Apidae: Meliponini): RFLP and restriction maps. **Apidologie**, v.32, p.323-32, 2001.

FREITAS, B. M. et al. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie**, v.40, n.3, p.332-346, 2009.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, **Biological Sciences**, v.270, p.569-599, 2003.

HEBERT, P.D.N.; GREGORY, T.R. The promise of DNA Barcoding for taxonomy. **Systematic Biology**, v.54, n.5, p.852-59, 2005.

ISHTIAQ, F.; DUTTA, S.; YUMNAM, B.; JHALA, Y. V. Low genetic diversity in the endangered great Indian bustard (*Ardeotis nigriceps*) across India and implications for conservation. **Conservation Genetics**, 12, 857–863, 2011.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. M. The probable consequences of the destruction of brazilian stingless bees. In: Padoch, C., Ayres, J.M., Pinedo-Vasquez, M., Henderson, A. (eds). Várzea: diversity, development and conservation of Amazonia's whitewater floodplains. **New York Botanical Garden Press**, New York, 1999. 195-404p.

KERR, W.E.; LELLO, E. Sting glands in stingless bees – a vestigial character (hymenoptera, Apidae). **J. New York Entomol. Society**, v.70, p.190-214, 1962.

KLEIN, A. M. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society of London**, v.274, n.B, p.303-313, 2007.

KREMEN, C.; WILLIAMS, N. M.; THORP, R. W. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n.26, p.16812-16816, 2002.

LANDE, R.; BARROWCLOUGH, G. F. Effective population size, genetic variation and their use in population management. In viable population for Conservation (Soulé, M.E. ed.). **Cambridge University Press**, Cambridge, UK. 1987. 87-123p.

LOPES, M. T. R. et al. Atividade de voo de abelhas jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke, 1910) instaladas em dois modelos de colméia. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** (INFOTECA-E), v.72, p.20, 2007.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. Ecological Genetics: Design, Analysis and Application. Blackwells, Oxford. 2004. 326p.

MENEZES, P. Criação racional de abelha jandaíra. In: Bruening, H. (Ed.). Abelha Jandaíra. 3. Natal, Brasil, 2006. 121-135p.

MESTRINER, M.A. Biochemical Polymorphisms in Bees *Apis mellifera linguistica*. **Nature**, v. 223, p.188-189, 1969.

MICHENER, C. D. The Bees of the World. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 2000.

MORITZ, C.; DOWLING, T.E.; BROWN, W. M. Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.18, p.269-292, 1987.

MOURE, J.M.; URBAN, D., MELO, G.A.R. Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region, Curitiba, **Sociedade Brasileira de Entomologia**, 2007.

MOUTOU, K. A.; MAMURIS, Z.; FIRME, T.; KONTOU, M.; SARAFIDOU, T.; STOUMBOUDI, M. T. Patterns of variability at the major histocompatibility class I and class II loci in populations of the endangered cyprinid *Ladigesocypris ghigii*. **Conservation Genetics**, v.12, p.1159–1171, 2011.

MURRAY, T.E. et al. Cryptic species diversity in a widespread *bumble bee* complex revealed using mitochondrial DNA RFLPs. **Conservation Genetics**, v.9, n.3, p.653-666, 2007.

NASCIMENTO, M. A.; BATALHA-FILHO, H.; WALDSCHMIDT, A. M.; TAVARES, M. G.; CAMPOS, L. A. O.; SALOMÃO, T. M. F. Variation and genetic structure of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) populations based on ISSR pattern. **Genetics and Molecular Biology** (Impresso), v.33, n.2, p.394-397, 2010.

PAMILO, P. E.; CROZIER, R. H. Genetic variation in male haploids under deterministic selection. **Genetics**. n.98, p.199-214, 1981.

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 stigless 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, n.3, p.667-675, 2008.

WELLS, J. D.; STEVENS, J. R. Application of DNA-based methods in forensic entomology. **Annual Review of Entomology**, v.53, p.103-120, 1987.

WILSON, A. C. et al. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.26, p.375-400, 1985.

ZAYED, A.; PACKER, L. Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, n.30, p.10742-6, 2005.

CAPÍTULO 1

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Melipona subnitida* DUCKE, 1910 (APIDAE, MELIPONINI) NO LIMITE SUL DE DISTRIBUIÇÃO NATURAL: ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL ¹

¹ Artigo a ser ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Sociobiology, em versão na língua inglesa.

**Diversidade genética de *Melipona subnitida* Ducke, 1910 (Apidae, Meliponini)
no limite sul de distribuição natural: análise do DNA mitocondrial**

Resumo: *Melipona subnitida* Ducke (1910) é uma espécie de abelha-sem-ferrão endêmica da Caatinga nordestina, um ecossistema rico em recursos naturais e também um dos mais ameaçados do planeta, com perda de 61,98% do seu território no semiárido. Apesar da grande disseminação desta abelha na região nordeste, os estudos genéticos populacionais com esta abelha ainda são escassos. O objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade genética de 68 colônias de *M. subnitida*, distribuídas em nove localidades do limite sul da sua distribuição natural no Brasil (nos Estados de Bahia, Alagoas e Pernambuco) por meio do sequenciamento do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI). As análises moleculares identificaram cinco sítios polimórficos, correspondendo a cinco haplótipos (H1 a H5). O H1 foi o haplótipo mais frequente, com presença em todas as nove localidades e também apresentou distribuição em diferentes variações de altitude, com mín. 160m a máx. 887m. Os haplótipos H2, H3, H4 e H 5 foram considerados haplótipos novos. Sendo H2, H4 e H5 exclusivos de Água Branca (Alagoas), Exu (Pernambuco) e Riacho das Almas (Pernambuco), respectivamente. A localidade de Exu (PE) apresentou maior diversidade haplotípica ($Hd=0,667$). Na rede de haplótipos, H1 está posicionado no centro, como haplótipo ancestrais e melhor distribuído geograficamente. Os demais haplótipos foram distantes deste por um ou dois passos de mutação. A análise de variância molecular (AMOVA) revelou que 82,44% da variabilidade genética ocorre dentro das populações (intrapopulacional), enquanto que 17,56% corresponde a variações entre as populações (interpopulacional). A caracterização genética destas populações tem papel fundamental na conservação desta espécie e, outros estudos genéticos necessitam ser realizados considerando outros genes, para que possam ser definidas estratégias e áreas de conservação biológica.

Palavra-chave: Caatinga, Variabilidade genética, COI, Jandaíra.

Genetic diversity of *Melipona subnitida* Ducke, 1910 (Apidae, Meliponini) in the south boundary of its natural distribution: analysis of mitochondrial DNA

Abstract: *Melipona subnitida* Ducke (1910) is a stingless bee species endemic to the northeastern Caatinga (Brazil), a biome rich in natural resources although dangerously threatened due deforestation. Despite the wide distribution of this bee in the northeastern Brazil, studies on its population genetics are still scarce. Here we analyzed the genetic diversity of 68 colonies of *M. subnitida* distributed in nine locations of the southern limits of its natural distribution (the states of Pernambuco, Alagoas and Bahia) by sequencing the mitochondrial gene cytochrome oxidase I (COI). Molecular analysis identified five polymorphic sites corresponding to five haplotypes (H1 to H5). H1 was the commonest haplotype, found in all nine locations despite their ample altitude range (160-887 m above the sea level). H2, H3, H4 and H5 were considered new haplotypes, with H2, H4 and H5 exclusive to the locations Água Branca (Alagoas), Exu and Riacho das Almas (Pernambuco), respectively. Exu showed the highest haplotype diversity ($H_d=0.667$). In the haplotype network, H1 is positioned in the center as an ancestral haplotype and with the best geographical distribution. The other haplotypes are one or two mutation steps from H1. The analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that 82.44% of the genetic variation occurs within populations (intra-population), while 17.56% corresponded to variations among populations (inter-population). The genetic characterization of these populations plays a key role in the conservation of *M. subnitida*. Further research related to population genetics should focus on other genes, which will contribute to the design of strategies and areas of biological conservation.

Keywords: Caatinga, Genetic variability, COI, Jandaíra.

INTRODUÇÃO

A jandaíra (*Melipona subnitida*) é um meliponíneo com distribuição nos Estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Paraíba, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte (Camargo & Pedro, 2013). É uma abelha nativa do bioma da Caatinga nordestina e uma das principais espécies criadas na região, devido ao fácil manejo e a qualidade do mel (Cámara et al., 2004).

Ressalta-se também sua importância como polinizador por ser uma espécie nativa e responsável por aproximadamente 50% da polinização da flora silvestre da Caatinga (Ferraz et al., 2008; Lopes et al., 2007), contribuindo com a perpetuação de milhares de plantas nativas e exóticas cultivadas (Kerr et al., 1996).

Rica em recursos naturais, a Caatinga é um dos ecossistemas mais ameaçados do planeta, com perda de 61,98% do seu território no semiárido (Francisco et al. 2013), principalmente devido ao desmatamento e exploração madeireira, levando à destruição dos locais de nidificação de abelhas, o que reduz o tamanho da população, a distribuição geográfica e, conseqüentemente, acarretando a perda de variabilidade genética e ameaça de extinção da jandaíra, bem como de muitas espécies de abelhas indígenas sem ferrão (Carvalho-Zilse & Kerr, 2006).

Estudos que visam ampliar o conhecimento sobre a abelha *M. subnitida* vêm sendo abordados em diferentes vertentes: atividade de forrageamento de pólen (Maia-Silva, 2014); análises dos componentes do mel, (Silva et al., 2013); caracterização morfométrica (Souza et al., 2014; Bonatti et al., 2014; Lima et al., 2014), utilização de ferramentas moleculares (DNAmt) nos estudos populacionais (Bonatti et al., 2014) e a descrição dos primeiros marcadores microssatélites para esta espécie, com caracterização de 23 loci (Souza et al., 2015).

Apesar das recentes publicações supracitadas e da grande disseminação desta abelha na região nordeste, ainda não há estudos genéticos no seu limite sul de ocorrência natural (nos estados da Bahia, Alagoas e Pernambuco) utilizando ferramentas moleculares.

O uso de ferramentas moleculares cresceu durante as últimas décadas (Caterino et al., 2000) e podem ser empregados em vários tipos de estudos, tais como, sistemática e conservação (Hillis et al., 1996), filogenéticos e filogeográficos, estrutura populacional e diversidade genética, (Brito & Arias 2005; Murray et al.

2007; Nascimento et al., 2010), possibilitando delinear futuras estratégias de conservação.

A escolha do marcador a ser utilizado em estudos genéticos de biologia de populações depende da classe a que o mesmo pertence. O uso de marcadores dominantes, como o RAPD requer um número grande de indivíduos e mais locos quando comparado ao marcador codominante como RFLP, microssatélite (Lynch & Milligan, 1994; Baverstock & Moritz, 1996) e DNA mitocondrial (Haavie et al., 2000). Além disso, proporcionar dados mais robustos e possibilita estudos que envolvam pouca disponibilidade de material biológico (Sunnucks, 2000).

O fato da molécula de DNAm_t apresentar uma alta taxa de evolução, ser circular, pequena e de estrutura gênica simples, apresentar herança materna, ausência de recombinação e conteúdo gênico bastante conservado, faz com que ela seja muito utilizada em estudos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas e o entendimento de vários aspectos biológicos e evolutivos (Wilson et al., 1985; Avise et al., 1987; Moritz et al., 1987; Harrison, 1989). A caracterização do DNAm_t envolvendo abelhas-brasileiras-sem-ferrão data do ano de 2001 e envolveu cinco espécies do gênero *Plebeia* e um elevado nível de variabilidade interespecífica (Francisco et al., 2001).

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi estudar a variabilidade genética intra e interpopulacional de populações de *Melipona subnitida* Ducke, 1910 (Apidae, Meliponini), localizadas no limite sul de sua distribuição natural, nos Estados de Pernambuco, Alagoas e Bahia, por meio do sequenciamento do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI).

MATERIAL E MÉTODOS

As análises do genoma mitocondrial de *M. subnitida* foram realizadas em abelhas provenientes de 68 colônias distribuídas em nove localidades, com diferentes distâncias geográficas dentro dos Estados de Bahia, Alagoas e Pernambuco (Figura 1 e Tabela 1), representando seu limite sul de distribuição natural.

