

MARCÍLIA APARECIDA DO NASCIMENTO

**ESTUDOS MOLECULARES E MORFOLÓGICO EM ABELHAS DO
GÊNERO *MELIPONA* (HYMENOPTERA)**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

N244e
2012

Nascimento, Marcília Aparecida do, 1971-
Estudos moleculares e morfológico em abelhas do gênero
Melipona (Hymenoptera) / Marcília Aparecida do
Nascimento. – Viçosa, MG, 2012.
viii, 55f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Tânia Maria Fernandes Salomão.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Melipona*. 2. Inseto - Órgãos sensoriais. 3. Abelha sem
ferrão - Genética. 4. *Melipona scutellaris* - Biologia
molecular. 5. Polimorfismo (Genética). 6. Abelha -
Morfologia. 7. Sensilos. 8. Reação em cadeia de polimerase.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 595.779

MARCÍLIA APARECIDA DO NASCIMENTO

ESTUDOS MOLECULARES E MORFOLÓGICO EM ABELHAS DO GÊNERO
MELIPONA (HYMENOPTERA)

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

APROVADA: 05 de abril de 2012.

Dihego de Oliveira Azevedo

Mara Garcia Tavares

Marco Antonio Costa

Rosenilson Pinto

Tânia Maria Fernandes Salomão
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e proteção

Ao Departamento de Biologia Geral e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa.

À Secretaria de Estado de Educação de Mato Grosso - SEDUC/MT pela concessão da licença remunerada para a minha qualificação profissional.

À Comissão de licença para a qualificação profissional - SEDUC/MT pelo parecer favorável à minha qualificação profissional.

À minha orientadora, professora Tânia Maria Fernandes Salomão, por todos os ensinamentos.

Aos meus co-orientadores, professora Denilce Meneses Lopes e professor Gustavo Ferreira Martins pela colaboração no presente trabalho.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pelos ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora, professores Mara Garcia Tavares e Marco Antonio Costa e pesquisadores Dihego de Oliveira Azevedo e Rosenilson Pinto, pelas valiosas contribuições para este trabalho.

Ao pessoal da coleta das abelhas.

A Denise e ao Tales pela colaboração nas análises estatísticas.

Aos meus familiares pelo incentivo.

Ao Dalton, por compartilhar dos meus momentos felizes e também dos momentos difíceis.

A todos os meus amigos do laboratório pela boa convivência.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

BIOGRAFIA

Marcília Aparecida do Nascimento, filha de Antonio Lopes do Nascimento e Tereza Bernardes do Nascimento, nasceu em 10 de março de 1971, na cidade de Terra Roxa – PR. Concluiu seus estudos de primeiro e segundo graus no ano de 1989 na modalidade supletivo pelo projeto Logos II, com habilitação em magistério. Em 1990 ingressou como docente no ensino público do estado de Mato Grosso no qual mantém vínculo até o presente momento. Em 1994, ingressou-se na Universidade do Estado de Mato Grosso e graduou-se em licenciatura no curso de Ciências Biológicas em agosto de 1998. No período de 1999 a 2000, cursou especialização *Lato Sensu* em Biologia na Universidade Federal de Lavras – MG. Em fevereiro de 2006, sob orientação da Professora Tânia Maria Fernandes Salomão, iniciou o curso de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em 14 de fevereiro de 2008,. Nesse mesmo ano e sob a orientação orientadora supracitada, ingressou no curso de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural, na Universidade Federal de Viçosa, onde concluiu o curso defendendo a tese em 05 de abril de 2012.

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
Introdução Geral.....	1
Referências Bibliográficas.....	7
Capítulo 1: Estrutura genética de populações de <i>Melipona scutellaris</i>	
Latreille 1811 (Hymenoptera: Apidae) de diferentes altitudes.....	13
Resumo.....	13
Introdução.....	15
Material e Métodos.....	17
Resultados e Discussão.....	21
Referências Bibliográficas.....	28
Capítulo 2: Estudo comparativo das sensilas antenais de operárias de	
<i>Melipona scutellaris</i> (Hymenoptera: Apidae) de diferentes altitudes.....	31
Resumo.....	31
Abstract.....	32
Introdução.....	33
Material e Métodos.....	35
Resultados.....	36
Discussão.....	39
Referências Bibliográficas.....	43
Capítulo 3: Imunolocalização da proteína heterocromatina 1 em abelhas	
do gênero <i>Melipona</i> com alto ou baixo conteúdo de heterocromatina.....	46
Resumo.....	46
Introdução.....	47
Material e Métodos.....	49
Resultados e Discussão.....	51
Referências Bibliográficas.....	53
Conclusões Gerais.....	55

RESUMO

NASCIMENTO, Marcília Aparecida do, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2012. **Estudos moleculares e morfológico em abelhas do gênero *Melipona* (Hymenoptera)**. Orientador: Tania Maria Fernandes Salomão. Coorientadores: Denilce Meneses Lopes e Gustavo Ferreira Martins.

O gênero *Melipona* é representado por 65 espécies reconhecidas de abelhas “sem ferrão” distribuídas nas regiões neotropical. Dentre estas espécies encontra-se *M. scutellaris*, abelha nativa, típica de regiões com clima e altitude diferentes do nordeste brasileiro, sendo, no estado da Bahia, encontrada em altitudes entre 36 e 1200 metros. Um dos objetivos deste estudo foi avaliar o efeito da altitude na diversidade genética e morfológica de populações de *M. scutellaris* coletadas em diferentes altitudes de regiões de Mata Atlântica e Caatinga do estado da Bahia. Este trabalho objetivou, também, investigar se a proteína heterocromatina 1 (HP1) é expressa no gênero *Melipona*. A diversidade genética foi estimada com base em haplótipos mitocondriais obtidos por PCR-RFLP da região COI/COII do DNA mitocondrial de 29 operárias amostradas nas localidades de Camaçari, Mundo Novo e Morro do Chapéu. Foi obtida uma composição haplotípica com 12 haplótipos. Haplótipos exclusivos e alta estruturação genética foram observados quando as três populações foram avaliadas. O dendrograma UPGMA mostrou a divisão das populações em dois grupos principais. A topologia do dendrograma mostra, maior diferenciação genética entre a população de Camaçari e as populações do Mundo Novo e Morro do Chapéu e uma estreita relação genética entre as populações do Mundo Novo e do Morro do Chapéu. Dados genéticos complementares poderão ser obtidos por avaliação de populações de *M. scutellaris* não analisadas, o que poderá permitir uma caracterização genética mais precisa deste grupo de abelhas. Utilizando microscopia eletrônica de varredura, sensilas antenais do tipo tricóides foram avaliadas nos três flagelômeros (F) mais distais (F8, F9 e F10) de antenas de *M. Scutellaris* amostrada em localidades com altitudes de 200 m (Grupo 1) e acima de 900 m (Grupo 2). Sensilas de extremidade curva e de extremidade reta foram observadas nos dois grupos, no entanto, as sensilas de extremidade reta foram detectadas em maior número nas abelhas coletadas a 200 m e as de extremidade curva nas abelhas de altitude mais elevada (acima de 900 m). A comparação do

número de sensilas de extremidade reta entre os flagelômeros das abelhas dos dois grupos resultou em diferença significativa para os três flagelômeros. No entanto, para sensila de extremidade curva, a diferença foi significativa apenas quando as sensilas do flagelômero F9 foram comparadas. Estes resultados poderão, no futuro, contribuir, para a compreensão das relações entre *M. scutellaris* e o ambiente em função da altitude. Uma das características do gênero *Melipona* é a variação no conteúdo de heterocromatina (alto e baixo conteúdo) entre as espécies. Para investigar uma possível relação entre a proteína Heterocromatina 1 (HP1) e o conteúdo de heterocromatina deste gênero, duas espécies de *Melipona*, *M. mondury* (alto conteúdo) e *M. quadrifasciata* (baixo conteúdo) foram avaliadas com base em ensaio de imunolocalização e análise de *Western Blot*. O resultado obtido mostrou que a proteína HP1 é expressa nas duas espécies analisadas. A presença de três marcações de imunolocalização para HP1 para cada espécie sugere a detecção de possíveis isoformas de HP1. A marcação mais intensa de uma das possíveis isoformas de *M. mondury* sugere maior expressão da mesma nesta espécie. Ao contrário de *M. quadrifasciata*, *M. mondury* possui alto conteúdo de heterocromatina e análises posteriores poderão, no futuro, contribuir para verificar se existe relação com a isoforma mais expressa (marcação mais intensa) e o conteúdo de heterocromatina de *M. mondury*.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Marcília Aparecida do, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2012. **Molecular and morphological studies in bees of the genus *Melipona* (Hymenoptera)**. Advisor: Tania Maria Fernandes Salomão. Co-advisors: Denilce Meneses Lopes and Gustavo Ferreira Martins.

