

VARIABILIDADE GENÉTICA POPULACIONAL EM *Melipona Seminigra* E *Melipona Interrupta* COM USO DE DNA MICROSSATÉLITES

Ingrid Mayara Sales CAVALCANTE¹; Gislene Almeida Carvalho ZILSE².

¹ Bolsista PIBIC/CNPQ/INPA; ²Orientadora INPA/CBIO

1.Introdução

Estima-se que existam 23000 espécies de abelhas no mundo, a maioria sendo abelhas solitárias que apresentam diferentes comportamentos. Cerca de 5% são sociais e formam a Família Apidae. Estas abelhas vivem em colônias e armazenam mel e pólen para sua alimentação, produtos que são largamente utilizados pelo homem, inclusive na Amazônia. A maioria das espécies de Apidae são comumente denominadas abelhas sem ferrão e separam-se em duas tribos: Meliponini e Trigonini, onde se encontram 52 gêneros com mais de 300 espécies (Kerr *et al.*, 1996).

A maioria das espécies de abelhas sem ferrão brasileiras, também conhecidas como abelhas indígenas, é encontrada na região amazônica (Nogueira – Neto, 1997), sendo o gênero *Melipona* o mais diverso. Suas relações baseiam-se em um sistema de dependência recíproca, onde as plantas fornecem o alimento para as abelhas, principalmente pólen e néctar, e em troca recebem os benefícios da transferência de pólen. Estima-se que as abelhas sem ferrão sejam responsáveis por 40 a 90% da polinização dos ecossistemas que habitam (Kerr *et al.*, 2001).

Tradicionalmente, estas abelhas são criadas pelo homem amazônico numa atividade denominada Meliponicultura, a qual se insere no contexto da Agricultura Familiar provendo mel e pólen como alimentos nutritivos às famílias e, ainda, como renda complementar pela sua venda (Carvalho-Zilse, 2006). A Meliponicultura vem sendo largamente incentivada pelo governo do Estado e, estudos preliminares (Costa-Pinto e Carvalho-Zilse, 2007) indicam possíveis efeitos de homogeneização genética em decorrência do intenso manejo de seleção de colmeias para multiplicação.

Esse intenso manejo resulta na possibilidade e importância de se estudar a variabilidade genética de populações em cativeiro (Meliponários). Para se entender como as populações de abelhas estão estruturadas geneticamente. Cada vez mais estão sendo usados os marcadores de DNA microssatélites (SSR), uma vez que estes marcadores auxiliam no entendimento da dinâmica das populações (Walschmidt, 1999; Francini *et al.*, 2009a,b).

Este trabalho objetivou estimar a variabilidade genética por meio de marcadores microssatélites de populações de *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta*, espécies mais utilizadas na Meliponicultura no Amazonas, mantidas no Meliponário do Grupo de Pesquisas em Abelhas do INPA que foi formado há 10 anos, está constantemente sob manejo e é fonte de coleta de amostras para diversos projetos em desenvolvimento pelos pesquisadores do Grupo.

2.Material e Métodos

Foram coletados 120 indivíduos adultos de 20 colônias, sendo 10 colônias de *Melipona seminigra* e 10 colônias de *M. interrupta* mantidas no Meliponário do Grupo de Pesquisas em Abelhas, com seis indivíduos (operárias) por colônia. As abelhas foram coletadas manualmente com auxílio de um puçá na entrada de ninhos alojados em caixas de criação e levadas ao laboratório de Genética de Abelhas do GPA.

O DNA individual foi extraído conforme protocolo Paxton *et al.* (1999). A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8% corado com gelRed e sua concentração em Nanodrop 2000. O DNA foi amplificado via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com auxílio de *primers* específicos para cinco locos microssatélites. As condições de amplificação e a ciclagem em termociclador seguiram o protocolo de Francini *et al.* (2009a,b). A qualidade dos produtos PCR foi analisada em gel de agarose 1,5%.