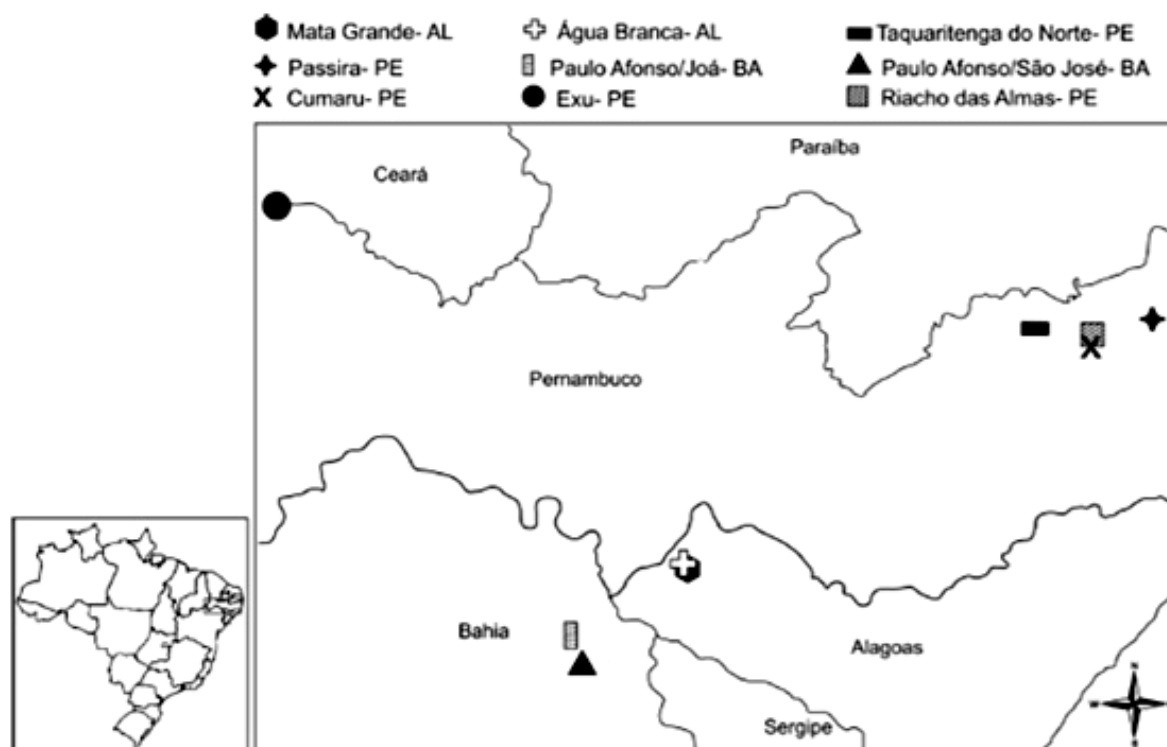


Figura 1. Origem e localização geográfica das amostras de *Melipona subnitida* (Lima et al., 2014).

Tabela 1. Localização geográfica das amostras de *Melipona subnitida* residente no limite Sul da área de sua distribuição natural.

Estado	Localidade	Nº de colônia/ indivíduo	Nº de Meliponário	Coordenadas Geográficas	Altitude (m)	Clima / relevo
PE	Cumarú	7	2	8°1'58,5"/35°45'3,11"	348	Semiárido/ Maciços
	Exu	3	2	7°20'22,6"/39°54'58,5"	887	Semiárido/ Colinas baixas
	Passira	5	1	7°55'37,8"/35°30'14,0"	160	Semiárido/ Maciços
	Riacho das Almas	6	2	8°3'40,7"/35°49'9,62"	413	Semiárido/ Montanhas alta
	Taquaritinga do Norte	11	2	7°56'14,1"/36°7'05,7"	785	Tropical / Maciços
AL	Água Branca	11	4	9°10'24,7"/37°51'41,9"	380	Semiárido/ Maciços
	Mata Grande	12	1	9°11'09,3"/37°50'09,8"	424	Semiárido/ Sequeiro
BA	Joá	5	3	9°31'08,8"/38°25'36,7"	243	Semiárido/ Montanhas Baixas
	São José	8	1	9°39'04,8"/38°22'43,2"	243	Semiárido/ Colinas Baixas

As 68 operárias foram coletadas por meio de sugadores de insetos, diretamente das entradas dos ninhos naturais, caixas racionais ou cortiços, colocadas em tubos Falcon contendo álcool absoluto e mantidas em isopor com gelo. Todo o material coletado foi armazenado em freezer (-20° C) no laboratório do Núcleo de Estudos dos Insetos - INSECTA do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em Cruz das Almas - BA.

O DNA total foi extraído a partir do tecido da cabeça de uma operária por colônia, utilizando o Kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

A quantificação e integridade do DNA total extraído foram verificadas através do espectrofotômetro BioPhotometer D30 (Eppendorf) e diluídas em água ultra-pura (Mili-Q) para concentração final de 20ng/μl.

A amplificação da região COI do DNA mitocondrial (mtDNA) utilizou os *primers* mtD6 e mtD9, considerados universais (Simon et al., 1994). As reações de PCR foram realizadas com um volume total de 10μL contendo 5μL de Top Taq Master Mix (Qiagen); 0,2μL de cada primer a 20mM; 4,1μL de água ultra-pura e 0,5μL de DNA total. A amplificação foi conduzida em termociclador (Veriti Thermal Cycler ® – Applied Biosystems) usando o seguinte programa: um ciclo de desnaturação a 94°C com duração de 5 minutos, seguido de 35 ciclos de: desnaturação a 94°C por 1min, anelamento por 1min a 42°C e alongação por 3 min a 64°C e um ciclo de extensão final a 64°C por 10 min.

Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com Gel-Red (Biotium), quando possível em substituição ao método de brometo de etídio (25μg/μL). Na corrida de eletroforese foi acrescentado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb) Ladder (GE Healthcare®). Os fragmentos foram visualizados em transluminador e fotografados.

Os produtos da amplificação do gene COI foram purificados com o protocolo de precipitação de DNA com PEG (Polietileno Glicol 8000) a 20%. As reações de sequenciamento foram realizadas pelo método direto, em ambas as direções – *forward* e *reverse* – contendo: 50ng de produto de PCR purificado, 1,75μL de tampão de sequenciamento (Save Money 5X), 0,5μL de BigDye© v3.1 (Applied Biosystems®), 0,25μL do oligonucleotídeo (pmol/μL) iniciador e quantidade de

água ultra pura que complete 10 μ L. Ao término da reação de sequenciamento, que consistiu de 1 ciclo de 96°C por 3 min, 35 ciclos compostos por uma etapa a 96°C por 15 s, uma etapa a 42°C por 10 s e uma etapa de polimerização a 60°C por 4 min, por último uma etapa de 60° por 5 min. As amostras foram mantidas a 4°C até o momento do uso.

Em seguida, 40 μ L de isopropanol 80% foram adicionados a cada amostra. Após 15 min a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm, em centrífuga de tubo refrigerada por 25 min a 4°C. Após precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e as amostras lavadas, duas vezes, com 150 μ L de etanol 70% seguido de centrifugação a 4.000 rpm por 15 min a 4 °C.

As amostras foram secas a temperatura ambiente ou em termociclador (50 °C por 15 min), ressuspendidas em 10 μ L de formamida, desnaturadas por 5 min a 95°C e submetidas ao sequenciamento em um sequenciador automático 3130XL DNA Analyzer, conforme metodologia sugerida pelo fabricante do equipamento (Applied Biosystems®).

As sequências de DNA “forward” (mtD6) e “reverse” (mtD9) obtidas a partir do sequenciamento foram visualizadas e editadas no programa BioEdit (Hall 2005), com conferência manual das mesmas, e criada uma única sequência consenso para cada amostra. O alinhamento múltiplo das sequências foi gerado no programa Mega 6.0 (Edgar 2004).

A análise descritiva das sequências de DNA das populações de *M. subnitida* foi realizada utilizando-se o programa DnaSP v.5.1 (Librado & Rozas, 2009), que estimou o número de haplótipos mitocondriais (h), os índices de diversidade haplotípica (Hd), os valores de diversidade nucleotídica (π), o número de sítios polimórficos (S) e o número médio de diferenças nucleotídicas (k).

A análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) foi implementada pelo programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) para verificar as diferenças genéticas entre as populações, índice de fixação F_{st} entre pares de populações. A diversidade intrapopulacional e a divergência interpopulacional foram calculadas utilizando o modelo Kimura 2 parâmetros (K2P) (Kimura, 1980) e diferença par a par. Inferências com relação à ocorrência de eventos de expansão populacional foram baseadas nas estimativas de neutralidade utilizando os testes D de Tajima (1989) e F_s de Fu (1997).

Para estimar as relações genealógicas entre os haplótipos mitocondriais, foi construída uma rede de haplótipos utilizando o programa NETWORK v. 4.613 (www.fluxus-engineering.com) gerado a partir do método median-joining (Bandelt et al., 1999). O tamanho de cada agrupamento refere-se à frequência haplotípica e o preenchimento, as diferentes localidades.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as 68 amostras de *Melipona subnitida* foram amplificadas com sucesso e obtido um excelente perfil de amplificação para a região gênica COI, do DNA mitocondrial. Após o alinhamento foi obtida uma matriz de 500pb, com frequência nucleotídica média de Timina =32,4%, Adenina =44,0%, Citosina =10,0% e Guanina =13,6%. O que evidencia grande quantidade das bases A e T (76,4%). Foram detectados 495 sítios conservados e cinco sítios variáveis, com dois sítios únicos (singleton). Dos sítios variáveis foram registradas sete substituições de bases, sendo seis transições e uma transversão.

O conteúdo A+T permaneceu próximo da porcentagem média de 77,7% relatado por Brito et al. (2013) em *Partamona mulata*, que também observou três sítios variáveis, com duas transições e uma transversão, e por Bonatti et al. (2014), com conteúdo de A+T= 78,1% em seis populações de *Melipona subnitida*, nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte.

O número de indivíduos (N), sítios polimórficos (S), número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (H_d), diversidade nucleotídica (π) e número médio de diferenças nucleotídicas (K) estão retratados na Tabela 2. A diversidade haplotípica (H_d) variou de 0,000, onde apenas um haplótipo (H1) foi observado (Cumarú e Passira) a 0,667 com dois haplótipos (Exu), com valor médio interpopulacional ($H_d=0,352$ e $\pi=0,0010$), o qual é considerada baixo quando relacionado ao trabalho de Bonatti et al. (2014) ($H_d=0,79$ e $\pi=0,005443$) em seis populações de *Melipona subnitida*. Por outro lado, índices semelhantes foram relatados por Moresco (2009), que estudou cinco populações de *Melipona marginata* ($H_d = 0,33$ e $\pi= 0,001$) e por Assis (2010) para $H_d=0,264$, exceto em relação a diversidade nucleotídica que apresentou valor superior ($\pi= 0,00386$) em 10 populações de *Nannotrigona testaceicornis*.

Tabela 2. Diversidade genética do gene COI do DNA mitocondrial das amostras de *Melipona subnitida* no limite sul da sua distribuição natural no Brasil. Número de indivíduos/colônias (N), número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Hd); diversidade nucleotídica (π) e número médio de diferenças (K).

Estados	Localidade	N	S	H	Hd	π	K
Pernambuco	Cumaru	7	0	1 (H1)	0,000	0,0000	0,000
	Exu	3	2	2 (H1, H4)	0,667	0,0027	1,333
	Passira	5	0	1 (H1)	0,000	0,0000	0,000
	Riacho das Almas	6	3	2 (H1, H5)	0,333	0,0020	1,000
	Taquaritinga do Norte	11	1	2 (H1, H3)	0,327	0,0007	0,327
Alagoas	Água Branca	11	2	3 (H1, H2, H3)	0,345	0,0007	0,364
	Mata Grande	12	1	2 (H1, H3)	0,303	0,0006	0,303
Bahia	Joá	5	1	2 (H1, H3)	0,600	0,0012	0,600
	São José	8	1	2 (H1, H3)	0,536	0,0011	0,536
Todos		68	5	5 (H1 a H5)	0,352	0,0010	0,485

O valor de π variou de 0,0000 a 0,0027, com média interpopulacional de 0,0010, o que denota pouca variação genética entre as populações. Esta baixa variabilidade nucleotídica encontrada em todas as populações possivelmente pode ser explicada pelo pequeno número de indivíduos fundadores quando da expansão da área de ocorrência, pelo isolamento populacional ou em consequência da fragmentação do habitat.

Dos cinco haplótipos registrados nas populações de Bahia, Alagoas e Pernambuco que representam o limite sul da sua distribuição natural no Brasil, verifica-se que eles se diferenciam por apenas uma ou duas substituições nas bases nitrogenadas (Tabela 3), do tipo transição de guanina para adenina no H2, posição 127; uma transversão de guanina para timina, no H3 na posição 07, duas transições de guanina para adenina no H4, posição 145 e 368; e outra transição de adenina para guanina no H5, posição 472. Essas substituições de bases nitrogenadas possibilitaram a existência de 04 novos haplótipos, dado que o H1 mostrou-se posicionado no centro de todos os demais, conforme a rede de haplótipos (Figura 2).

Tabela 3. Haplótipos de *Melipona subnitida* e seus respectivos sítios variáveis. Números verticais correspondem à posição em pb dos sítios polimórficos (singleton) dentro do fragmento do gene COI. Os pontos são sítios conservados após alinhamento.