The genus *Melipona* is represented by 65 known species of “stingless” bees distributed in the neotropical regions. Among these species we can find the *M. scutellaris*, native bee, typical of regions with climate and different altitude from the Brazilian northeast. In the state of Bahia it is found in altitudes of 36 and 1200 meters. One of the purposes of this study was to evaluate the effect of the altitude in the genetic and morphological diversity of populations of *M. scutellaris* collected in different altitudes of regions of Atlantic Forest and “Caatinga” in the state of Bahia. This paper also had as a purpose to investigate whether the protein heterocromatin 1 (HP1) is expressed in the genus *Melipona*. The genetic diversity was estimated based on mitochondrial haplotypes obtained by PCR-RFLP of the region COI/COII of the mitochondrial DNA of 29 workers sampled in the municipalities of Camaçari, Mundo Novo and Morro do Chapéu. A haplotypical composition with 12 haplotypes was obtained. Exclusive haplotypes and high genetic organization were observed when the three populations were evaluated. The UPGMA dendrogram showed the division of the populations into two main groups. The dendrogram topology shows greater genetical differentiation among the population of Camaçari and the populations of Mundo Novo and Morro do Chapéu and a close genetic relationship among the populations of Mundo Novo and Morro do Chapéu. Complementary genetic data may be obtained by evaluation of populations of *M. scutellaris* not analyzed, which may allow a more precise genetic characterization of this group of bees. Using scanning electronic microscopy, antennal sensillas of the type trichoid were evaluated in the three most distal (F8, F9 e F10) flagellomers (F) of antennas of *M. Scutellaris* sampled in the locations with altitudes of 200 m (Group 1) and above 900 m (Group 2). Sensillas of curved end and of straight edge were observed in both groups; however, the sensillas of straight edge were detected in higher number in the bees collected at 200 m and of curved end in the bees of more elevated altitude (above 900m). The comparison of the number of sensillas of straight edge

among the flagellomers of the bees from both groups resulted in significant difference for the three flagellomers. However, for the sensilla of curved end, the difference was significant only when the sensillas of flagellomer F9 were compared. These results may contribute in the future for the understanding of the relationships between *M. scutellaris* and the environment regarding altitude. One of the characteristics of the genus *Melipona* is the variation in the content of heterocromatin (high and low content) among the species. In order to investigate a possible relationship between the protein Heterocromatin 1 (HP1) and the content of heterocromatin of this genus, two species of *Melipona*, *M. mondury* (high content) and *M. quadrifasciata* (low content) were evaluated based on the assay of immunolocalization and *Western Blotting* analysis. The obtained result showed that protein HP1 is expressed in both analyzed species. The presence of three immunolocalization stains for HP1 for each species suggests the detection of possible isoforms of HP1. The most intense stain of one of the possible isoforms of *M. mondury* suggests a greater expression of the protein in this species. Contrary to *M. quadrifasciata*, *M. mondury* has high content of heterocromatin and further analyses may contribute in the future to verify whether there is a relationship with the most expressed isoform (most intense stain) and the content of heterocromatin of *M. mondury*.

INTRODUÇÃO GERAL

As abelhas são, do ponto de vista ecológico, insetos muito importantes nos diversos ecossistemas da terra pela sua indispensável atividade polinizadora para a perpetuação de espécies silvestres. Como parte integrante da biodiversidade mundial, a elas é, também, atribuída grande importância econômica devido, à produção de própolis e mel.

A conservação, o manejo e a recuperação de populações degradadas de abelhas envolve não só fatores demográficos e ecológicos, mas também a genética de populações. Dados de caracterização da estrutura genética e do tamanho efetivo populacional são utilizados para inferir, por exemplo, sobre os efeitos da intervenção antrópica (NASON & HAMRICK, 1997).

Dentre as abelhas eussociais o grupo Meliponini é o mais diverso (SAKAGAMI, 1982) apresentando, espécies com variações quanto a aspectos comportamentais, sistema de comunicação, estratégias de forrageamento, densidades populacionais e arquiteturas de ninhos (MICHENER, 1974).

Com uma distribuição pantropical, a tribo Meliponini possui espécies com ocorrência na região Neotropical (MICHENER, 2000). No Brasil, essa tribo é amplamente distribuída em todo o país e está representada, por mais de 300 espécies descritas (CAMARGO & PEDRO, 2007). Essas abelhas apresentam uma grande capacidade de adaptação a condições ambientais diversas. As fêmeas apresentam um ferrão vestigial e são conhecidas como “abelhas sem ferrão” (MICHENER, 2000).

Nos meliponíneos, encontra-se o gênero *Melipona* com aproximadamente 68 espécies na região Neotropical (CAMARGO & PEDRO, 2007). No Brasil, muitas dessas espécies apresentam atividade polinizadora de 30% a 80% das árvores nativas (KERR *et al.*, 2001; MICHENER, 2007).

Melipona scutellaris, tem se destacado pela facilidade de domesticação, produção de mel e eficiência no processo de polinização de plantas nativas com 40% a 90% (SOUZA *et al.*, 1998). No nordeste brasileiro, a apicultura fornece um complemento de renda para diversas famílias (CARVALHO-ZILSE *et al.*, 2009) sendo *M. scutellaris* considerada uma alternativa como atividade sustentável em áreas rurais (DRUMOND, 2004).

Melipona scutellaris era encontrada desde a Amazônia até o estado da Bahia (CARVALHO, 2000), porém, atualmente sua distribuição encontra-se restrita a uma área que abrange o estado da Bahia até o Rio Grande do Norte (CAMARGO & PEDRO, 2007) com ocupação, principalmente, na área da Zona da Mata. Fatores como a perda de habitats, destruição de ninhos por caçadores de mel, a pulverização de inseticidas e outros agroquímicos têm contribuído para redução das populações desta espécie (CARVALHO-ZILSE *et al.*, 2009). A redução dessas populações poderá, conseqüentemente, acarretar a perda de espécies de plantas que dependem das visitas destas abelhas para ocorrer a polinização.

Conforme HOY (1994), a análise do DNA mitocondrial (mtDNA) tornou-se uma ferramenta importante para compreender os mecanismos subjacentes à dinâmica populacional de insetos incluindo as abelhas. O mtDNA possui características que permitem a sua utilização em estudos evolutivos, como, por exemplo, a herança materna e taxa evolutiva rápida, sendo, este último, em parte devido à uma provável deficiência no sistema de reparo de mutações na molécula (AVISE, 1994). Estas características estão dentre aquelas que tornam mtDNA uma ferramenta muito útil para a diferenciação de espécies em grupos de difícil identificação morfológica. Além disso, os genes mitocondriais que podem ser isolados, amplificados e sequenciados, mesmo em amostras degradadas, são muito utilizados em estudos com diferentes organismos, incluindo insetos (ZINK & BARROWCLOUGH, 2008).

Em estudos com insetos, o gene codificador da proteína citocromo oxidase II (COII) do mtDNA é um dos mais utilizados (SIMON *et al.*, 1994). Por outro lado, o gene que codifica para citocromo oxidase I (COI), gene mais conservado que COII em termos de evolução de aminoácidos tem sido preferencialmente utilizado para estudos de DNA barcoding (código de barras de DNA) visando a diferenciação e identificação de espécies de diferentes grupos taxonômicos (RATNASINGHAM & HERBERT, 2007). No entanto, o uso combinado dos genes citocromo oxidase I e II mostrou ser útil em estudos evolutivos a nível específico em vários insetos (SIMON *et al.*, 1994).

Uma das metodologias empregadas em estudos com insetos, incluindo as abelhas, utilizando como alvo os genes que codificam para COI e COII é a PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms*).

Esta técnica se baseia na amplificação de DNA via PCR e obtenção de polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição, utilizando enzimas de restrição.

Embora a técnica de PCR-RFLP da região COI/COII tenha sido utilizada em alguns estudos com diferentes espécies de *Melipona* (ex., TORRES *et al.*, 2009; MORESCO, 2009) o único estudo envolvendo regiões do mtDNA de *M. scutellaris* é o relatado por FERNANDES-SALOMÃO *et al.*, (2002). Estes autores estudaram 16 espécies de *Melipona* com base na detecção de polimorfismo de restrição na região COI/COII do mtDNA e na região ITS-1 do rDNA. Embora tenha sido detectado alto nível de variabilidade genética interespecífica, *M. scutellaris* compartilhou o mesmo perfil eletroforético com as espécies *M. capixaba*, e *M. subnitida*.

Vários aspectos da biologia de *M. scutellaris* foram descritos por meio de estudos de seus caracteres morfológicos e morfométricos. Em estudo realizado por PINTO (2004), demonstrou que as abelhas dessa espécie coletadas próximas ao nível do mar apresentavam abdômen relativamente grande e escuro, e a medida que aumentava a altitude, o tamanho do abdômen diminuía gradativamente e as abelhas apresentavam coloração mais clara e maior pilosidade no tórax. NUNES *et al.*, (2007) com base em morfometria de asas, distribuíram *M. scutellaris* em três grupos distintos conforme a altitude, sendo o primeiro grupo composto por abelhas localizadas a 1100 m, o segundo entre 0 e 560 m e o terceiro entre 600 e 964 m.