Os locos microssatélites foram amplificados via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se *primers* específicos para cinco locos microssatélites de cada espécie desenvolvidos por Francini *et al.* (2009 a,b). Os *primers* específicos para *Melipona seminigra* foram o MSM 03 (~291pb), MSM 08 (~312pb), MSM 09 (205pb), MSM 12 (~272pb), MSM 13 (~235pb). Os *primers* específicos para *Melipona interrupta* foram o MIM 05 (~290pb), MIM 07 (~214pb), MIM 08 (~198pb), MIM 09 (~248pb), MIM 12 (~294pb).

O resultado das amplificações foi analisado em gel de agarose 1,5% corado com gelRed. Por dificuldades na amplificação dos locos não houve tempo hábil para identificação dos alelos e genotipagem dos indivíduos. O trabalho será continuado para construção de uma matriz de dados individual por loco e por espécie, que será analisada com auxílio dos programas estatísticos Arlequin (Schneider *et al.*, 2000), GDA (Lewis & Zaykin, 2002), TFGA (Miller, 1997) e PAUP (Swoford, 1998), utilizando-se os seguintes parâmetros: número de alelos por loco, Equilíbrio de Hardy-Weinberg; heterozigosidade média observada e esperada; desequilíbrio de ligação; estimativas de fluxo gênico entre as colônias.

3. Resultados e Discussão

As amostras de DNA de todas as 20 colônias de *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta* apresentaram bom rendimento de extração e bom padrão integridade (Figura 1) com concentração variando de 18,3 ng / μ L a 28,5 ng / μ L.

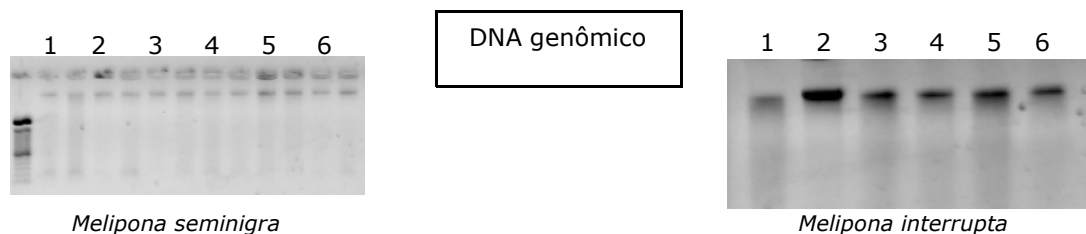


Figura 1. Perfil de DNA genômico extraído pelo protocolo de Paxton em gel de agarose a 0,8% corado com gelRed. 1 a 6: amostras de DNA individual.

A PCR foi feita com todas as amostras de DNA extraídas de *M. seminigra* e *M. interrupta*. Todos os cinco locos microssatélites testados foram amplificados. Porém, a amplificação de algumas amostras não foi bem sucedida (Figura 2).

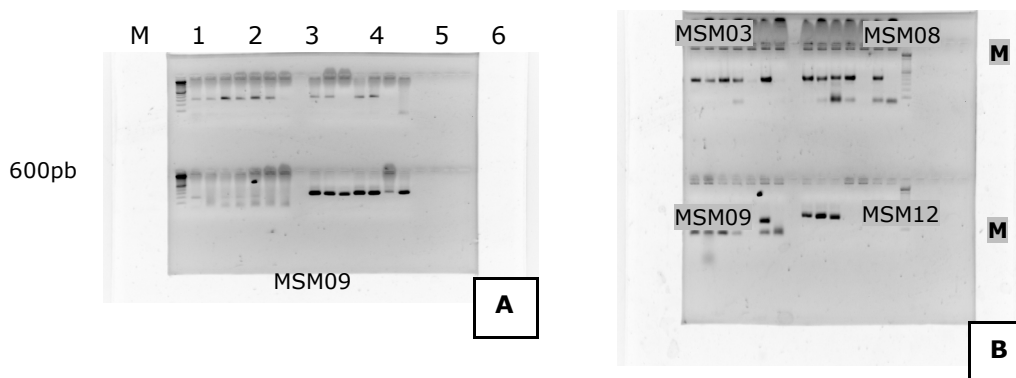


Figura 2. Perfil de amplificação dos locos microssatélites em gel de agarose 1,5% corado com gelRed. Em A: M = marcador ladder 100pb; 1 a 6: produtos da PCR para o loco microssatelite MSM09 de 6 indivíduos de uma mesma colônia de *Melipona seminigra*. Em B: M = marcador ladder 100pb; perfil de amplificação de 6 indivíduos de *M. seminigra* para os locos MSM03, MSM08, MSM09 e MSM12.