Haplótipo	Posição				
	07	127	145	368	472
H1	G	G	G	G	A
H2	.	A	.	.	.
H3	T
H4	.	.	A	A	.
H5	.	.	A	A	G

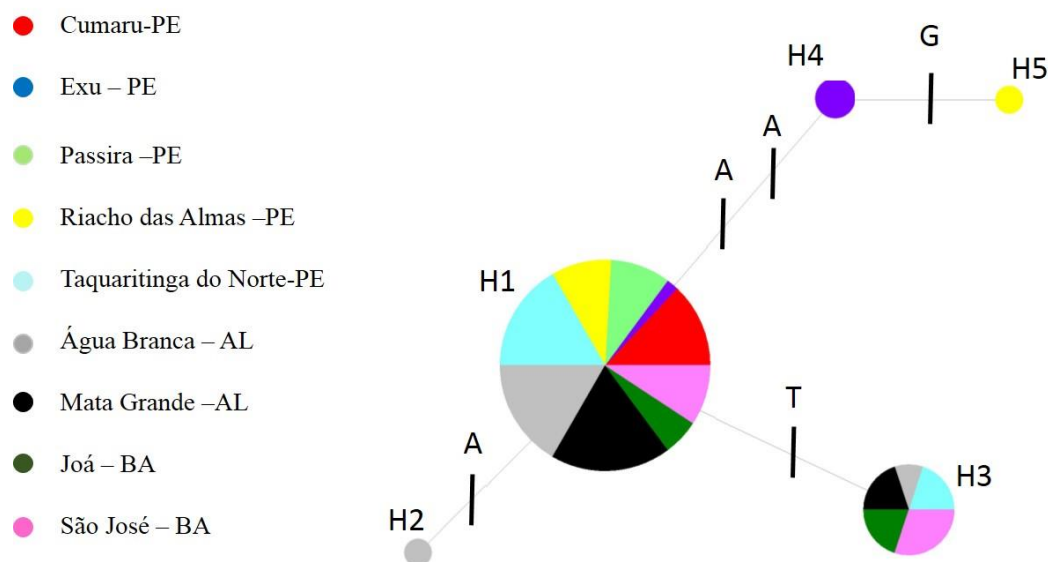


Figura 2. Rede de inter-relações haplotípicas do gene COI de *Melipona subnitida* no limite sul da sua distribuição natural no Brasil.

Os haplótipos H2 e H3 apresentam-se distantes do H1 por um único passo mutacional e o H4, com dois passos. O H5 variou do H4 também por apenas um passo de mutação (Figura 2). Dessa forma, possivelmente o H1 seja o ancestral, pois segundo Cunha e Solé-Cava (2012) o haplótipo ancestral é o mais comum da população e, segundo Bonatti et al. (2014) é esperado que haplótipos ancestrais sejam melhores distribuídos geograficamente em relação aos haplótipos mais

recentes devido ao maior tempo de dispersão, o que pode ser inferido ao H1, que possui distribuição em todas as localidades.

Quanto à frequência haplotípica verifica-se que o H1 é o mais frequente, ocorrendo em todas as nove populações, com distribuição ao longo de um gradiente de altitude, que variou de 160 m a 887m seguido do H3, presente em cinco populações. Os haplótipos H2, H4 e H5 foram exclusivos e amostrados apenas nas populações de Água Branca, Exu e Riacho das Almas, respectivamente. Cumaru e Passira não apresentaram diversidade de haplótipos, sendo encontrado apenas o H1, em contraposição à Água Branca, com três haplótipos, H1, H2 e H3 (Tabela 4, Figura 2).

Tabela 4. Frequência (%) dos haplótipos de *Melipona subnitida* nas populações do limite sul da sua distribuição natural no Brasil.

Localidade	Haplótipo				
	H1	H2	H3	H4	H5
Cumaru-PE	100				
Exu-PE	33,3			66,7	
Passira-PE	100				
Riacho das Almas-PE	83,3				16,7
Taquaritinga do Norte-PE	81,8		18,2		
Água Branca-AL	81,8	9,09	9,09		
Mata Grande-AL	83,3		16,7		
Joá-BA	60,0		40,0		
São José-BA	62,5		37,5		

A distribuição do H1 ocorreu ao longo de um gradiente de altitude, que variou de 160 m a 887m. Também foi observado que o H4 ocorre exclusivamente na região de maior altitude, 887m, localidade de Exu-PE. Possivelmente esta frequência de distribuição dos haplótipos deve-se aos diferentes níveis de degradação das localidades onde foram coletadas as populações amostradas, dado que da área total do bioma Caatinga apenas resta 38% da área original (Francisco et al., 2013).

A análise de variância molecular (AMOVA) revelou que a variabilidade genética interpopulacional é representada por 17,56%, enquanto que as maiores diferenças correspondem a variações dentro das populações (intrapopulacional), com 82,44% (Tabela 5). Possivelmente isto deve-se ao próprio comportamento de

fundação de colônias destas abelhas, as quais segundo Michener (2007) as novas colônias são fundadas a distâncias curtas da colônia mãe, e apresentam alta dependência desta em relação a materiais e alimentos, o que propicia uma curta dispersão dos enxames (Cronin et al., 2013). Tal conduta tem influência direta na composição genética, uma vez que há menor possibilidade de fluxo gênico entre colônias de locais distantes, o que diminui o aporte genético (Nogueira-Neto, 1997).

Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) para sequências do gene COI de *Melipona subnitida*.

Fonte da variação	gl	Variância dos componentes	% da variação	P-valor
Interpopulacional	8	0,04344 a	17,56	<0,001
Intrapopulacional	59	0,20389 b	82,44	<0,001
Total	67	0,24733		

Número de permutações = 10.100; $\alpha = 0,05$. a; b: médias que diferem entre si.

O F_{st} calculado entre os pares de populações de *Melipona subnitida* foram altos e significativos ($F_{st} = 0,176$; $P = 0,00327 < 0,05$). Os dados mostram estruturação genética populacional apenas para as populações de Exu (PE) em relação Taquaritinga do Norte (PE), Água Branca (AL), Mata Grande (AL) e São José (BA). O nível de diferenciação mais baixo foi encontrado entre Exu e São José (0,54912) e o mais alto, entre Exu e Mata Grande (0,64046) (Tabela 6). Possivelmente isto deve-se a presença do haplótipo exclusivo H4, que representa 66% de predominância na população de Exu. Os valores negativos e não significativos obtidos nas análises das amostras indicam a ausência de estruturação populacional.

Tabela 6. Estatística e significância do *Fst* por Kimura 2P (metade inferior da matriz) e diferença par a par (metade superior da matriz) entre as populações de *Melipona subnitida*. Localidades: CU: Cumaru; EX: Exu; PS: Passira; RA: Riacho das Almas; TN: Taquaritinga do Norte; AB: Água Branca; MG: Mata Grande; JO: Joá; SJ: São José.

	CU	EX	PS	RA	TN	ÁB	MG	JO	SJ
CU	0	0,70833	0	0,02778	0,04282	-0,04620	0,02778	0,33121	0,26121
EX	0,70833	0	0,63415	0,18824	0,62273*	0,60186*	0,64000*	0,49378	0,54850*
PS	0	0,63415	0	-0,03448	-0,00406	-0,08911	-0,01695	0,25000	0,20000
RA	0,02778	0,18738	-0,03448	0	0,07600	0,04275	0,08116	0,10121	0,13890
TN	0,04282	0,62321*	-0,00406	0,07638	0	-0,04500	-0,09456	-0,02878	-0,01793
ÁB	-0,04628	0,60240*	-0,08919	0,04333	-0,04494	0	-0,04704	0,08700	0,08827
MG	0,02778	0,64046*	-0,01695	0,08156	-0,09456	-0,04699	0	0,00077	0,00609
JO	0,33121	0,49437	0,25000	0,10125	-0,02878	0,08707	0,00077	0	-0,19244
SJ	0,26121	0,54912*	0,20000	0,13908	-0,01793	0,08835	0,00609	-0,19244	0

*Significância $\alpha = 0,05$ de probabilidade.

Foram identificados 165 códons, com uma proteína codificante (éxons) e ausência de íntrons ou regiões flanqueadoras. A diversidade nucleotídica repercutiu na sequência de aminoácidos com apenas uma mutação silenciosa (sinônima) e quatro não-sinônimas (Tabela 7). Resultados semelhantes foram relatados por Brito et al. (2013), com 4 mutações não-sinônimas e 1 mutações silenciosas em *Partomona mulata*, e Bonatti et al. (2014) relatam ausência de modificações na sequência proteica do gene COI em populações de *Melipona subnitida*. Tais mutações no gene COI, gene codificante de proteínas altamente conservadas e associadas ao processo de bioenergia celular, repercutem com rápida evolução em sítios de nucleotídeos (Simon et al., 1994).

Tabela 7. Diversidade nucleotídica para sítios sinônimos e não-sinônimos de códons de aminoácido do gene COI de *Melipona subnitida*.

Diversidade Nucleotídica	Nº sítios	Pi (Jukes & Cantor)	Θ	Mutações
Sítios sinônimos	99,11	0,00087 (0,00087)	0,00211	1
Sítios não-sinônimos	395,89	0,00101 (0,00101)	0,00211	4

Para todas as sequências de DNA dos indivíduos das populações de *Melipona subnitida* analisadas os testes de neutralidade, D de Tajima, apresentaram valor médio -0,06293, resultado que se enquadra no modelo de neutralidade. O teste F_s de F_u apresentou valor de 0,39677, não sendo estatisticamente significativo ($\alpha > 0,05$ e $\alpha > 0,01$), o que indica pouco reflexo de eventos demográficos de expansão populacional. Segundo Fu (1997), valores positivos não podem ser interpretados como de expansão demográfica recente. De acordo com Ramos-Onsins e Rozas (2002) o teste mais poderoso para demonstrar a recente expansão populacional é o F_s de F_u .

É importante ressaltar que o F_{st} , como indicador da magnitude da subdivisão populacional, capta somente o efeito da atuação da deriva genética na determinação da estrutura genética populacional. As estatísticas F e suas derivações fornecem estimativas dos processos microevolutivos atuais, mas não são capazes de inferir sobre o passado demográfico de uma população (Templeton, 1998).

A evolução, segundo o teste D de Tajima, ocorreu de forma pouco variada, aproximando-se da neutralidade (igual a zero), demonstrando pouca pressão seletiva existente no grupo amostrado. Logo, é possível observar que houve uma evolução muito semelhante, por conta da baixa diversidade nas sequências deste índice.

A combinação dos baixos valores para diversidade haplotípica e nucleotídica, associado ao pequeno número de haplótipos relacionados nas populações, bem como os valores encontrados para o teste de Tajima e F_s no presente trabalho, levam a supor que não houve recente evento demográfico nas populações, sendo indicativo de baixa frequência de mutações, de acordo com o esperado sob o modelo de neutralidade.

CONCLUSÃO

A divergência genética encontrada entre as populações é baixa se mantendo em torno de 17%. As áreas amostradas abrigam cinco haplótipos mitocondriais para o gene COI, destes, quatro são haplótipos novos, embora variem por poucos passos mutacionais.

REFERÊNCIAS

- Assis, A.F. (2010). Estudo populacional e molecular de *Nannatrigona testaceicornis* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) através do DNA mitocondrial. Mestrado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto- Brasil, 77 p.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. & Sainders, N.C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489-522.
- Bandelt H.J., Forster, P. & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 16: 37-48.
- Baverstock, P.R. & Moritz, C. (1996). Project design. In D.M. Hillis, C. Moritz & B.K. Mable (Eds.), *Molecular Systematics*. (pp. 17-27). Sinauer Associates, Massachusetts.
- Bonatti, V., Simões, Z.L.P., Franco, F.F. & Francoy, T.M. (2014). Evidence of at least two evolutionary lineages in *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) suggested by mtDNA variability and geometric morphometrics of forewings. *Naturwissenschaften*, 101:17-24.
- Brito, R.M., Francisco, F.O., Françoso, E., Santiago, L.R. & Arias, M.C. (2013). Very low mitochondrial variability in a stingless bee endemic to cerrado. *Genetics and Molecular Biology*, 36 (1): 124-128.
- Brito, R.M. & Arias, M.C. (2005). Mitochondrial DNA characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by PCR+RFLP and sequencing. *Apidologie*, 36 (3): 431-438.
- Cámara, J.Q., Sousa, A.H., Vasconcelos, W.E., Freitas, R.S., Maia, P.H.S., Almeida, J.C. & Maracajá, P.B. (2004). Estudos de meliponíneos, com ênfase a *Melipona subnitida* D. no município de Jandaíra, RN. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 4 (1).

Camargo, J.M.F. & Pedro, S.R.M. (2013). *Meliponini* Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. (data de acesso: 1 maio, 2015).

Carvalho-Zilse, GA & Kerr, W.E. (2006). Utilização de marcadores microssatélites para estudos populacionais em *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). *Magistra*, 18: 213-220.

Caterino, M.S., Cho, S. & Sperling, F. (2000). The current state of insect molecular systematics: A thriving tower of Babel. *Annu. Rev. Entomol.*, 45: 1-54.

Cronin, A.D., Molet, M., Doums, C., Moninin, T. & Peeters, C. (2013). Dependent colony foundation across eusocial insects. *The Annual Review of Entomology*, 58: 37-55.

Cunha, H.A, Solé-Cava, A.M. (2012). Análise Filogeográfica. In: S.R. Matioli. *Biologia Molecular e Evolução*. (pp. 197-215). Ribeirão Preto: Holos editora.

Edgar, R.C. (2004). Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32 (5): 1792-97.

Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.

Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. (2010). Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.*, 10: 564-567.

Ferraz, R.E., Lima, P.M., Pereira, D.S., Freitas, C.C.O. & Feijó, F.M.C. (2008). Fungi microbiot of *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae). *Neotropical entomology*, 37 (3): 345-346.

Francisco, F.O., Silvestre, D. & Arias, M.C. (2001). Mitochondrial DNA characterization of five species pf *Plebeia* (Apidae: Meliponinae): RFLP and restriction maps. *Apidologie*, 32: 323-332.