Uma das características de *M. scutellaris* é a capacidade de habitar regiões de clima e altitudes diferentes. Considerando que fatores abióticos como umidade, temperatura e concentração de oxigênio e fatores bióticos como qualidade e quantidade de recursos florais associados à presença/ausência de competidores e predadores variam de acordo com a altitude, a caracterização de estruturas sensoriais pode ser utilizada como uma ferramenta para ampliar os conhecimentos a cerca de *M. scutellaris* frente às variações de clima e altitude em que se encontram essa espécie.

Estruturas sensoriais estão presentes em diferentes partes do corpo de insetos sendo importantes para a percepção do meio em que vivem. Ao longo da superfície das antenas, por exemplo, são encontrados vários tipos de sensilas, envolvidas na comunicação e comportamento de insetos, sendo classificadas considerando a forma e tamanho das mesmas (ROCHA *et al.*, 2007; SPAETHE *et al.*, 2007; ONAGBOLA *et al.*,

2008). Em abelhas, as sensilas antenais são classificadas como tricóidea, basicônica, celocônica, campaniforme, placóidea e ampulácea (CRUZ-LANDIM, 2009).

Cada tipo de sensila desempenha uma ou mais funções. As sensilas placóides estão relacionadas ao olfato (OCHIENG *et al.*, 2000); as basicônicas, à quimiorrecepção (MARTINI & SCHMIDT, 1984); as ampuláceas atuam como receptores de CO₂ (KLEINEIDAM & TAUTZ, 1996); as celocônicas são normalmente órgãos higrorreceptorres (REBORA *et al.*, 2007); as campaniformes apresentam função termorreceptora, higrorreceptora e de percepção na concentração de CO₂ (MUST *et al.*, 2006) e as sensilas tricóides apresentam função quimio e mecanorreceptora (CRUZ-LANDIM, 2009).

Estudos com abelhas mostram a eficiência destes órgãos sensoriais na percepção do inseto com o meio. Ao estudar operárias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) africanas e européias, as quais possuem hábitos higiênicos e não higiênicos, respectivamente, GRAMACHO *et al.*, (2003) observaram que aquelas que apresentavam maior quantidade de sensilas placóideas nos antenômeros da extremidade da antenas possuíam melhor desempenho em reconhecer e remover, das colônias, pupas doentes ou feridas. Em *Bombus terrestris*(Hymenoptera: Apidae), os indivíduos com maior quantidade de sensilas olfatórias exibiram melhor capacidade de reposta a odores dentro de uma mesma colônia do que os indivíduos com antenas pequenas e com menor densidade (SPAETHE *et al.*, 2007).

Assim como os estudos moleculares e morfológicos, os estudos citogenéticos em meliponíneos tem se destacado como ferramenta útil para inferências filogenéticas, taxonomia e estimativa de diversidade genética. O primeiro trabalho relacionado a estudos citogenéticos em Meliponini foi realizado por KERR (1948) e, posteriormente, 27 gêneros foram citogeneticamente reconhecidos (ROCHA *et al.*, 2003).

As abelhas da tribo Meliponini apresentam um padrão de distribuição de heterocromatina muito semelhante entre as espécies, sendo observado, na maioria das espécies, um braço cromossômico heterocromático e um eucromático. Esses dados coincidem com a explicação da evolução cromossômica desta tribo, pela Teoria da Interação Mínima proposta por IMAI (1991). Porém, um padrão diferente foi observado no gênero *Melipona* por possuírem espécies com baixo (Grupo 1) e espécies com alto conteúdo (Grupo 2) de heterocromatina (ROCHA & POMPOLO

(1998). No primeiro grupo a heterocromatina apresentou uma distribuição pericentromérica ou no braço curto dos acrocêntricos. Já no segundo, o percentual de heterocromatina atingiu valores superiores a 50% e encontra-se distribuída por quase toda extensão do cromossomo (ROCHA & POMPOLO 1998).

Considerando que as “abelhas sem ferrão” são pouco caracterizadas citogeneticamente, o padrão de distribuição de heterocromatina bem como as características associadas a ela, tais como composição e proteínas associadas podem contribuir para o entendimento da evolução cariotípica do grupo (LOPES *et al.*, 2011).

Desde a descoberta da heterocromatina, a qual parece desempenhar importantes funções como, por exemplo, organização dos cromossomos no núcleo celular e comportamento dos cromossomos durante a mitose, muito se discute a respeito deste nível de organização da cromatina. No entanto, não existe um consenso acerca de sua real função, podendo sua composição e localização estar relacionadas aos eventos que levaram à evolução cariotípica do grupo.

Algumas proteínas estão especificamente associados à heterocromatina, (EISSENBURG & ELGIN, 2000; SINGH & GEORGATOS, 2002) como, por exemplo, a família de proteínas conhecida como proteína heterocromatina 1 (HP1) e identificada pela primeira vez em *Drosophila* (EISSENBURG *et al.*, 1990). Localizada predominantemente em regiões heterocromáticas, as proteínas desta família estão envolvidas no estabelecimento e manutenção da cromatina podendo, também, estar envolvidas em mecanismos de regulação da expressão gênica como o silenciamento de genes (MOTAMEDI *et al.*, 2008).

A família de proteínas HP1 é um elemento necessário para heterocromatinização facultativa. BONGIORGI *et al.*, (2001) demonstraram a atuação desta proteína no processo de heterocromatinização do conjunto cromossômico paterno de *Planococcus citri* (Homoptera: Coccoidae). De acordo com estes autores, a cromatina de machos nessa espécie adquire todas as características citológicas de heterocromatina após sua associação a proteína HP1.

Os conhecimentos genéticos podem ser úteis para gerenciar, com sucesso, colônias de “abelhas sem ferrão” visando a produção de mel e polinização bem como para estabelecer estratégias de conservação. As metas do presente estudo foram avaliar o efeito da altitude na diversidade genética e morfológica de populações de

M. scutellaris coletada em regiões de diferentes altitudes; investigar a presença da família de proteína HP1 em extrato protéico de duas espécies meliponíneos. Considerando à ausência de relatos desta proteína na heterocromatina de abelhas em geral, o presente estudo vem contribuir com dados preliminares que poderão ser úteis para a compreensão da organização da cromatina no gênero *Melipona* que possui espécies com alto ou baixo conteúdo de heterocromatina.

Verificar com base em marcador molecular se a altitude influencia a estrutura genética de *Melipona scutellaris*; avaliar possível variação nos tipos, distribuição e na quantidade de sensilas tricóides das extremidades antenais de dois grupos de *M. scutellaris* em diferentes altitudes e investigar a presença da HP1 em abelhas do gênero *Melipona* com alto ou baixo conteúdo de heterocromatina foram os objetivos deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVISE, J. C. (1994). Molecular markers, natural history, and evolution. New York, NY: Chapman and Hall.

BONGIORNI, S.; MAZZUOLI, M.; MASCI, S. & PRANTERA, G. (2001). Facultative heterochromatinization in parahaploid male mealybugs: involvement of a heterochromatin-associated protein. *Development*. 128: 3809-3817.

CAMARGO, J. M. F. & PEDRO, S. R. M. (2007) Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. Melo, G. A. R. (Orgs) Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region, Curitiba, Brazil, 1058p.

CARVALHO, G. A. (2000). Contribuição à reprodução da *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) e suas consequências. 109p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Genética) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

CARVALHO-ZILSE, G. A.; COSTA-PINTO, M. F. F.; NUNES-SILVA, C. G. & KERR, W. E. (2009). Does beekeeping reduce genetic variability in *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini)? *Genetics and Molecular Research*, 8 (2): 758-765.

CRUZ-LANDIM, C. (2009). Abelhas: Morfologia e função de sistemas. São Paulo. 408p.

DRUMOND, P. (2004). Abelhas indígenas sem ferrão. Embrapa/CPAFAC: Acre, (2004). Available at [<http://www.cpaFac.embrapa.br/chefias/cna/artigos/abelhas.htm>]. Accessed september 10, 2011.

EISSENBURG, J. C. & ELGIN, S. C. (2000) The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Current Opinion in Genetics & Development*. 10: 204–210.

EISSENBERG, J. C.; JAMES, T. C.; FOSTER-HARTNETT, D. M.; HARTNETT, T.; NGAN, V. & ELGIN, S.C (1990). Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 87: 9923-9927.

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: 229-233.

GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S.; SRTORT, A. C. & NORONHA, A. B. (2003). Is the number of antennal plate organs (sensilla placodea) greater in hygienic than in no-hygienic Africanized honey bees? Genetics And Molecular Research 3: 309-316.

HOY, M. A. (1994). Insect Molecular Genetics: an Introduction to Principles and Applications. Academic Press, San Diego.

IMAI, H. T. (1991). Mutability of constitutive heterochromatin (c-bands) during eukaryotic chromosomal evolution and their cytological meaning. Japanese Journal of Genetics 66: 635-661.

KERR, W. E. (1948). Estudos sobre o gênero *Melipona*. Anais da Escola Superior Luiz de Queiroz. 5: 182-276.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; SILVA, A. C. & ASSIS, M. G. P. (2001). Aspectos poucos mencionados da biodiversidade Amazônica. Parceria e Estratégias. 12(2): 20-41.