De maneira geral, o tamanho dos locos encontrados em *Melipona seminigra* e em *Melipona interrupta* foram maiores que o esperado. O loco MSM03 obteve o maior índice de amplificação positiva (62% de amostras amplificadas) enquanto que o loco MIM09 apresentou o menor índice de amplificação positiva (4,2% de amostras amplificadas).

4. Conclusão

Não foi possível realizar a análise da variabilidade genética em virtude de dificuldades na amplificação dos locos microssatélites e genotipagem dos indivíduos, o que será feito futuramente.

5. Referências Bibliográficas

- Carvalho-Zilse, G.A.; Nunes-Silva, C.G. 2010. Biodiversidade de abelhas amazônicas: a atuação dos Grupos de Pesquisa da região Norte do Brasil. *In: Anais do IX Encontro sobre Abelhas* (Ribeirão Preto – SP): 317-323. CD ROM.
- Carvalho-Zilse, G.A. 2006. Meliponicultura na Amazônia. *In: Anais do VII Encontro sobre Abelhas* (Ribeirão Preto – SP). CD ROM.
- Carvalho-Zilse, GA; Costa-Pinto, MFF. 2007. Comparação da variabilidade genética entre colméias naturais e manejadas da abelha sem ferrão *Melipona compressipes* no Estado do Amazonas. *In: Resumos do 53º Congresso Brasileiro de Genética*. CD ROM.
- Francini, I. B.; Sforça, D. A.; Sousa, A. C. B.; Campos, T.; Cidade, F. W.; Zucchi, M. I.; Souza, A. P.; Nunes-Silva, C. G.; Carvalho-Zilse, G. A. 2009. Microsatellite loci for an endemic stingless bee *Melipona seminigra merrillae* (Apidae, Meliponini) from Amazon. *Conservation Genetics Resources*, v. 1, p. 487-490.
- Kerr, W.E.; Carvalho, G.A.; Silva, A.C.; Assis, M.G.P. 2001. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade da amazônica. *Parcerias estratégicas*, 12:20 – 41.

- Kerr, W. E.; Carvalho, G.A.; Nascimento, Vania Alves. 1996. *Abelha Uruçu Biologia, Manejo e Conservação*. Coleção Manejo da vida silvestre n°2. Fundação Acangaú. 144p.
- Lewis, P.O.; Zaykin, D. 2002. GDA – Genetic Data Analysis: version 1.1 for Windows 95/NT. <http://www.lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/>.
- Miller, M.P. 1997. *TFFGA – Tools for populations genetics analyses*. V 1.3 A Window program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.
- Nogueira- Neto, P.1997. *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. Editora Nogueirapis. 445p.
- Paxton, R. J; Weißschuh, N.; Engels, W.; Hartfelder, K.; Quezada-Euán, J. J. G. 1999. Not only single mating in stingless bees. *Naturwissenschaften*, 86:143-146.
- Souza, M.T. 2010. *Identificação molecular de abelhas sem ferrão da Amazônia*. Dissertação de Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, INPA. 55p.
- Schneider, S.; Roessli, D. and Excoffier, L. 2000. *Arlequin ver. 2000: A software for population genetic data analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva. Geneva, Switzerland.
- Swofford, D.L. 1998. *PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0d65*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Waldschmidt, A.M. 1999. *Análises genéticas e morfológicas de populações de Melipona quadrifasciata Lep. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae)*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, MG. 59p.