Francisco, P.R.M., Chaves, I.B., Chaves, L.H.G. & Lima, E.R.V. (2013). Estimativa da degradação da biomassa da vegetação de caatinga através de índices de vegetação. *Polêm!ca*, 12 (2): 306-321.

Fu, Y.X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147 (2): 915-25.

Haavie, J., Saetre, G.P. & Mount, T. (2000). Discrepancies in population differentiation at microsatellites, mitochondrial DNA and plumage colour in the pied flycatcher – inferring evolutionary processes. *Molecular Ecology*, 9: 1137-1148.

Hall, T. (2005). BioEdit: Biological Sequence Alignment Editor for Windows 95/98/NT/XP. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit?.html> (data de acesso: 1 setembro, 2014).

Harrison, R.G. (1989). Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 4: 6-11.

Hartl, D.L. & Clark, A.G. (2010). *Princípios de Genética de Populações*. Artmed, Porto Alegre, 545 p.

Hillis, D.M., Moritz, C. & Mable, B.K. (1996). *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Massachusetts. 243 p.

Jukes, T. & Cantor, C. (1969). *Evolution of Protein Molecules*. New York: Academic Press. 21–132 p.

Kerr, W.E., Carvalho, G.A. & Nascimento, V.A. (1996). *Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação*. Belo Horizonte-MG: Acangaú (Coleção Manejo da vida silvestre), 144 p.

Kimura, M. (1980). Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16 (2): 111-120.

Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP version 5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.

Lima, C.B.S., Nunes, L.A., Ribeiro, M.F. & Carvalho, C.A.L. (2014). Population structure of *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) at the southern limit of its distribution based on geometric morphometrics of forewings. *Sociobiology*, 61: 478-482.

Lopes, M.T.R., Silva, J.O., Pereira, F.M., Camargo, R.C.R., Vieira-Neto, J.M. & Ribeiro, V.Q. (2007). Atividade de voo de abelhas jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke, 1910) instaladas em dois modelos de colméia. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)*, 20.

Lynch, M. & Milligan, B.G. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3: 91-99.

Maia-Silva, C., Imperatriz-Fonseca, V.L., Silva, C.I. & Hrncir, M. (2014). Environmental windows for foraging activity in stingless bees, *Melipona subnitida* Ducke and *Melipona quadrifasciata* Lepageletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Sociobiology*, 6: 378-385.

Michener, C.D. (2007). *The Bees of The World*. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press.

Moritz, C., Dowling, T.E. & Brown, W.M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 269-292.

Murray, T.E., Fitzpatrick, U., Brown, M.J.F. & Paxton, R.J. (2007). Cryptic species diversity in a widespread bumble bee complex revealed using mitochondrial DNA RFLPs. *Conservation Genetics*, 9 (3): 653-666.

Nascimento, M.A., Batalha-Filho, H., Waldschmidt, A.M., Tavares, M.G., Campos, L.A.O. & Salomão, T.M.F. (2010). Variation and genetic structure of *Melipona quadrifasciata* Lepageletier (Hymenoptera, Apidae) populations based on ISSR pattern. *Genetics and Molecular Biology*, 33 (2): 394-397.

National Center for Biotechnology Information (NCBI), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (data de acesso: 1 setembro, 2014).

Nogueira-Neto, P. (1997). Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Editora Nogueirapis, 446 p.

Ramos-Onsins, S.E. & Rozas, J. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.*, 19: 2092-2100.

Silva, T.M.S., Santos, F.P., Evangelista-Rodrigues, A., Silva, E.M.S., Silva, G.S., Novais, J.S., Santos, F.A.R. & Camara, C.A. (2013). Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29: 10-18.

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

Souza, J.A., Machado, A.V., Maracajá, P.B. & Oliveira, F.L. (2014). Divergências morfológicas entre populações isoladas de *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae) no semiárido. *Revista Verde*, 9 (5): 24-30.

Souza, I.G.B., Paterson, I., McBride, M.C., Souza, B.A., Pereira, F.M., Lopes, M.T.R., Bentzen, P. & Diniz, F.M. (2015). Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the stingless bee *Melipona subnitida* using next-generation sequencing. *Conservation Genetics Resources*, 7 (1): 239-241.

Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 199-203.

Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.

Templeton, A.R. (1998). Nested clade analysis of phylogeographic data: testing hypothesis about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, Oxford, 7: 381-397.

Wilson, A.C., Cann, R.L., George, M., Gyllensten, U.B., Helmbjochowski, K.M., Higushi, R.G., Palumbi, E.M., Sage, R.D. & Stoneking, M. (1985). Mitochondrial

DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of Linnean Society*, 26: 375-400.

CAPÍTULO 2

DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Melipona subnitida* EM ILHA E CONTINENTE NO NORDESTE DO BRASIL: ANÁLISE DE DNA MITOCONDRIAL¹

¹ Artigo a ser ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico *Apidologie*, em versão na língua inglesa.

Diferenciação genética de populações de *Melipona subnitida* em ilha e continente no nordeste do Brasil: análise de DNA mitocondrial

Resumo: *Melipona subnitida* Ducke (1910) (Jandaíra) é uma espécie de abelha-sem-ferrão endêmica da Caatinga do nordeste brasileiro. Esta espécie é bem adaptada ao clima quente e seco da região e tem sido tradicionalmente explorada para a produção de mel. Em 1983, a espécie foi introduzida na Ilha de Fernando de Noronha (PE). No presente estudo, dados de sequências de DNA mitocondrial de *M. subnitida* foram obtidos para 13 colônias na ilha de Fernando de Noronha e comparados a 160 colônias do continente, nordeste do Brasil. A diversidade haplotípica (H_d) variou de 0,000 nas localidades de Fernando de Noronha, Cumaru e Passira, com apenas um haplótipo, a 0,806 na Parnaíba, com quatro haplótipos. 11 haplótipos encontram-se depositados no GenBank (H1 a H11) por outros autores e 3 novos foram identificados neste trabalho (H12, H13 e H14), com o haplótipo H12 sendo o mais frequente. Nas populações da ilha de Fernando de Noronha foi identificado apenas um haplótipo (H4), haplótipo este também encontrado em quatro populações continentais. Houve baixa diversidade haplotípica e nucleotídica nas populações da ilha em contraposição a alta diversidade nas populações continentais. Os dados sugerem duas hipóteses, a de que apenas um haplótipo possa ter sido transportado para a ilha; ou que a mudança de ambiente favoreceu a fixação de apenas um haplótipo.

Palavra-chave: Meliponini / variabilidade genética / abelha Jandaíra / COI

Genetic divergence in island and continental populations of *Melipona subnitida*, in the northeast of Brazil: Analysis of mitochondrial DNA

Abstract: *Melipona subnitida* Ducke (1910) (Jandaíra) is a stingless bee species endemic to the Caatinga biome, in northeastern Brazil. This species is well adapted to the hot and dry climate of the region and has traditionally been exploited for honey. In 1983, such species was introduced into the Fernando de Noronha Island (Pernambuco state). In this study, data from mitochondrial DNA sequences of *M. subnitida* were obtained from 13 Fernando de Noronha (island) colonies and compared to 160 continental colonies from different locations of the northeastern Brazil. The haplotype diversity (H_d) ranged from 0.000 in Fernando de Noronha, Cumaru and Passira (with only one haplotype) to 0.806 in Parnaíba (four haplotypes). Eleven haplotypes (H1 to H11) have been deposited in GenBank by other authors, while three new haplotypes (H12, H13 and H14) were identified in this study, with H12 being the commonest. H4 was the only haplotype found in Fernando de Noronha, although it was also found in four continental populations. There was a low haplotype and nucleotide diversity in the island populations as opposed to a high diversity in the continental populations. Our findings suggest two hypotheses: (1) only one haplotype has been introduced into Fernando de Noronha; or (2) the island environment selected only one haplotype.

Keywords: Meliponini / genetic variability / jandaíra bee / COI

INTRODUÇÃO

As abelhas são os agentes polinizadores mais importantes do mundo e possuem grande importância econômica e social (Michener, 2007) tanto na polinização de plantas nativas e como cultivadas em diversos ecossistemas terrestres (Klein et al., 2007). O catálogo Moure (Moure et al. 2007) reconhece a diversidade da fauna de abelhas para a região neotropical com 5.000 espécies catalogadas e, Ascher e Pickering (2015) estimam em mais de 20.092 o número de espécies de abelhas no mundo.

Melipona Illiger 1806 (Hymenoptera: Apidae) é um gênero de abelhas-sem-ferrão, estritamente neotropical (Michener, 2000) com ampla distribuição do México até a Argentina, compreendendo mais de 60 espécies (Moure et al., 2007). Devido ao seu grande potencial de polinização, essas abelhas são consideradas agentes vitais para a conservação da fauna e flora sul americanas (Fernandes-Salomão et al., 2002) chegando a ser responsável por 60% a 90% da polinização, dependendo da área florestal em que se encontrem (Kerr et al., 1994).

Popularmente conhecida como Jandaíra, *Melipona subnitida* é uma abelha nativa do bioma da Caatinga nordestina e uma das principais espécies de abelhas-sem-ferrão criadas na região Nordeste (Menezes, 2006), com distribuição nos Estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Paraíba, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte (Camargo e Pedro, 2007).

De modo geral, a criação de jandaíra é considerada sustentável por contribuir para a conservação de habitats, restaurando os ambientes por meio de plantio e preservação de árvores que servem de locais de nidificação, além da atuação das abelhas na polinização da flora nativa, sendo responsável por aproximadamente 50% da polinização da flora silvestre (Ferraz et al., 2008; Lopes et al., 2007), além de auxiliar na renda familiar, a exemplo do mel, que possui alto valor comercial e ótima qualidade (Cámara et al., 2004).

Rica em recursos naturais, a Caatinga é um bioma que ocupa mais de 750.000 km² (Oliveira et al. 2012) e contém um grande número de espécies adaptadas ao ambiente, com temperaturas anuais elevadas, longos períodos de seca (Prado, 2003; Silva, 2013) e índices de chuvas extremamente irregulares ao longo dos anos, resultando em secas periódicas severas (Krol et al., 2001; Chiang e Koutavas, 2004; Leal et al., 2003). Entretanto, é um dos ecossistemas mais

ameaçados do planeta, com perda de 61,98% do seu território no semiárido (Francisco et al. 2013), principalmente devido ao desmatamento e exploração madeireira. Não obstante, esse bioma tem sido descrito como uma região com um baixo número de espécies endêmicas (Andrade-Lima 1982; Vanzolini et al. 1980). Conseqüentemente, sua biodiversidade tem sido amplamente ignorado pelas políticas de conservação, com apenas 1% de seu território incluído dentro de áreas protegidas (Leal et al. 2005) o que torna o estudo e a conservação da diversidade biológica da Caatinga um dos maiores desafios para a ciência brasileira.

A abelha-sem-ferrão *M. subnitida* é um exemplo de abelha adaptada ao estresse climático da região e endêmica da Caatinga nordestina. Em 1983, 30 colônias de jandaíra foram introduzidas no arquipélago de Fernando de Noronha, sendo 20 retiradas do agreste do Ceará (Fortaleza) e 10 do Rio Grande do Norte (Mossoró). Essas duas regiões foram escolhidas por assemelharem-se ao clima seco do arquipélago (Kerr e Cabeda, 1985) e estas abelhas sobrevivem até os dias atuais, passados 31 anos.

Kerr e Cabeda (1985), relatam ainda outras experiências de introdução de abelhas na ilha de Fernando de Noronha. Em 1974, o senhor Francisco Pereira Alves introduziu a abelha *Scaptotrigona postica*, coletada em Pernambuco. As colônias se desenvolveram rapidamente, estimando de 20 a 30 descendentes, porém após oito anos quase todas haviam morrido. Em 1982 Kerr introduziu também *Melipona fasciculata*, porém a continuidade da espécie na ilha não foi relatado.

Fernando de Noronha (Pernambuco) é o maior arquipélago oceânico brasileiro, situado a 345 km da costa do nordeste do Brasil (Garla et al. 2006). O arquipélago consiste em uma ilha principal e cerca de 18 pequenas ilhas, abrangendo uma área total de 26 km² e elevação máxima de 320 m acima do nível do mar (Garla et al. 2006). A maior parte do arquipélago (70%) está incluído em um Parque Nacional Marinho desde 1988, e, a principal ilha, onde cerca de 4.000 pessoas vivem é uma área de proteção ambiental (criado em 1986). Os restantes (30%), corresponde às áreas urbanas da ilha principal, é uma área de proteção ambiental (APA), designado para uso sustentável (Garla et al. 2006; Ivar do Sul et al. 2009). Em 2001, o arquipélago foi declarado Patrimônio Mundial pela UNESCO (Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura) dado à sua importância para as aves marinhas, cetáceos tropicais, tubarões, peixes e

tartarugas marinhas (UNESCO 2014). O clima da ilha é tropical, com duas estações bem definidas: uma chuvosa entre fevereiro e julho (209 mm) e uma estação seca entre agosto e janeiro (23 mm) (Ivar do Sul et al. 2009) e, apresenta vegetação do tipo agreste, região de Caatinga.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de *Melipona subnitida* em colônias introduzidas na Ilha de Fernando de Noronha, as quais permaneceram isoladas por 31 anos e, comparando-as com 160 amostras de colônias em áreas continentais no nordeste do Brasil, utilizando sequências do gene COI do DNA mitocondrial.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizadas 173 análises de sequências do gene COI do DNA mitocondrial de *M. subnitida*. Para realização destas análises, foram coletadas 81 abelhas operárias em localidades da Bahia (n=13), Alagoas (n=23) e Pernambuco (n=45). Para as análises das colônias localizadas Rio Grande do Norte (n=66), Maranhão (n= 7), Piauí (n= 9) e Ceará (n= 10) foram utilizados dados do banco NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), no qual haviam 11 sequências depositadas do gene COI (código de acesso KC879031.1 a KC879041.1). Suas frequências foram descritas no trabalho de Bonatti (2014), totalizando 92 sequências (Figura 1 e Tabela I). A determinação dos haplótipos seguiu a mesma ordem sequencial aplicada no banco de dados.