KLEINEIDAM, C. & TAUTZ, J. (1996). Perception of Carbon Dioxide and other "air-condition" P parameters in the leaf cutting ant *Atta cephalotes*. Naturwissenschaften 83: 566-568.

LOPES, D. M.; FERNANDES, A.; PRACA-FONTES, M. M.; WERNECK, H. A.; RESENDE, H. C & CAMPOS, L. A. O. (2011). Cytogenetics of Three *Melipona* Species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Sociobiology*. 57 (2): 1-10.

MARTINI, R. & SCHMIDT, K. (1984). Ultrastructure and early development of the pore plate sensilla of the *Gymnomerus laevipes* (Shuckard) (Vespoidea, Eumenidade). *Protoplasma* 119, 197-211.

MICHENER, C. D. (2000). The bees of the world. London: The Johns Hopkins University Press, 913p.

MICHENER, C. D. (2007) The Bees of the World. Second edition. London. The Johns Hopkins. University Press, 953 p.

MICHENER, C. D. (1974). The Social Behavior of the Bees. Harvard University, Press, Cambridge, Massachusetts.

MOTAMEDI, M. R.; HONG, E. EUN-JIN.; LI, X.; GERBER, S.; DENISON C.; G. STEVEN. & MOAZED, D. (2008). HP1 Proteins Form Distinct Complexes and Mediate Heterochromatic Gene Silencing by Nonoverlapping Mechanisms. *Molecular Cell*. 32: 778–790.

MORESCO, A. R. C. (2009). Análise Populacional de *Melipona marginata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de RFLP do DNA mitocondrial e microssatélites. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 81p.

MUST, A.; MERIVEE, E.; MAND, M.; LUIK, A. & HEIDEMAA M. (2006). Electrophysiological responses of the antennal campaniform sensilla to rapid changes of temperature in the ground beetles *Pterostichus oblongopunctatus* and *Poecilus cupreus* (Tribe Pterostichini) with different ecological preferences. *Physiological Entomology* 31:278-285.

NASON, J. D. & HAMRICK, J. L. (1997). Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of neotropical canopy trees. *Journal Heredity*, 88: 264-276.

NUNES, L. A.; PINTO, M. F. F. C.; CARNEIRO, P.; PEREIRA, D. G. & WALDSCHMIDT, A. M. (2007). Divergência genética em *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera: Apidae) com base em caracteres morfológicos. *Bioscience Journal*, 23 (1):1-9.

OCHIENG, S. A.; PARK, K. C.; ZHU, J. W. & BAKER, T. C. (2000). Functional morphology of antennal chemoreceptors of the parasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Arthropod Structure and Development* 29(3):232-240.

ONAGBOLA, E .O.; MEYER, W .L.; BOINA, D. R. & STELINSKI, L. L. (2008). Morphological characterization of the antennal sensilla of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), with reference to their probable functions. *Micron*, 39: 1184-1191.

PINTO, M. F. F.C. (2004). Estudo da divergência genética em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Meliponini) no estado da Bahia. Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

RATNASINGHAM, S. & HEBERT, P. D. N. (2007). Bold: The barcode of life data system (www.barcodinglife.org) *Molecular Ecology Notes*, 7: 355-365.

REBORA, M.; PIERSANTI, S.; ALMAAS, T. J. & GAINO, E. (2007). Hygroreceptors in the larva of *Libellula depressa* (Odonata: Libellulidae). *Journal of Insect Physiology* 53:550–558.

ROCHA, L.; MOREIRA, G. R. P. & REDAELLI, L. R. (2007). Systematics morphology and distribution of antenal sensilla of *Gryon gallardoi* (Brethes) (Hymenoptera: Scelionidae) females. *Neotropical Entomology*. 36: 721-728.

ROCHA, M. P. & POMPOLO, S. G. (1998). Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genetics and Molecular Biology*. 2 (1): 41-45.

ROCHA, M. P.; POMPOLO, S. G. & CAMPOS, L. A. O. (2003). Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). *Apoidea Neotropica. Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure*. 311-320.

SAKAGAMI, S. F. (1982). Stingless bees. In: *Social Insects*. Academic Press, London. pp 361-423.

SIMON, C., F.; RATI, 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.

SINGH P. B. & GEORGATOS, S.D. (2002): HP1: facts, open questions, and speculation. *Journal of Structure Biology*. 140: 10-16.

SOUZA, B. A.; CARVALHO, C. A. L.; SODRÉ, G. S. & MARCHINI, L. C. (1998). Características físico-químicas de amostras de méis de abelha. *Anais do XII Congresso Brasileiro de Apicultura, Salvador, Brasil*, p.201.

SPAETHE, J.; BROCKMANN, A. ; HALBIG, C. & TAUTZ, J. (2007). Size determines antennal sensitivity and behavioral threshold to odors in bumblebee workers. *Naturwissenschaften*. 97:733-739.

TORRES, R. R.; ARIAS, M. C. & MORETTO, G. (2009). Mitochondrial DNA Polymorphism among Populations of *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* Lepeletier (Apidae: Meliponini) from Southern Brazil. *Neotropical Entomology* 38(2):208-212.

ZINK, R. M. & BARROWCLOUGH, G. F. (2008). Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular ecology*, 17: 2107-2121.

Capítulo 1

Estrutura genética de populações de *Melipona scutellaris* Latreille 1811 (Hymenoptera: Apidae) de diferentes altitudes

RESUMO: A diversidade genética de três populações de *Melipona scutellaris* amostradas no estado da Bahia e em localidades de altitudes diferentes foi estimada e a estrutura genética avaliada. Um total de 29 operárias de três localidades (Camaçari, Mundo Novo e Morro do Chapéu) foi analisado utilizando a técnica de PCR-RFLP e a região COI/COII do DNA mitocondrial. A região COI/COII foi amplificada e os produtos PCR digeridos com quatro enzimas de restrição. Com base nos padrões de restrição obtidos, doze haplótipos mitocondriais foram identificados sendo três deles exclusivos das amostras de Camaçari, três exclusivos das amostras de Mundo Novo, cinco nas amostras do Mundo Novo e um dos haplótipos é compartilhado entre as amostras do Morro do Chapéu e Mundo Novo. O agrupamento UPGMA mostra a formação de dois grupos principais. Os haplótipos detectados nas amostras de Camaçari foram incluídos em um único grupo e os demais foram distribuídos em dois subgrupos. Um dos subgrupos incluiu dois haplótipos detectados nas amostras do Morro do Chapéu e o outro por haplótipos identificados nas amostras das duas localidades. A maior distância genética (0,350) foi observada entre o haplótipo H11 (Morro do Chapéu) e os haplótipos H1, H2 e H3 (Camaçari) e a menor distância genética (0,10) foi observada entre vários haplótipos, como por exemplo, entre os haplótipos H4 - H7 e H4 - H8. Nenhuma distância genética foi detectada entre os haplótipos de Camaçari, o que indica ser os indivíduos dessa população geneticamente muito relacionados. A Análise de Variância Molecular (AMOVA) com índice de fixação (Φ_{st}) de 0,6877 mostra que a variabilidade genética é maior entre do que dentro das populações, evidenciando alta estruturação genética. Fatores como, características geográficas, distância entre as localidades e a manutenção de colônias dentro de meliponários podem estar relacionados com este nível de estruturação genética. A presença da maioria dos haplótipos exclusivos em cada população analisada; o isolamento da população de Camaçari em relação às populações de Mundo Novo e Morro do Chapéu e a alta estruturação genética entre

as populações analisadas neste estudo, indicam que a altitude influencia a estrutura genética de *M. scutellaris*.

Palavras-chave: Estrutura genética, DNA mitocondrial, Enzima de Restrição

INTRODUÇÃO

O gênero *Melipona* pertence ao grupo de “abelhas sem ferrão” e inclui várias espécies com importante atividade sócio-econômica-ambiental. Isso se deve a participação destas abelhas em processos de polinização e a utilização de algumas espécies deste gênero no sistema de agricultura familiar, possibilitando melhor qualidade de vida aos meliponicultores devido à exploração racional de seus produtos (MODRO, 2006). No Brasil, essas abelhas eram inicialmente encontradas em todo o país, especialmente nas regiões norte e nordeste; locais de origem das duas primeiras espécies domésticas, *Melipona compressipes fasciculata* e *Melipona scutellaris* (KERR *et al.*, 1996).

Melipona scutellaris, popularmente conhecida como "uruçu" do Nordeste, atualmente encontra-se distribuída em uma área que abrange o estado da Bahia até o Rio Grande do Norte (CAMARGO & PEDRO, 2007). Essa espécie é muito conhecida biologicamente, em razão da sua grande manipulação por apicultores da região nordeste para exploração e comercialização de seus produtos. O elevado número de abelhas presentes na colméia, a higiene, a facilidade de domesticação e a produção de mel de ótima qualidade são características da espécie *M. Scutellaris* que contribuem para que os criadores de meliponíneos tenham considerável interesse por esta abelha (SOUZA *et al.*, 1998).

Melipona scutellaris é a principal polinizadora de algumas culturas comerciais como abacate, goiaba e maçã (CASTRO, 2002). Além de suas visitas frequentes a espécies de plantas cultivadas, esta espécie atua, também, na polinização de espécies de plantas nativas. ANDRADE *et al.*, (2009) ao avaliarem o perfil polínico do mel de *M scutellaris* na região de Jequitibá, município de Mundo Novo–BA, identificaram um total de 43 tipos polínicos, pertencentes a 15 famílias de plantas, o que deixa evidente a importância desta abelha na manutenção de espécies vegetais.

No entanto, fatores como a perda de habitats, destruição de ninhos por meleiros, pulverização de inseticidas e outros agroquímicos, têm contribuído para a redução de populações de *M. scutellaris* (CARVALHO-ZILSE *et al.*, 2009). A conservação, o manejo e a recuperação de populações degradadas de abelhas envolve não só fatores demográficos e ecológicos, mas também o conhecimento da genética de populações desses insetos.

Uma das metodologias empregadas em estudos genéticos com abelhas, utilizando como alvo os genes que codificam para COI e COII é a técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms*). Esta técnica se baseia na amplificação de DNA via PCR e obtenção de polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição, utilizando enzimas de restrição. Com base nesta técnica, TORRES *et al.*, (2009) ao analisarem a região COI/COII de 29 colônias de *M. q. quadrifasciata* procedentes de três localidades da região Sul do Brasil, padrões de restrição diferentes foram observados entre as amostras de Prudentópolis (PR) e Santa Catarina. Além disso, haplótipos exclusivos foram identificados em cada região amostrada. Conforme BATALHA-FILHO *et al.*, (2009), a digestão da região COI (*HinfI* e *MboI*) de 198 amostras de *M. quadrifasciata* de diferentes localidades do Brasil, resultou em padrões RFLP que permitiram diferenciar as subespécies *M. q. quadrifasciata* e *M. q. anthidioides*. FERNANDES-SALOMÃO *et al.*, (2002) estudaram 16 espécies de *Melipona*. Os dados de polimorfismo de restrição da região COI/COII do mtDNA e da região ITS-1 do rDNA das espécies avaliadas permitiram identificar alto nível de variabilidade genética interespecífica, embora *M. scutellaris*, *M. capixaba*, e *M. subnitida* tenham compartilhado o mesmo perfil eletroforético.

O objetivo deste estudo foi investigar, com base em haplótipos mitocondriais, como as populações de *M. scutellaris* amostradas em sítios de diferentes altitudes encontram-se geneticamente estruturadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas amostras de DNA total (DNA nuclear e mitocondrial) de 29 operárias de *M. scutellaris* coletadas em sítios específicos de três municípios do estado da Bahia sendo eles o de Camaçari (12° 41'51''S 38° 19'27''W, 36m), Jequitibá, Município de Mundo Novo (12° 03'02''S 40,29'43''W 500m) e Morro do Chapéu (11° 33' 00''S 41° 09' 22'' W 1100m) (Figura 1). As amostras foram preservadas em álcool absoluto, transportadas para o Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa e estocadas em ultrafreezer (-80°C) até o momento da sua utilização.

A extração do DNA total foi realizada de acordo com o protocolo recomendado por Waldschmidt *et al.* (1997). A cabeça e o mesossoma de cada indivíduo foram macerados com nitrogênio líquido em gral de porcelana contendo 1 ml de tampão de extração gelado constituído de: CTAB a 2% (Hexadecil Trimetil Brometo de Amônio); EDTA (Ácido Tetraacético Diamina Etileno) a 20 mM (pH 8,0); NaCl a 1,4 M; Tris-HCl a 100 mM (pH 8,0) e 100 µg/ml de protease. O macerado foi incubado a 65 °C por 30 min. A desproteínização foi feita com 1 volume de clorofórmio, por duas vezes. Após cada desproteínização o macerado foi centrifugado a 13.000 rpm por 8 min em micro centrífuga Eppendorf (Centrifuge 5415C). A precipitação do ácido nucléico foi feita com 1 volume de isopropanol seguida de incubação a -20°C por 2 a 24 h. O material foi então submetido à centrifugação a 14.000 rpm por 30 min e o precipitado formado foi lavado duas vezes com etanol 70% e seco à temperatura ambiente. O ácido nucléico foi ressuspendido em 100 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0). Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0,2 µg/ml de brometo de etídio, para quantificar e verificar a integridade e pureza do DNA extraído.

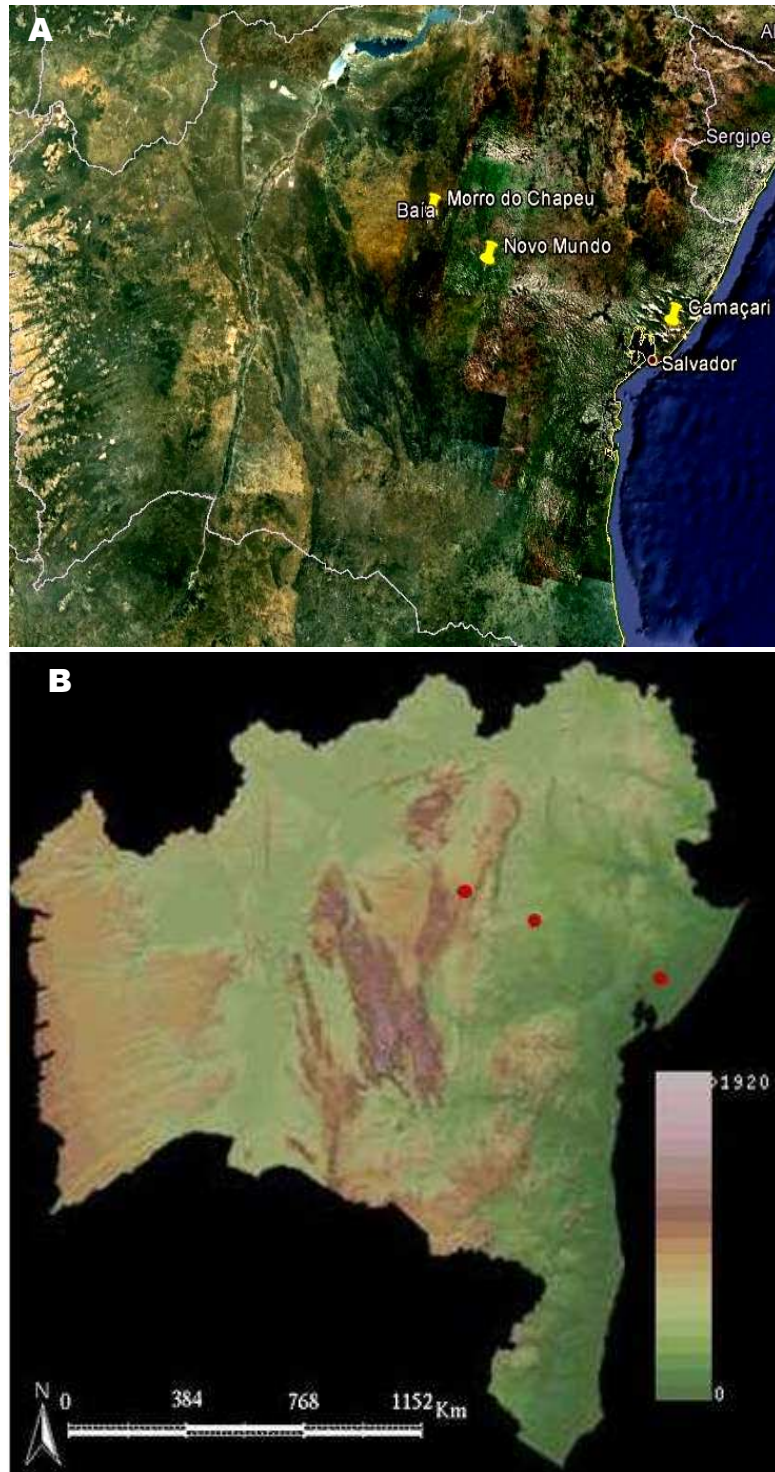


Figura 1. Mapa do Estado da Bahia. **A:** Pontos de coleta de *Melipona scutellaris*. **B:** Altitude dos locais de coleta. Ponto vermelho indica a localização do município de coleta. Figura A – Adaptada do Google Earth; Figura B – Adaptada de Brasil em Relevo, Embrapa – 2005.

Alíquotas do DNA total de diferentes amostras foram utilizadas em reações de amplificação da região COI/COII do mtDNA de *M. scutellaris*. Esta região corresponde à extremidade final do gene mitocondrial que codifica para citocromo oxidase I (COI), um gene de evolução relativamente rápida, e a extremidade inicial do gene que codifica para citocromo oxidase II (COII). A técnica empregada nas análises realizadas foi a de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction -Restriction Fragment Length Polymorphisms*), que consistiu em amplificação por PCR de regiões específicas do genoma, utilizando primers específicos (mtD7-GGATCACCTGATATAGCATTCCC e COI-IIR- GATCAATATCATTGATGACC (HALL & SMITH 1991; SIMON *et al.*, 1994), e posterior digestão dos produtos da amplificação com enzimas de restrição.