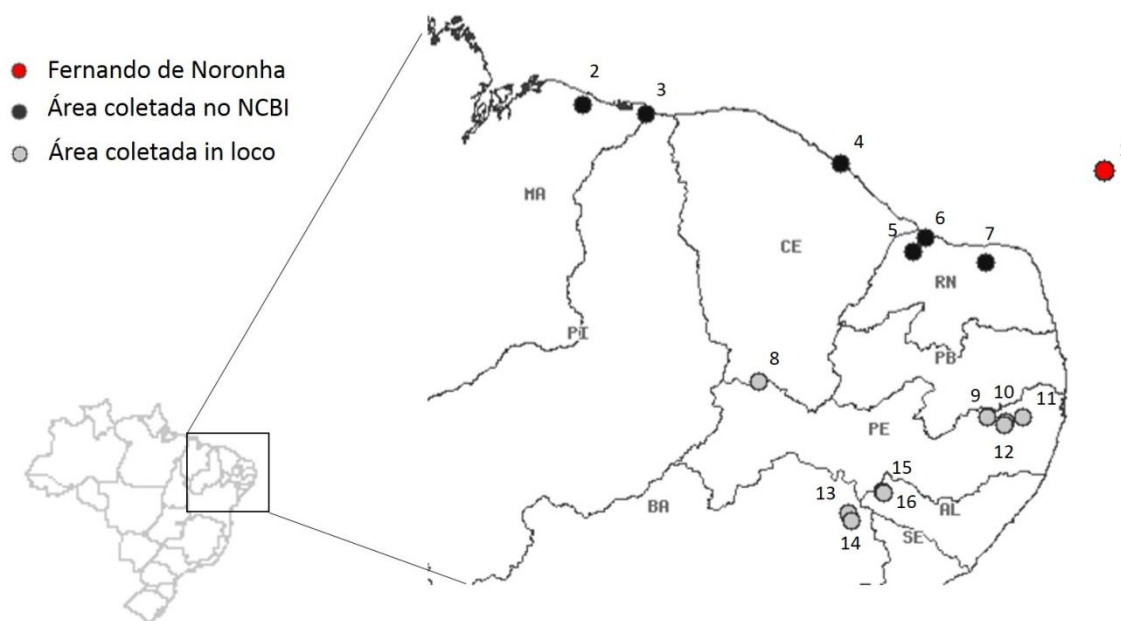


Figura 1. Origem e localização geográfica das amostras de *Melipona subnitida*. 1. Fernando de Noronha; 2.Barreirinhas; 3. Parnaíba; 4. Fortaleza; 5. Mossoró; 6. Areia Branca; 7. Jandaíra; 8. Exu; 9. Taquaritinga do Norte; 10. Riacho das Almas; 11. Passira; 12. Cumaru; 13. Joá; 14. São José; 15. Água Branca; 16. Mata Grande.

O DNA total foi extraído a partir do tecido da cabeça de cada operária através do conjunto de reagentes Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

A quantificação e integridade do DNA total extraído foram verificadas através do espectrofotômetro BioPhotometer D30 (Eppendorf) e diluídas em água ultra-pura (Mili-Q) para concentração final de 20ng/μl.

A amplificação da região COI do DNA mitocondrial (mtDNA) utilizou os *primers* mtD6 e mtD9, considerados universais (Simon et al., 1994). As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 10μL contendo 5μL de Top Taq Master Mix (Qiagen); 0,2μL de cada primer a 20mM; 4,1μL de água ultra-pura e 0,5μL de DNA total. A amplificação foi conduzida em termociclador (Veriti Thermal Cycler ® – Applied Biosystems) usando o seguinte programa: um ciclo de desnaturação a 94°C com duração de 5 min, seguido de 35 ciclos de: desnaturação a 94°C por 1min, anelamento por 1min a 42°C e alongação por 3 min a 64°C e um ciclo de extensão final a 64°C por 10 min.

Tabela I. Localização geográfica das amostras de *Melipona subnitida*.

Estado	Localidade	N° de colônias/ indivíduos	Coordenadas Geográficas (S / W)
PE	Fernando de Noronha	13	3° 50' 51,4"/ 32° 24' 17,7"
	Cumaru	7	8°1'58,5"/35°45'3,11"
	Exu	3	7°20'22,6"/39°54'58,5"
	Passira	5	7°55'37,8"/35°30'14,0"
	Riacho das Almas	6	8°3'40,7"/35°49'9,62"
	Taquaritinga do Norte	11	7°56'14,1"/36°7'05,7"
AL	Água Branca	11	9°10'24,7"/37°51'41,9"
	Mata Grande	12	9°11'09,3"/37°50'09,8"
BA	Joá	5	9°31'08,8"/38°25'36,7"
	São José	8	9°39'04 8"/38°22'43,2"
RN	Areia Branca	6	4°56'52"/37°7'28"
	Jandaíra	49	5°21' 25"/36°7'32"
	Mossoró	11	5°11'17"/37°20' 39"
MA	Barreirinhas	7	2°44'58"/42°49'58"
PI	Parnaíba	9	2°54'14"/41°46'35"
CE	Fortaleza	10	3°43'6"/38°32'36"
TODOS		173	

Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com Gel-Red (Biotium), quando possível em substituição ao método de brometo de etídio (25µg/µL). Na corrida de eletroforese foi acrescentado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb) (Ladder) (GE Healthcare®). Os fragmentos amplificados foram visualizados em transluminador e as imagens capturadas.

Os produtos da amplificação do gene COI foram purificados com o protocolo de precipitação de DNA com PEG a 20%. As reações de sequenciamento foram realizadas pelo método direto, em ambas as direções – *forward* e *reverse* – contendo: 50ng de produto de PCR purificado, 1,75µL de tampão de sequenciamento (Save Money 5X), 0,5µL de BigDye v3.1 (Applied Biosystems®), 0,25µL do oligonucleotídeo (pmol/µL) iniciador e quantidade de água ultra pura que completem 10µL. Ao término da reação de sequenciamento, que consistiu de 1 ciclo de 96°C por 3 min, 35 ciclos compostos por uma etapa a 96°C por 15 s, uma

etapa a 42°C por 10 s e uma etapa de polimerização a 60°C por 4 min, por último uma etapa de 60° por 5 min as amostras foram mantidas a 4°C até o momento do uso.

Em seguida, 40µL de isopropanol 80% foram adicionados a cada amostra. Após 15 min a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm, em centrífuga de tubo refrigerada por 25 min a 4°C. Após precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e as amostras lavadas, duas vezes, com 150µL de etanol 70% seguido de centrifugação a 4.000 rpm por 15 min a 4 °C.

As amostras foram secas a temperatura ambiente ou em termociclador (50 °C por 15 min), ressuspendidas em 10µL de formamida, desnaturadas por 5 min a 95°C e submetidas ao sequenciamento em um sequenciador automático 3130XL DNA Analyzer conforme metodologia sugerida pelo fabricante do equipamento (Applied Biosystems®).

As sequências de DNA “forward” (mtD6) e “reverse” (mtD9) obtidas a partir do sequenciamento foram visualizadas e editadas no programa BioEdit (Hall 2005), com conferência manual das mesmas, e foi criada uma única sequência consenso para cada amostra. O alinhamento múltiplo das sequências foi gerado no programa Mega 6.0 (Edgar 2004).

A análise descritiva das sequências de DNA das populações de *M. subnitida* foi realizada utilizando-se o programa DnaSP v.5.1 (Librado e Rozas, 2009), que estimou o número de haplótipos mitocondriais (h), os índices de diversidade haplotípica (Hd), os valores de diversidade nucleotídica (π), o número de sítios polimórficos (S) e o número médio de diferenças nucleotídicas (k).

A análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al, 1992) foi implementada pelo programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010) para verificar as diferenças entre as populações, índice F_{st} entre pares de populações. A diversidade intrapopulacional e a divergência interpopulacional foram calculadas utilizando o modelo de diferenciação par a par. Inferências com relação à ocorrência de eventos de expansão populacional foram baseadas nas estimativas de neutralidade utilizando os testes D de Tajima (1989) e F_s de Fu (1997).

Para estimar as relações genealógicas entre os haplótipos mitocondriais, foi construída uma rede de haplótipos utilizando o programa NETWORK v. 4.613 (www.fluxus-engineering.com) gerado a partir do método median-joining (Bandelt

et al., 1999). O tamanho de cada agrupamento refere-se à frequência haplotípica e o preenchimento, às diferentes localidades.

Para análises da entropia, foi utilizado o Data Analysis in Molecular Biology and Evolution (DAMBE) v.5.2.31 (XIA e XIE, 2001), a fim de avaliar a variabilidade e complexidade local de cada nucleotídeo. Para calcular a entropia de cada posição foi utilizada o índice de Shannon (1949). Onde H corresponde à entropia em cada sítio; i é igual a 1, 2, 3 ou 4, correspondendo aos nucleotídeos A, C, G ou T, respectivamente; e p é a proporção do nucleotídeo i no sítio. Como as sequências de DNA possuem quatro bases diferentes, a entropia máxima será de dois bits por sítio.

Utilizando a ferramenta “Entropy” do site (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ENTROPY/entropy.html>) foram realizadas comparações de entropia entre dois grupos de sequências “background” vs “query”. O conjunto de dados com 173 sequências serviu de “background” para comparar cada amostra coletada na ilha, que serviram de consulta “query”, determinando a variabilidade em relação a todos os haplótipos e, se existem variações exclusivas no conjunto das sequências. Entropia tem a opção de randomização a sequência, dessa forma, às sequências com comprimento variável no alinhamento foram adicionados asteriscos (*) para compensar sequências mais curtas.

RESULTADOS

Foram analisadas 173 sequências de *M. subnitida*. Após o alinhamento foi obtida uma matriz de 510 pb, sendo 497pb sítios conservados (monomórficos) e 13pb sítios variáveis (polimórficos), com apenas um sítio único (singleton ou mutação pontual).

O gene COI apresentou frequência nucleotídica média de Timina = 32,5%, Adenina = 44,5%, Citosina = 9,6% e Guanina = 13,3%. Neste polimorfismo das bases nucleotídica, foram registradas 39 substituições, sendo 37 transições e duas transversões.

A diversidade haplotípica (Hd) foi considerada alta, com valor médio de 0,8220. Houve grande variação neste índice, onde a menor diversidade haplotípica foi de 0,000 referente às localidades de Fernando de Noronha, Cumaru e Passira,

com apenas um haplótipo, e a maior foi de 0,806 obtida nas populações da Parnaíba, com quatro haplótipos. O índice de diversidade nucleotídica (π) correspondeu a média de 0,00391. Quando as populações foram analisadas separadamente, a diversidade nucleotídica variou de 0,000 em Fernando de Noronha, Cumaru e Passira a 0,00473 em Jandaíra – RN (Tabela II). Considerando apenas as populações das áreas amostradas no continentais (excluindo as colônias introduzidas em Fernando de Noronha), a diversidade haplotípica manteve-se alta, com relativo aumento ($H_d = 0,824$; $\pi = 0,00410$; $k = 1,786$; $n = 160$).

Tabela II. Sumário da diversidade genética do gene COI nas populações de *Melipona subnitida*. (N) número de indivíduos; (S) número de sítios polimórficos; (H) número de haplótipos; (H_d) diversidade haplotípica; (π) diversidade nucleotídica; (K) número médio de diferenças.

Localidade	N	S	H	H_d	π	K
Fernando de Noronha –PE	13	0	1 (H4)	0,000	0,000	0,000
Cumaru-PE	7	0	1 (H12)	0,000	0,000	0,000
Exu – PE	3	2	2 (H1, H12)	0,667	0,00267	1,333
Passira –PE	5	0	1 (H12)	0,000	0,000	0,000
Riacho das Almas –PE	6	2	2 (H1, H12)	0,333	0,00133	0,667
Taquaritinga do Norte-PE	11	1	2 (H12, H14)	0,327	0,00065	0,327
Água Branca – AL	11	2	3 (H12, H13, H14)	0,345	0,00073	0,364
Mata Grande –AL	12	1	2 (H12, H14)	0,303	0,00061	0,303
Joá – BA	5	1	2 (H12, H14)	0,600	0,00120	0,600
São José – BA	8	1	2 (H12, H14)	0,536	0,00107	0,536
Areia Branca – RN	6	2	2 (H5, H11)	0,533	0,00239	1,067
Jandaíra – RN	49	7	5 (H2, H3, H4, H5, H6)	0,690	0,00473	2,109
Mossoró – RN	11	2	2 (H1, H4)	0,436	0,00171	0,873
Barreirinhas – MA	7	1	2 (H7, H9)	0,571	0,00128	0,571
Parnaíba – PI	9	3	4 (H1, H4, H5, H7)	0,806	0,00249	1,111
Fortaleza – CE	10	2	3 (H4, H8, H10)	0,511	0,00125	0,556
Todos	173	13	14	0,8220	0,00391	1,706

Foram identificados 14 haplótipos (H1 a H14), que se diferenciam de um a seis substituições nas bases nucleotídica (Tabela III). Destes 11 (H1 a H11) já se encontravam depositados no banco de dados do NCBI e 3 (H12, H13 e H14) são haplótipos novos.