Para as reações de PCR foram utilizados 1,0 µl (cerca de 40 ng) de DNA total, 2,5 µL de tampão PCR *buffer*, 0,75 µL de cada *primer* (20 mM), 2,5 µL de dNTPs (10 mM cada), 1,25 U de *Taq DNA polimerase* (Promega) e 15,7µL de H₂O Ultrapura totalizando um volume de 25 µL. Cada reação foi submetida a uma desnaturação inicial a 94°C / 1 min e 20s, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 94°C / 1 min, 1 min e 20s à temperatura de 44°C para anelamento dos *primers*, 64°C / 2 min para alongamento e e um passo de alongamento final a 64°C por 10 min.

Os produtos da PCR foram submetidos à técnica de RFLP utilizando endonucleases de restrição (enzimas de restrição) que reconhecem sequências de bases específicas no DNA e clivaram essa sequência em sítios-alvo.

Inicialmente foram testadas as enzimas *Ase I*, *MspI*, *Bam HI*, *Bcc I*, *BstN I*, *Xap I*, *Folk I*, *Bgl II*, *Cfo I*, *Cla I*, *Dra I*, *Eco RI*, *Eco RV*, *Xba I*, *Hae III*, *Hind III*, *Hinf I*, *Nde I*, *Xho I*, *Pst I* e *Ssp I* conforme recomendações do fabricante. Com base no número de sítios de restrição obtidos e na resolução das bandas de DNA, as enzimas *Ase I*, *Hinf I*, *Ssp I*, e *Dra I* foram selecionadas e utilizadas nas análises posteriores.

O produto da amplificação foi submetido a reações de digestão durante 12 horas em banho-maria à temperatura de 37 °C. A reação de digestão consistiu em 10µL do produto PCR; 0,5µL da enzima, 2µL do tampão da enzima e 7,5µL de água ultrapura. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% durante 6 horas a 100 Volts, corados com brometo de etídio (0,2 µg/ml) e fotodocumentados para posterior análise. Para a determinação do tamanho

dos fragmentos de restrição obtidos para cada enzima, foram utilizados os marcadores de tamanho de DNA 1Kb ladder e Φ X174 DNA.

Os padrões PCR-RFLP polimórficos obtidos com cada uma das enzimas de restrição foram analisados e os haplótipos nomeados de A, B, C, D e E. Os haplótipos detectados foram utilizados para a construção de uma matriz e os dados da mesma foram submetidos à análise pelo *software* GROUP do programa REAP (*Restriction Enzyme Analysis Package*) (MCELROY, *et al.*, 1991), para remover as composições haplotípicas duplicadas.

Os dados de composição haplotípica foram também analisados pelo *software* GENERATE do programa REAP e uma matriz binária (0 e 1), onde 1 representou a presença e 0 a ausência do sítio de restrição foi obtida. Essa matriz foi utilizada para obtenção da matriz de distância genética com base na estimativa do número médio de substituição nucleotídica dos sítios de restrição (NEI & TAJIMA, 1981; NEI & MILLER, 1990), utilizando o *software* D, do programa REAP.

A matriz de distância obtida foi utilizada para agrupamento dos haplótipos utilizando o *software* SAHN do programa NTSYSpc versão 2.2 (ROHLF, 1988) e algoritmo UPGMA.

Utilizando o algoritmo *medianjoining* foi construída a rede de haplótipos pelo programa NETWORK 4.6.0.0 (BANDELT *et al.* 1999), que identifica os haplótipos mais relacionados.

Para avaliar como os haplótipos mitocondriais encontram-se geneticamente estruturados, foi realizada a Análise Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER, *et al.*, 1992) utilizando o programa GENES (CRUZ, 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A digestão da região COI/COII de *Melipona scutellaris* resultou em um total de 19 sítios de restrição. A digestão com *HinfI* gerou um padrão RFLP monomórfico, com três sítios de clivagem. Perfis de restrição polimórficos, intra e inter populacionais, foram detectados quando as enzimas *AseI*, *SspI* e *DraI* foram utilizadas. A Figura 2 mostra os padrões de restrição obtidos após digestão dos produtos de amplificação com a enzima *AseI*.

Ao avaliar o tamanho estimado dos fragmentos de restrição resultantes da digestão dos fragmentos COI/COII com *AseI*, *SspI* e *DraI* observou-se que o menor fragmento detectado foi de 120 pb e o maior de 900 pb.

Os padrões RFLP foram nomeados e a combinação entre eles, resultou em uma composição haplotípica de 12 haplótipos (Tabela 1). Enquanto três haplótipos (H1, H2 e H3) foram detectados nas amostras provenientes da localidade de Camaçari, quatro foram identificados nas amostras do Mundo Novo (H4, H5, H6 e H7) e seis nas de Morro do Chapéu (H4, H8, H9, H10, H11 e H12).

A maioria dos haplótipos identificados representa haplótipos exclusivos para determinada localidade amostrada. O haplótipo (H4) foi compartilhado entre as amostras de Mundo Novo e Morro do Chapéu. O haplótipo que apresentou maior frequência foi o H1, identificado seis vezes nas amostras de Camaçari e os haplótipos H6, H8, H10 e H11 foram os que apresentaram menor frequência.

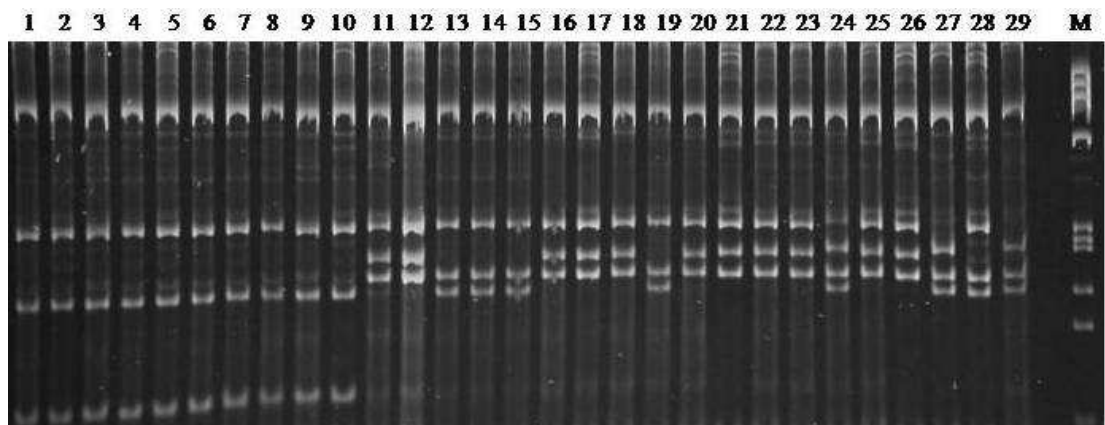


Figura 2. Diferentes padrões de restrição da região COI/COII digerida com a enzima *Ase I*, mostrando polimorfismo entre e dentro das populações *Melipona scutellaris*. 1 a 10: Camaçari. 11 a 20: Mundo Novo e 21 a 29: Morro do Chapéu. M: marcador de tamanho $\Phi X174/HaeIII$. Gel de poliacrilamida 8%.

Tabela 1. Haplótipos mitocondriais identificados e suas respectivas frequências por altitude. 40m (Camaçari) 500m (Mundo Novo), 1.100m (Morro do Chapéu). H1 a H12: Haplótipos mitondriais.

Haplótipo	Composição Haplotípica			Frequência/altitude		
	<i>Ase I</i>	<i>Ssp I</i>	<i>Dra I</i>	40m	500m	1.100m
H1	A	A	A	6	0	0
H2	A	A	B	2	0	0
H3	A	B	A	2	0	0
H4	B	C	B	0	3	1
H5	C	D	A	0	3	0
H6	C	C	A	0	1	0
H7	B	D	A	0	3	0
H8	B	D	B	0	0	1
H9	B	C	A	0	0	3
H10	D	C	B	0	0	1
H11	C	C	B	0	0	1
H12	E	C	B	0	0	2

A não detecção de haplótipos compartilhados entre as amostras de Camaçari (baixa altitude) e as de Mundo Novo (média altitude) e Morro do Chapéu (alta altitude) sugere uma possível ausência de fluxo gênico entre a população de Camaçari e as outras duas avaliadas, o que pode estar associada à distância e/ou à variação na topografia dos sítios amostrados. Ao contrário, o compartilhamento de um haplótipo entre as amostras de Mundo Novo e Morro do Chapéu sugere a ocorrência de fluxo gênico, mesmo que limitado, entre estas duas populações. Considerando que Mundo Novo e Morro do Chapéu estão geograficamente distantes (92 km), isoladas pelas serras localizadas na região da Chapada Diamantina e em altitudes variando entre 500 a 1200 m, a possível ocorrência de fluxo gênico deve ser investigada aumentando a amostragem para estas duas localidades, bem como analisando amostras procedentes de altitudes diferentes das até então avaliadas.

Os resultados obtidos mostram que a maior distância genética (0, 350) foi observada entre o haplótipo identificado na população de Morro do Chapéu (H11), e os haplótipos H1, H2 e H3 detectados na população de Camaçari (Tabela 2). Por outro lado, a menor distância genética (0, 010) foi detectada entre vários haplótipos, como por exemplo, entre os haplótipos H4 e H7 e os haplótipos H4 e H8. Nenhuma distância genética foi detectada entre os haplótipos de Camaçari, o que indica que os indivíduos dessa população são geneticamente muito relacionados. Outros haplótipos como H4 e H9; H7 e H8; H6 e H12, quando comparados entre eles, também apresentaram um valor de distância genética de 0.00.

O valor da distância genética (0.00) observado entre haplótipos de Camaçari revela uma alta proximidade genética entre os indivíduos dessa população. Essa situação pode ser consequência de endocruzamento na população, o que levou a formação de indivíduos geneticamente mais aparentados com consequente diminuição da variabilidade.

Tabela 2. Matriz de distância genética entre haplótipos mitocondriais de *Melipona scutellaris*, com base no número estimado de substituição nucleotídica dos sítios de restrição.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
H1	0.000											
H2	0.000	0.000										
H3	0.000	0.000	0.000									
H4	0.152	0.152	0.152	0.000								
H5	0.168	0.168	0.168	0.032	0.000							
H6	0.152	0.152	0.152	0.022	0.010	0.000						
H7	0.168	0.168	0.168	0.010	0.019	0.032	0.000					
H8	0.168	0.168	0.168	0.010	0.019	0.032	0.000	0.000				
H9	0.152	0.152	0.152	0.000	0.032	0.022	0.010	0.010	0.000			
H10	0.208	0.208	0.208	0.080	0.093	0.080	0.093	0.093	0.080	0.000		
H11	0.350	0.350	0.350	0.080	0.093	0.080	0.093	0.093	0.080	0.037	0.000	
H12	0.152	0.152	0.152	0.022	0.010	0.000	0.032	0.032	0.022	0.080	0.080	0.000

A análise de agrupamento (UPGMA) reuniu as amostras analisadas em dois grupos principais (Figura 3). Um dos grupos (Grupo 1) foi formado pelos haplótipos H1, H2 e H3, exclusivos da população de Camaçari e o outro (Grupo 2) pelos haplótipos H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11 e H12, identificados nas amostras de Mundo Novo e Morro do Chapéu. Os haplótipos do Grupo 2 foram divididos em dois subgrupos, sendo um deles composto pelos haplótipos H10 e H11, presentes exclusivamente nas amostras de Morro do Chapéu.

A reunião dos haplótipos detectados nas amostras de Mundo Novo e Morro do Chapéu em um mesmo grupo, sendo a maioria deles incluídos no mesmo subgrupo, indica maior proximidade genética entre essas duas populações. Observa-se no dendrograma que a maioria dos haplótipos do Morro do Chapéu está estreitamente relacionada com os de Mundo Novo, apesar de isolados geograficamente. Ao contrário, a população de Camaçari diverge consideravelmente das demais avaliadas. A reunião dos haplótipos detectados nas amostras de Camaçari em um grupo isolado foi observado, também, na rede de haplótipos (Figura 5). Nesta rede, cinco passos mutacionais separam os haplótipos de Camaçari do haplótipo H11 identificado em amostra do Morro do Chapéu. Esses dados são congruentes com os dados morfológicos relatados por NUNES *et al.*, (2007) onde a população de

Camaçari encontra-se separada das populações de Mundo Novo e Morro do Chapéu, sustentando a alta divergência entre as abelhas do Grupo 1 e Grupo 2 avaliadas no presente trabalho.

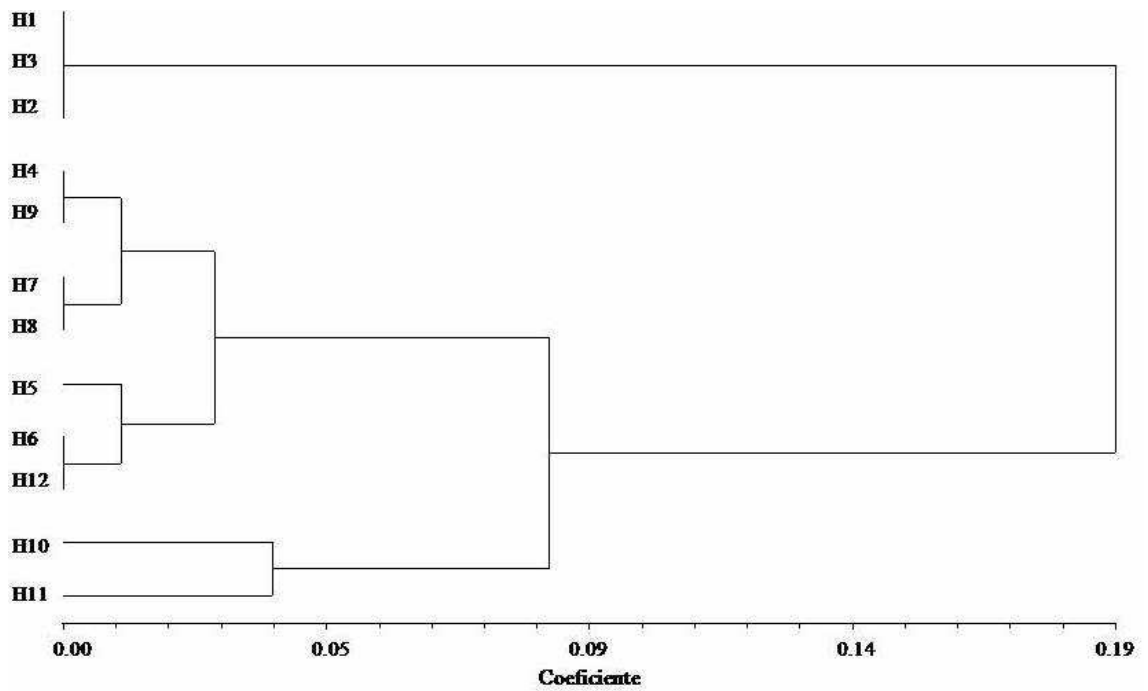


Figura 3. Dendrograma dos haplótipos obtido com base no algoritmo UPGMA utilizando a matriz de distância genética entre as populações analisadas.

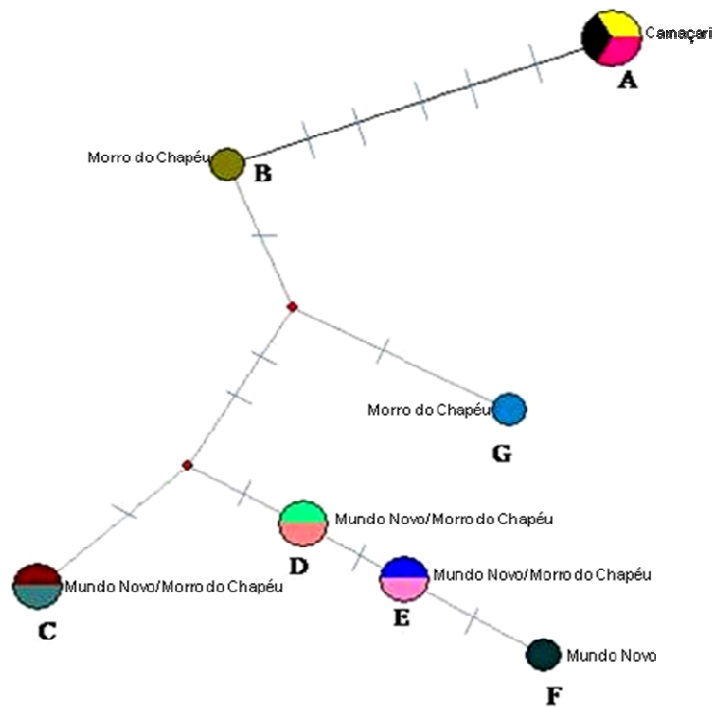


Figura 4. Rede de haplótipos mitocondriais de *Melipona scutellaris*. Os traços transversais entre dois haplótipos representam o número de passos mutacionais entre eles. Cada círculo representa um grupo de haplótipos. **A**: H1, H2 e H3; **B**: H11; **C**: H6 e H12; **D**: H4 e H9; **E**: H7 e H8; **F**: H5; **G**: H10.

A AMOVA realizada com dois níveis hierárquicos (entre e dentro das localidades) mostrou que a maior variação (68.76%) está entre as localidades. Esta variação resultou em um valor de Φ_{st} (0,6877) (Tabela 3) que sugere alta estruturação genética das populações de *M. scutellaris* avaliadas. Este resultado foi suportado pelos dados obtidos por análise de UPGMA e Network.

Tabela 3. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para dois níveis hierárquicos em três populações de *Melipona scutellaris*.

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Varição (%)
Entre localidades	2	1.7959	68.7678
Dentro de localidades	26	1.0489	31.2322
Total	28	2.8448	100.0

Índice de fixação $\Phi_{st}=0,6877$

GL= grau de liberdade.