Tabela III. Haplótipos de *Melipona subnitida* e seus respectivos sítios variáveis. Números verticais correspondem à posição em pb dos sítios polimórficos (singleton) dentro do fragmento do gene COI. Os pontos são sítios conservados após alinhamento.

Posição/ Haplótipo	17	66	137	146	155	279	315	321	353	354	378	393	482
H1	G	T	G	A	A	T	G	A	C	C	A	T	A
H2	G	.	A	G	.	.	G	.	N
H3	.	.	.	G	G	.	A	G	.	T	G	.	N
H4	G	G
H5	G	C	N
H6	G	.	A	G	T	.	G	.	N
H7	G	C	N
H8	G	.	T	N
H9	.	C	.	.	G	C	N
H10	G	.	.	.	T	.	.	.	N
H11	G	T	.	.	N
H12	G	G	.	.
H13	.	.	A	.	G	G	.	.
H14	T	.	.	.	G	G	.	.

N= base nitrogenada não determinada.

A frequência haplotípica das 16 localidades (Tabela IV) demonstra que o haplótipo H12 foi o mais frequente, ocorrendo nas nove populações do limite sul de sua ocorrência natural. O haplótipo H1 possui ocorrência nos estados do Piauí, Rio Grande do Norte e Pernambuco, ou seja, nas populações do limite norte e do limite sul de sua distribuição natural. E as populações de Fernando de Noronha apresentaram apenas um haplótipo (H4).

A análise da rede de haplótipos (Figura 2) sugere a existência de três grupos principais (H2, H4 e H12). O primeiro, formado pelos haplótipos H2, H3 e H6, amostrados em Jandaíra (RN). O segundo, com o haplótipo H4 mais basal, posicionado no centro e com os haplótipos H5, H7, H8, H10 e H11 distantes do H4 por um único passo de mutação. O terceiro grupo é formado pelos haplótipos H12, H13 e H14, exclusivos do limite sul de sua área de ocorrência natural (Cumaru, Exu, Passira, Riacho das Almas, Taquaritinga do Norte, Água Branca, Mata Grande, Joá, São José).

Tabela IV. Frequência (%) dos haplótipos de *Melipona subnitida* nas populações amostradas.

Haplótipo/ localidade	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14
Fernando de Noronha (n=13)				100										
Cumarú (n=07)												100		
Exu (n=03)	0,67											0,33		
Passira (n=05)												100		
Riacho das Almas (n=06)	0,17											0,83		
Taquaritinga do Norte (n=11)												0,82		0,18
Água Branca (n=11)												0,82	0,09	0,09
Mata Grande (n=12)												0,83		0,17
Joá (n=05)												0,6		0,4
São José (n=08)												0,63		0,38
Areia Branca (n=06)					0,67						0,33			
Jandaíra (n=49)		0,45	0,04	0,24	0,24	0,02								
Mossoró (n=11)	0,73			0,27										
Barreirinhas (n=07)							0,43		0,57					
Parnaíba (n=09)	0,22			0,33	0,11		0,33							
Fortaleza (n=10)				0,7				0,1		0,2				

Legenda:

- Joá-BA
- São José-BA
- Água Branca-AL
- Mata Grande-AL
- Fernando de Noronha-PE
- Cumaru-PE
- Exu-PE
- Passira-PE
- Riacho das Almas-PE
- Taquaritinga do Norte-PE
- Areia Branca-RN
- Jandaíra-RN
- Mossoró-RN
- Fortaleza-CE
- Parnaíba-PI
- Barreirinhas-MA

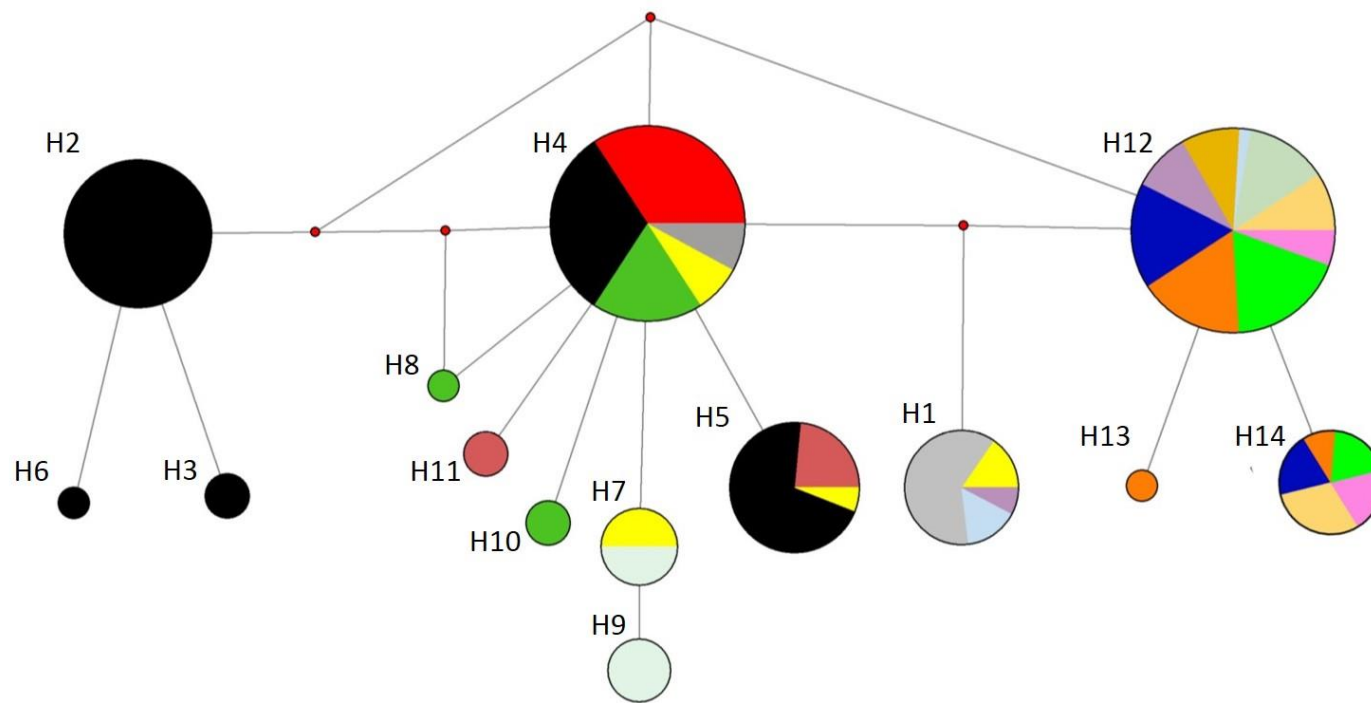


Figura 2. Rede de inter-relações haplotípicas para o gene COI de *Melipona subnitida*. Os tamanhos dos círculos são proporcionais as frequências haplotípicas.

Os resultados referentes à análise de variância molecular (AMOVA) estão representados na tabela V. Considerando todas as populações pertencentes a um único grupo (A) observa-se que a variabilidade genética interpopulacional foi de 46,75% e a intrapopulacional foi 53,25%. Considerando dois grupos (B), ilha e continente, as maiores diferenças genéticas também correspondem as variações dentro das populações (intrapopulacional) com 56,84%, e as variações entre os grupos foi baixa, correspondendo a -8,0%.

Tabela V. Análise de variância molecular (AMOVA) para sequências do gene COI de *Melipona subnitida*.

Estruturação	Varição	Grau de liberdade	Variância dos componentes	% da variação	Φ	P-valor
(A) Populações da ilha + Populações do continente	Interpopulacional	15	0, 42120 a	46,75	-	-
	Intrapopulacional	157	0, 47972 b	53,25	$\Phi_{ST}= 0,46753$	0,00000
	Total	172	0, 90092			
(B) Populações da ilha vs Populações do continente	Intergrupos	1	-0, 06753 a	-8,00	$\Phi_{CT}= -0,08000$	0, 49485
	Interpopulacional	14	0, 43185 b	51,16	$\Phi_{SC}=0.47375$	0,00000
	Intrapopulacional	157	0, 47972 c	56,84	$\Phi_{ST}= 0.43164$ +-0.00499	0,00000
	Total	172	0, 84404			

Número de permutações = 10.100; $\alpha = 0,05$. a; b; c: médias que diferem entre si.

Da região com 510pb analisados, foram selecionados 432 sítios, referindo-se a 144 códons, sendo identificado uma proteína codificante (éxons) e ausência de íntrons ou regiões flangeadoras. A diversidade nucleotídica repercutiu na sequência de aminoácidos com oito mutações silenciosas (sinônima) e cinco não sinônimas (Tabela VI).

Tabela VI. Diversidade nucleotídica para sítios sinônimos e não-sinônimos de códons de aminoácido do gene COI de *Melipona subnitida*.

Diversidade Nucleotídica	Nº sítios	Pi (Jukes & Cantor)	Θ	Mutações
Sítios sinônimos	78,28	0,01773 (0,01810)	0,01784	08
Sítios não-sinônimos	353,72	0,00090 (0,00090)	0,00247	05

Para os testes de neutralidade seletiva de mutações o D de Tajima (Tajima 1989) apresentou valor médio de 0,18780 e o F_s de Fu (1997) valor de 0,52204, estatisticamente não significativos ($\alpha > 0,05$).

Os resultados das comparações entre pares de populações e a estruturação genética a partir dos valores de Φ_{ST} são apresentados na tabela VII. Os dados mostram que o maior nível de diferenciação ocorreu entre as populações de Fernando de Noronha e Cumaru (1,0) e entre Fernando de Noronha e Passira (1,0). E a menor diferenciação ocorreu entre as populações de Joá e São José (-0,1924).

Tabela VII. Matriz mostrando os valores de Φ_{ST} entre os pares de populações de *Melipona subnitida* (parte inferior da tabela) e o P-valor (parte superior da tabela).

	MO	BA	PA	JA	FO	AR	CU	EX	PS	RA	TN	AB	MG	JO	SJ	FN
MO		0,00000	0,01247	0,0001	0,00089	0,00000	0,00000	0,61637	0,00010	0,00109	0,00000	0,00000	0,00000	0,00030	0,00000	0,00030
BA	0,7869*		0,00297	0,00000	0,00000	0,00079	0,00040	0,00733	0,00139	0,00089	0,00000	0,00000	0,00000	0,00119	0,00030	0,00000
PA	0,2924*	0,4504*		0,00168	0,00564	0,01089	0,00000	0,19929	0,00069	0,00198	0,00000	0,00000	0,00000	0,00099	0,00000	0,00109
JA	0,4114*	0,5095*	0,2978*		0,00198	0,00802	0,00762	0,05079	0,03713	0,02505	0,00050	0,00099	0,00099	0,02515	0,00168	0,00050
FO	0,5191*	0,6996*	0,1433*	0,2796*		0,00040	0,00000	0,01396	0,00000	0,00030	0,00000	0,00000	0,00010	0,00010	0,00000	0,06435
AR	0,6077*	0,6883*	0,2814*	0,2992*	0,4073*		0,00059	0,02228	0,00238	0,00149	0,00010	0,00010	0,00010	0,00287	0,00040	0,00000
CU	0,8459*	0,8889*	0,6324*	0,2637*	0,7518*	0,7533*		0,06227	0,99990	0,45055	0,49757	0,99990	0,50589	0,14929	0,20137	0,00000
EX	-0,0165	0,6906*	0,1317	0,2500	0,3947*	0,4194*	0,7083		0,10900	0,47322	0,03198	0,03564	0,03247	0,06673	0,04198	0,00307
PS	0,8264*	0,8687*	0,5881*	0,2385*	0,7207*	0,7094*	0	0,6342		0,99990	0,54509	0,99990	0,55975	0,44352	0,23186	0,00030
RA	0,6475*	0,7607*	0,4234*	0,2124*	0,5379*	0,5667*	0,0278	0,2500	-0,0345		0,27166	0,42857	0,26156	0,17483	0,13731	0,00000
TN	0,8000*	0,8466*	0,6274*	0,2959*	0,7052*	0,7253*	0,0428	0,6227*	-0,0041	0,0675		0,99990	0,99990	0,55272	0,59212	0,00000
AB	0,7905*	0,8384*	0,6166*	0,2905*	0,6924*	0,7143*	-0,0462	0,6019*	-0,0891	0,0257	-0,0450		0,79853	0,33125	0,25403	0,00000
MG	0,8062*	0,8531*	0,6389*	0,3002*	0,7139*	0,7367*	0,0278	0,6400*	-0,0170	0,0698	-0,0946	-0,0470		0,54133	0,60212	0,00000
JO	0,7701*	0,8037*	0,5578*	0,2773*	0,6639*	0,6445*	0,3312	0,4938	0,2500	0,1342	-0,0288	0,0870	0,0008		0,99990	0,00020
SJ	0,7722*	0,8125*	0,5903*	0,3021*	0,6737*	0,6769*	0,2612	0,5485*	0,2000	0,1572	-0,0179	0,0883	0,0061	-0,1924		0,00000
FN	0,7209*	0,8727*	0,2277*	0,3113*	0,1084	0,6225*	1*	0,7306*	1*	0,7808*	0,8728*	0,8585*	0,8752*	0,8837*	0,8503*	

* $\alpha = 0,05$. AB: Água Branca; CU: Cumarú; EX: Exu; JO: Joá; MG: Mata Grande; PS: Passira; RA: Riacho das Almas; SJ: São José; TN: Taquaritinga do Norte; FN: Fernando de Noronha; AR: Areia Branca; FO: Fortaleza; JA: Jandaira; PA: Parnaíba; BA: Barreirinhas; MO: Mossoró.

O gráfico de entropia de *M. subnitida* (Figura 3) demonstra que existe alta conservação do gene, ou seja, ocorre baixa variação nos níveis de entropia, que alcançam índices menores que 0,7. Isto reflete as transições e transversões nos 13 sítios de variação (traços em azul e vermelho) dentro do fragmento do gene COI. A comparação de todas as sequências (n=173) com as populações da ilha de Fernando de Noronha (n=13) mostram a existência de apenas 3 sítios variações (traços em vermelho).

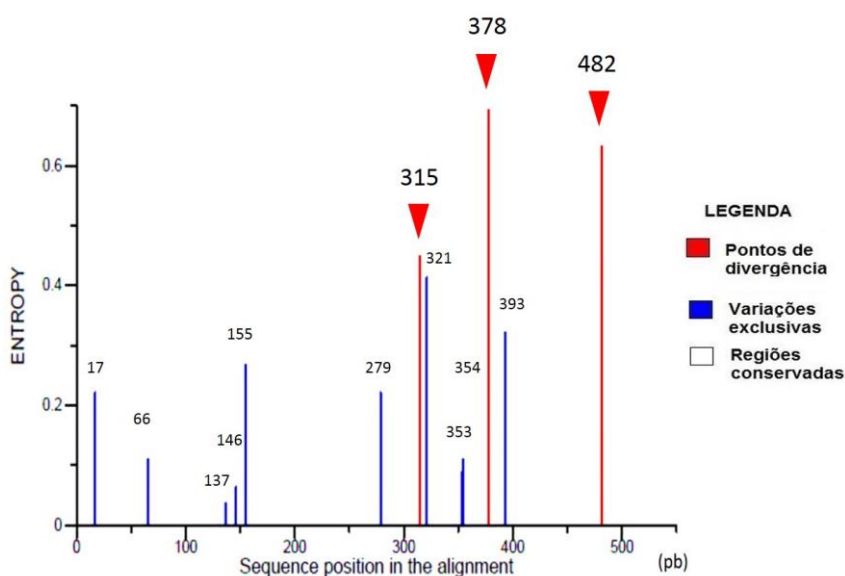


Figura 3. Entropia de *Melipona subnitida* para a região COI do DNA mitocondrial. A região em vermelho apresenta os locais variáveis para a população da ilha de Fernando de Noronha-PE.

DISCUSSÃO

Conteúdo A+T (77%) apresenta um padrão esperado de composição nucleotídica já observado para o gênero *Melipona*, com 79,8% em *Melipona quadrifasciata* (Batalha-Filho et al., 2010), em outras espécies de abelhas, como *Partamona mulata* com 77,7% (Brito et al., 2013), *Apis cerana* com 74,3% (Zhao et al., 2014) e os insetos de modo geral, com 70% (Crozier e Crozier 1993; Simon et al., 1994).

No estudo sobre variação do DNAm_t do gene COI verificamos alto Hd (0,8220) e baixo π (0,00391). Dados semelhantes também foram observados em populações de ilha e continente de *Apis cerana* na China (Hd =0,812 e π =0,00481) (Zhao et al., 2014). O baixo π pode estar relacionado a pouca variação entre as populações, pois a grande maioria deles diferem entre si por pouco passos mutacionais (Bonatti et al., 2014), em nossos dados encontramos o máximo de seis mutações entre que ocorrem entre os haplótipos H1 e H3.

A identificação de três novos haplótipos H12, H13 e H14, sendo estes exclusivos do limite sul de sua distribuição natural (Cumaru, Exu, Passira, Riacho das Almas, Taquaritinga do Norte, Água Branca, Mata Grande, Joá, São José), formam um haplogrupo distinto dos demais e, possivelmente teve sua dispersão do haplotipo H1. O isolamento destes haplótipos (H12, H13 e H14) possivelmente deve-se às barreiras geográficas, como a Chapada do Araripe (estados do Ceará, Piauí e Pernambuco) e à degradação ambiental do bioma Caatinga que impedem ou dificultam a ocorrência de fluxo gênico com outras localidades.

Houve variação genética significativa dentro das populações de *M. subnitida* (ver resultados do teste de AMOVA Tabela V) sugerindo que há uma estruturação intrapopulacional e que as 173 populações compartilham essencialmente o mesmo conjunto de genes. A alta variabilidade genética dentro de localidades é geralmente associada com a falta ou restrições ao fluxo de genes entre espécimes de diferentes localidades, o que pode potencialmente levar a um aumento da endogamia dentro de localidades (Miranda et al., 2012). Neste estudo, encontramos também variação genética significativa entre as populações (interpopulacional) e somado aos testes de neutralidade seletiva que apresentaram valores não significantes, os dados sugerem que as populações de *M. subnitida* estejam em equilíbrio genético, não demonstrando expansão populacional. As regiões de amostragem no continente estão cercadas por barreiras físicas naturais, tal como a Chapada do Araripe, vales e áreas de degradação ambiental, além das populações na ilha de Fernando de Noronha isoladas pela distância de 345 Km da costa.

O percentual de variação detectada pela AMOVA e o valor de Φ_{ST} (0,46753) mostram que as populações de *M. subnitida* estão altamente estruturadas nas localidades amostradas quando comparado a outros estudos em abelhas-sem-ferrão, onde índices Φ_{ST} também foram elevados, tal como *Melipona quadrifasciata*,

com $\Phi_{ST} = 0,59$ (Nascimento et al., 2010) e $\Phi_{ST} = 0,90$ (Batalha-Filho et al., 2010), *Melipona rufiventris* com $\Phi_{ST} = 0,76$ e $0,77$ (Tavares et al. 2007), e moderadamente estruturada em *Melipona mandacaia*, $\Phi_{ST} = 0,2961$ (Miranda et al., 2012), embora estes estudos basearam-se em marcadores moleculares distintos.

As comparações par a par do Φ_{ST} entre as localidades (ver tabela VII) nos mostram que a maioria das comparações apresentou valores elevados e altamente significativos. Os pares de populações de Fernando de Noronha (PE) e Cumaru (PE) e entre Fernando de Noronha (PE) e Passira (PE) foram as comparações com maiores índices de diferenciação, fortemente estruturadas entre si. Embora estas populações pertençam ao mesmo estado, elas estão diferenciadas geneticamente umas das outras pela distância entre as localidades e o tempo de isolamento das populações da ilha (31 anos).

As comparações entre as localidades de Joá (BA) e São José (BA) apresentaram baixos valores de diferenciação do Φ_{ST} e não significativos, portanto, indicando que estas localidades não estejam diferenciadas geneticamente.

A entropia tem sido usada para compreender a conservação de sequências nucleotídicas e proteicas (Liao et al., 2005). As baixas taxas de entropia podem ser explicadas pelas substituições nas bases do tipo transições, nas quais foram identificados 37 em contraposição de apenas duas transversões. Segundo Smith e Szathmary (1995) a variação da composição nucleotídica no mtDNA podem ser justificadas possivelmente ao mecanismo de replicação e mutação, sendo um indicativo de processos evolutivos do gene. As mudanças do tipo transições (G/C \leftrightarrow A/T) ocorrem de forma espontaneamente na natureza e podem ser “inclinadas/tendenciosas” quando expostas a pressões seletivas e as transversões (G/A \leftrightarrow C/T) ocorrem frequentemente em condições oxidativas (Kino & Sugiyama, 2001).

O H4 foi o único haplótipo encontrado na Ilha de Fernando de Noronha. Este haplótipo está presente em mais quatro localidades do nordeste do Brasil (Jandaíra-RN, Mossoró-RN, Parnaíba-PI e Fortaleza-CE), inclusive nas localidades de Mossoró e Fortaleza, que são os locais de origem das colônias de *M. subnitida* que foram introduzidas na ilha há 31 anos. Na análise da rede de haplótipos, a presença deste no centro da rede (ver fig 2) sugere que ele seja o mais antigo dos haplótipos observados, corroborando o estudo de Bonatti et al. (2014).

Dessa forma, abordamos duas hipóteses para a colonização da ilha de Fernando de Noronha: i) que as colônias transportadas das localidades de Mossoró e Fortaleza possuíam apenas o haplótipo H4; ou ii) que houve mais haplótipos transportados e introduzidos na ilha, contudo a mudança de ambiente favoreceu a fixação de apenas um, o H4.

De acordo com a frequência haplotípica registrada em Mossoró e Fortaleza, observamos a presença dos haplótipos H1, H4, H8 e H10. Nestes, foi registrado alta frequência do H1 (0,73%) o que sugere que ao menos os haplótipos H1 e H4 possivelmente foram introduzidos na ilha e, aconteceu o efeito gargalo, com diminuição no número de alelos. A deriva genética aleatória que acompanha esse evento é conhecido como efeito do fundador (Hartl e Clark, 2010). Para McNab (1994), as diferenças ambientais são mais notável se o organismo chega de um continente para uma ilha isolada, pois em comparação com o continente, ilhas tendem a ter recursos mais limitados, bem como espaço e predadores, os quais podem afetar as espécies que chegam no novo ambiente. E dessa forma, acreditamos na ocorrência do efeito fundador nas populações que foram introduzidas na ilha e que permanecem isoladas a 31 anos. Em *Apis cerana*, Sihanuntavong et al. (1999) também observaram apenas um haplótipo em uma população da ilha Phuket, cuja baixa variabilidade seria consequência da colonização da ilha por populações com baixa diversidade haplotípica, ocorrendo o efeito fundador.

CONCLUSÃO

Dos 14 haplótipos identificados no continente, baseado na análise do gene COI do DNAm, apenas um (H4) é compartilhado pelas populações da ilha de Fernando de Noronha;

Observou-se baixa diversidade haplotípica e nucleotídica nas populações da ilha de Fernando de Noronha em relação as populações continentais;

Três novos haplótipos foram identificados (H12, H13 e H14), os quais serão depositados no *GenBank*, visando aumento do banco de dados e difundir informações que possam ser usadas para análises genéticas e para a conservação da espécie.

REFERÊNCIAS

Andrade-Lima, D. (1982) Present-day forest refuges in northeastern Brazil, in: Prance, G. T. (Ed.), Biological diversification in the tropics. Columbia University Press, New York, pp 245–254.

Ascher, J. S., Pickering, J. (2015) Discover Life bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila) [online] http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species (acessado em 05 de maio de 2015).

Bandelt, H. J., Forster, P., Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37-48.

Batalha-Filho, H., Waldschmidt, A. M., Campos, L. A. O., Tavares, M. G., Fernandes-Salomão, T. M. (2010) Phylogeography and historical demography of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): Incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie*. 41(5), 534-547.

Bonatti, V., Simões, Z. L. P., Franco, F. F., Franco, T. M. (2014) Evidence of at least two evolutionary lineages in *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) suggested by mtDNA variability and geometric morphometrics of forewings. *Naturwissenschaften*. 101, 17–24.

Bonatti, Vanessa. Caracterização genético-morfológica de populações de *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) no nordeste brasileiro. Dissertação. 2012.

Cámara, J. Q., Sousa, A. H., Vasconcelos, W. E., Freitas, R. S., Maia, P. H. S., Almeida, J. C., Maracajá, P. B. (2004). Estudos de meliponíneos, com ênfase a *Melipona subnitida* D. no município de Jandaíra, RN. *Revista de Biologia e Ciências da Terra* 4 (1).

Camargo, J. M. F., Pedro, S. R. M. (2007) Meliponini, Lepeletier, 1836, in: Moure, J.S.; Urban, D. et al. (Eds.), Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in Neotropical region. Sociedade Brasileira de Entomologia, pp. 272-578.

Chiang, J. C. H., Koutavas, A. (2004) Climate change: tropical flip-flop connections. *Nature*. 432, 684-685.

Cozier, R. H, Crozier, Y. C. (1993) The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*. 133 (1), 97-117.

Edgar, R. C. (2004) Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32(5), 1792-97.

Entropy [online] <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ENTROPY/entropy.html> (acessado em 20 de abril de 2015).

Excoffier, L., Lischer, H. E. L. (2010) Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564-567.

Excoffier, L., Smouse, P. E., Quattro, J. M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131, 479-491.

Fernandes-Salomão, T. M., Muro-Abad, J. I., Campos, L. A. O., Araújo, E. F. (2002) Mitochondrial and nuclear DNA characterization in the *Melipona* species (Hymenoptera, Meliponini) by RFLP analysis. *Hereditas*. 137 (3), 229-233.

Ferraz, R. E., Lima, P. M., Pereira, D. S., Freitas, C. C. O., Feijó, F. M. C. (2008) Fungi microbiot of *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae). *Neotropical entomology*. 37 (3), 345-346.

Floyd, R., Wilson, J. J., Hebert, P. D. N. (2009) DNA barcodes and insect biodiversity, in: Foottit, R. G., Adler, P. H. (Eds.), *Insect Biodiversity: Science and Society*. Oxford, Blackwell Publishing, pp. 417–431.

Fu, Y. X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 147 (2), 915-25.

Garla, R. C., Chapman, D. D., Wetherbee, B. M., Shivji, M. (2006) Movement patterns of young Caribbean reef sharks, *Carcharhinus perezi*, at Fernando de Noronha Archipelago, Brazil: the potential of marine protected areas for conservation of a nursery ground. *Mar. Biol.* 149, 189–199.

- Hall, T. (2005) BioEdit: Biological Sequence Alignment Editor for Windows 95/98/NT/XP [online] <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit?.html> (acessado em 01 de setembro de 2014)
- Hartl, D., Clark, A. (2010) Princípios de genética de populações. Ed. Artmed.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., DeWaard, J. R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London*. 270 (1512), 313-321.
- Ivar do Sul, J., Spengler, A., Costa, M. F. (2009). Here, there and everywhere. Small plastic fragments and pellets on beaches of Fernando de Noronha (Equatorial Western Atlantic). *Marine Pollution Bulletin*. 58, 1229–1244.
- Kerr, W. E., Cabeda, M. (1985) Introdução de abelhas no território federal de Fernando de Noronha. *Rev. Ciencia e Cultura*, 37 (3), 467-471.
- Kerr, W. E., Nascimento, A. N., Carvalho, A. G. (1994) Há salvação para meliponíneos? *Anais do I Encontro sobre abelhas*. Ribeirão Preto, SP, 61-65.
- Kimura, M. (1980) Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16 (2), 111-120.
- Kino, K., Sugiyama, H. (2001) Possible cause of G-C-->C-G transversion mutation by guanine oxidation product, imidazolone. *Chemistry & Biology*. 8(4), 369-378.
- Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., Tscharntke, T. (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society of London*, DOI: 10.1098/rspb.2006.3721.
- Krol, M. S., Jaeger, A., Bronstert, A., Kryukow, J. (2001) The semi-arid integrated model (SIM), a regional integrated model assessing water availability, vulnerability of ecosystems and society in NE-Brazil. *Phys. Chem. Earth*. 26 (7), 529-533.
- Leal, I. R., Silva, J. M. C., Tabarelli, M., Lacher, T. E. Jr. (2005) Changing the course of biodiversity conservation in the Caatinga of Northeastern Brazil. *Conserv. Biol*. 19, 701–706.

- Leal, I. R., Tabarelli, M., Silva, J. M. C. (2003) *Ecologia e Conservação da Caatinga: uma Introdução ao Desafio*. Ed. Universitária UFPE, Recife.
- Liao, H., Yeh, W., Chiang, D., Jernigan, R. L., Lustig, B. (2005) Protein sequence entropy is closely related to packing density and hydrophobicity. *Protein Engineering, Design & Selection*. 18 (2), 59–64.
- Librado, P., Rozas, J. (2009) DnaSP ver. 5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25,1451-1452.
- Lopes, M. T. R., Silva, J. O., Pereira, F. M., Camargo, R. C. R., Vieira-Neto, J. M., Ribeiro, V. Q. (2007) Atividade de voo de abelhas jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke, 1910) instaladas em dois modelos de colméia. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)*, pp. 20.
- Lowe, A., Harris, S., Ashton, P. (2004) *Ecological Genetics: Design, Analysis and Application*. Blackwells, Oxford.
- McNab, B. K. (1994). Energy conservation and the evolution of flightlessness in Birds. *The American Naturalist*. 144, 628–642.
- Menezes, P. (2006) Criação racional de abelha jandaíra, in: Bruening, H. (Ed.). *Abelha Jandaíra*. Natal, Brasil, pp. 121-135.
- Michener, C. D. (2000) *The Bees of the World*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Michener, C. D. (2007) *The Bees of the World*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Miranda, E. A., Oliveira, P. S., Batalha-Filho, H., Alves, R. M., Campos, L. A. O., Waldschmidt, A. M. (2012) Genetic diversity of *Melipona mandacaia* Smith 1863 (Hymenoptera, Apidae), an endemic bee species from Brazilian Caatinga, using ISSR. *Psyche: A Journal of Entomology* (Cambridge), DOI:10.1155/2012/372138.
- Moure, J. S., Urban, D., Melo, G. A. R. (2007) Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. *Sociedade Brasileira de Entomologia*, Curitiba.
- Nascimento, M. A., Batalha-Filho, H., Waldschmidt, A. M., Tavares, M. G., Campos, L. A. O., Salomão, T. M. F. (2010) Variation and genetic structure of *Melipona*

quadrifasciata Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) populations based on ISSR pattern. *Genetics and Molecular Biology*. 33 (2), 394-397.

National Center for Biotechnology Information (NCBI) [online] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (acessado em 01 de setembro de 2014).

Oliveira, G., Araújo, M. B., Rangel, T. F., Alagador, D., Diniz-Filho, J. A. F. (2012) Conserving the Brazilian semiarid (Caatinga) biome under climate change. *Biodivers. Conserv.* 21, 2913-2926.

Prado, D. (2003) As caatingas da América do Sul, in: Leal, I. R. Tabarelli, M. et al. (Eds.), *Ecologia e conservação da caatinga*. Editora Universitária, UFPE, Recife, Brasil.

Shannon, C. E., Weaver, W. (1949) *The Mathematical Theory of Communication*, Univeristy of Illinois Press.

Sihanuntavong, D., Sittipraneed, S., Klinbunga, S. (1999) Mitochondrial DNA diversity and population structure of the honey bee, *Apis cerana*, in Thailand. *J. Apic. Res.* 38 (3-4), 211-219.

Silva, T. M. S., Santos, F. P., Evangelista-Rodrigues, A., Silva, E. M. S., Silva, G. S., Novais, J. S., Santos, F. A. R., Camara, C. A. (2013) Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *Journal of Food Composition and Analysis*. 29, 10-18.

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

Smith, J. M., Szathmary, E. (1995) *The major transitions in evolution*. Oxford University press.

Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123, 585-595.

Tavares, M. G., Dias, L. A. S., Borges, A. A. (2007) Genetic divergence between populations of the stingless bee uruçú amarela (*Melipona rufiventris* group, Hymenoptera, Meliponini): Is there a new *Melipona* species in the Brazilian state of Minas Gerais?. *Genetics and Molecular Biology*. 30, 667-675.

Vanzolini, P. E., Ramos-Costa, A. M. M., Vitt, L. J. (1980) Répteis das Caatingas. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.

Xia, X., Xie, Z. (2001) DAMBE: Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. Journal of Heredity. 92 (4), 371-373.

Zhao, W., Tan, k., Zhou, D., Wang, M., Cheng, C., Yu, Z., Miao, Y., He, S. (2014) Phylogeographic analysis of *Apis cerana* populations on Hainan Island and southern mainland China, based on mitochondrial DNA sequences. Apidologie. 45, 21-33.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É incontestável a importância da abelha *Melipona subnitida* para o ecossistema da Caatinga, bem como da integridade deste ecossistema para a sobrevivência destas abelhas. Enquanto as abelhas garantem a polinização das plantas, seja as nativas ou exóticas, aumentando a produção agrícola, a caatinga disponibiliza a vegetação, principalmente a imburana (*Commiphora leptophloeos*) e a caatingueira (*Caesalpinia pyramidalis*), preferencialmente utilizadas para a nidificação, bem como plantas específicas para o forrageamento, embora se reconheça a rica diversidade do semiárido nordestino. O grande avanço em que este bioma vem sendo degradado, principalmente devido a ações antrópicas realizadas pelo homem, associado ao pouco conhecimento sobre a estrutura genética destas abelhas poderá levar a extinção das mesmas, mesmo antes de conhecermos tal estruturação. Dentre os parâmetros genéticos populacionais mais importantes, que fornecem as informações para se desenvolver estratégias para a conservação da espécie principalmente aquelas vulneráveis ou ameaçadas de extinção estão à estrutura e dinâmica das populações, o fluxo gênico, as medidas de diversidade genética e o grau de estruturação genética espacial das populações.

Nos últimos anos a utilização dos marcadores moleculares aplicados em estudos de diversidade genética e processos evolucionários vêm sendo cada vez mais utilizado, seja em vegetais ou animais, mostrando não só a situação estrutural da composição genética da população, como também auxiliando programas de conservação e de melhoramento genético sustentável.

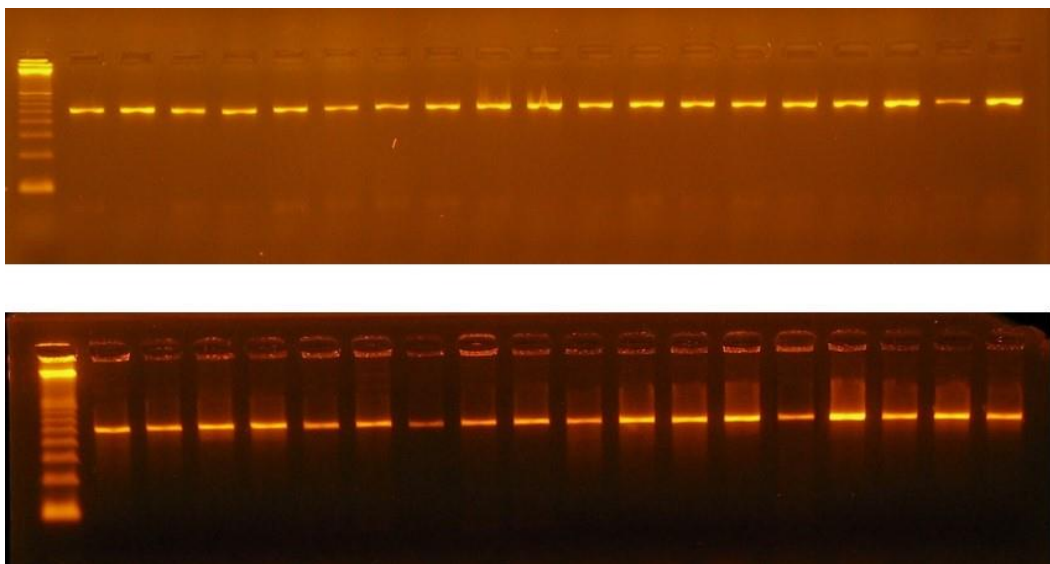
Neste estudo pode-se constatar que a divergência genética encontrada entre as populações dos estados de Bahia, Alagoas e Pernambuco, que representa o

limite sul de distribuição natural, é baixa se mantendo em torno de 17%, e abrigam cinco haplótipos mitocondriais para o gene COI, destes, quatro são haplótipos novos, embora variem por poucos passos mutacionais.

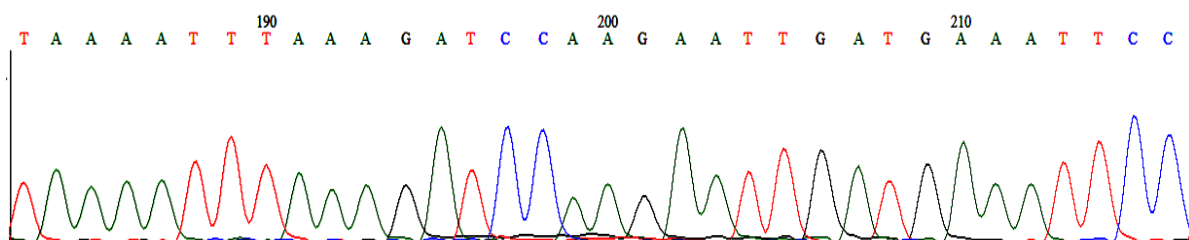
Observou-se ainda baixa diversidade haplotípica e nucleotídica nas populações da ilha de Fernando de Noronha em relação às populações continentais (Bahia, Alagoas, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Maranhão, Piauí e Ceará). Dos 14 haplótipos identificados no continente, apenas um (H4) é compartilhado pelas populações da ilha de Fernando de Noronha. Neste caso os dados sugerem duas hipóteses, a de que apenas um haplótipo possa ter sido transportado para a ilha; ou que a mudança de ambiente favoreceu a fixação de apenas um haplótipo.

Foram identificados três novos haplótipos (H12, H13 e H14), que serão depositados no *GenBank* visando aumento do banco de dados e difundir informações que possam ser usadas para análises genéticas e conservação da espécie.

ANEXOS



ANEXO A. Produtos de amplificação do mtDNA para a região COI utilizando o primer mtD6/mtD9. Gel de agarose 2% e marcador molecular de 100pb.



ANEXO B. Parte do eletroferograma da espécie *Melipona subnitida*. (As cores representam: verde= (A) Adenina; vermelho= (T) Timina; azul= (C) Citosina; preto= (G) Guanina.