O estado da Bahia representa um importante centro para a criação de “abelhas sem ferrão”, devido ao comércio de seus produtos, sendo a espécie *M. scutellaris*, a mais explorada. No entanto, a prática da meliponicultura pode ter consequências negativas, como a perda de variabilidade genética devido a manutenção de colônias dentro de meliponários. A diminuição da variabilidade genética é um dos fatores que pode contribuir para que uma espécie passe a *status* de espécie ameaçada de extinção.

Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo mostram que a altitude pode estar influenciando na diversificação (variação genética de 68.76%) e na estruturação genética (Φ_{st} igual a 0,6877) entre as populações de *M. scutellaris*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, J. P.; COSTA, S. N.; SANTANA, A. L. A.; SANTOS, P. C.; ALVES, R. M. O. & CARVALHO, C. A. L. (2009). Perfil Polínico do Mel de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) Proveniente de Colônias Instaladas em Área de Agricultura Familiar na Bahia. *Revista Brasileira de Agroecologia*. 4(2): 636-640.
- BANDELT, H. J.; FORSTER, P. & ROHL, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- BATALHA-FILHO, H.; MELO, G. A. R.; WALDSCHMIDT, A. M.; CAMPOS, L. A. O. & FERNANDES-SALOMÃO, T. M. (2009). Geographic distribution and spatial differentiation in the color pattern of abdominal stripes of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae). *Zoologia*. 26 (2): 213-219.
- CAMARGO, J. M. F. & PEDRO, S. R. M. (2007) Meliponini Lepeletier, 1836. In MOURE, J. S., URBAN, D. MELO, G. A. R. (Orgs) Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region, Curitiba, Brazil, 1058p.
- CARVALHO-ZILSE, G.A.; COSTA-PINTO, M. F. F.; NUNES-SILVA, C. G. & KERR, W. E. (2009). Does beekeeping reduce genetic variability in *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini)? *Genetics and Molecular Research* 8 (2): 758-765.
- CASTRO, M. S. (2002). Bee fauna of some tropical and exotic fruits: potencial pollinators and their conservation. In pollinating bees – the conservation link between agriculture and nature (eds. Kevan P, Imperatriz-Fonseca VL), pp 275-288. Ministry of Environment, Brasília.
- CRUZ, C. D. (2005). Programa Genes; versão Windows, Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV.

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.

HALL, H. G. & SMITH, D. R. (1991). Distinguishing African and European honeybee matriline using amplified mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88: 4548-4552.

ENGELS, W. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (1990). Caste development, reproductive strategies, and control of fertility in honey bees and stingless bees. In: W. Engels (Ed) *Social Insects: na evolutionary approach to castes and reproduction*. Berlin: Springer Verlag. p.158-230.

KERR, W. E.; CARVALHO, G .A. & NASCIMENTO, V. A. (1996). *Abelha Uruçú: biologia, manejo e conservação*. Belo Horizonte: Fundação Acangaú, 144 p.

LOWE, A.; HARRIS, S. & ASTHON. P. (2004). *Ecological genetics, Design. Analysis and application*. Blackwell Publishing, Oxford.

MCELROY, D.; MORAN, P.; BIRMINGHAM, E. & KORNFIELD, I. (1991). REAP (restriction enzyme analysis package) version 4.0, Orono: University of Maine.

Modro, A. F. H. (2006). *Flora e caracterização polinífera para abelhas *Apis mellifera* L. na região de Viçosa, MG*. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 98p.

NEI, M. & MILLER, J. C. (1990). A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. *Genetics*. 125: 873-879.

NEI, M. & TAJIMA, F. (1981).DNA Polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*. 97: 145-163.

NOGUEIRA-NETO, P. (1997). Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. Ed. Nogueirapis. 446p.

NUNES, L. A.; PINTO, M. F. F. C.; CARNEIRO, P.; PEREIRA, D. G. & WALDSCHMIDT, A. M. (2007). Divergência genética em *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera: Apidae) com base em caracteres morfológicos. Bioscience Journal 23 (1): 1-9.

ROHLF, F. J. (1988). NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system for the IBM PC microcomputer (and compatible), version 1.40, Oxford University Press, New York.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R. & ALMEIDA, E. A. B. (2002). Abelhas Brasileiras – Sistemática e Identificação. 1ª Edição. Belo Horizonte. 254p.

SIMON, C.; RATI, 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, B. A.; CARVALHO, C. A. L.; SODRÉ, G. S. & MARCHINI, L. C. (1998). Características físico-químicas de amostras de méis de abelha. Anais do XII Congresso Brasileiro de Apicultura, Salvador, Brasil, p.201.

TORRES, R.R.; ARIAS, M. C. & MORETTO, G. (2009). Mitochondrial DNA Polymorphism among Populations of *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* Lepeletier (Apidae: Meliponini) from Southern Brazil. Neotropical Entomology 38(2):208-212.

Capítulo 2

Estudo comparativo das sensilas antenais de operárias de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae) de diferentes altitudes

Artigo escrito conforme as normas da revista Iheringia, Série Zoologia, Porto Alegre.

RESUMO: Sensilas são estruturas sensoriais presentes nas antenas dos insetos e são responsáveis pela quimio, termo e mecanorrecepção. No presente trabalho, as sensilas presentes nos três flagelômeros mais distais de *Melipona scutellaris* de diferentes altitudes (200 e acima de 900m) foram avaliadas quali e quantitativamente, considerando os três flagelômeros (F) antenais mais distais. Imagens das antenas foram obtidas com o auxílio do microscópio eletrônico de varredura. Foram encontradas as sensilas placóide, basicônica, celocônica, ampulácea, campaniforme e tricóide reta e curvada. Comparativamente, o grupo localizado a 200m de altitude possui sensilas tricóides retas em maior quantidade nos três flagelômeros, enquanto que o grupo de 900m apresentou maior quantidade de sensilas tricóides curvadas no F9, sendo as mesmas maiores para o F10. Essas diferenças foram discutidas em função da localização geográfica dos diferentes grupos aqui estudados. Este trabalho representa o início de estudos investigativos da estrutura da antena de *M. scutellaris* e contribui para um melhor entendimento da biologia dessa espécie.

Palavras-chave: Microscopia eletrônica de varredura, Meliponini, antena, órgão sensorial.

**A comparative study of the antennal sensilla of *Melipona scutellaris* Latreille
1811 (Hymenoptera: Apidae) workers from different altitudes**

ABSTRACT: The sensilla are sensitive structures located in different insect parts including antennae. They are responsible for the chemo-, thermo- and mechanoreception. In the present work, the antennal topography of two different populations of *Melipona scutellaris* from different altitudes (200 and above 900m) were studied quali- and quantitatively, considering the last three distal antennal flagelomers (F). Images of the antennal surface were obtained with the aid of the scanning electron microscope (SEM). The SEM analysis showed that the sensilla placodea, basiconic, coeloconic, ampullacea, campaniform and trichodea are present in the dorsal surface of the *M. scutellaris* antennae. The number of sensilla trichodea of the straight subtype is greater in the last three flagelomers in individuals of 200m altitude, while individuals located above 900m altitude has a greater number of sensilla trichodea of the subtype curved in the F9 and they have greater length in individuals of 900m altitude only in the F10. These differences were discussed according to the geographic location of the different groups studied here. This work represents the preliminary results considering the description of the antennal structure of *M. scutellaris* and contributes to a better understanding of the biology of this species.

Key words: Scanning electron microscopy, Meliponini, antenna, sensitive organ.

INTRODUÇÃO

A espécie de abelha “sem ferrão” *Melipona scutellaris* Latreille 1811, conhecida popularmente como Uruçu do Nordeste ou Uruçu do Campo, originalmente era encontrada desde a Amazônia até o estado da Bahia. Porém, dados atuais mostram que sua ocorrência restringe-se do estado da Bahia até o Rio Grande do Norte, ocupando principalmente à região da Zona da Mata nordestina (CAMARGO & PEDRO, 2007). Especificamente no estado da Bahia, *M. scutellaris* é encontrada nas regiões planálticas e serranas, com uma distribuição geográfica em diferentes altitudes.

Melipona. scutellaris é um dos meliponíneos mais manipulados pelo homem, sendo uma das primeiras abelhas a ser domesticada pelos nativos e atualmente representa uma importante fonte de renda para os criadores da região nordeste através da produção de mel e de própolis (KERR *et al.*, 1996). Outra característica peculiar dessa espécie é o fato dela nidificar principalmente em ocos de árvores velhas de até 80m de altura (NUNES *et al.*, 2007).

Um fator importante no estudo das interações inseto-ambiente são as estruturas sensitivas encontradas em diferentes partes do corpo, de forma que as informações sobre os recursos ambientais podem ser percebidas graças à presença das mesmas. Essas estruturas denominadas sensilas são encontradas em maior quantidade nas antenas e em menor número em outras partes da cabeça, com maxilas e palpos labiais (BRUYNE & BAKER, 2008), nos tarsos e no aparelho ovipositor (GIANNAKAKIS E FLETCHER, 1985).

As sensilas são estruturas básicas da percepção dos estímulos ambientais cujas funções mecano, químico, termo e higrorreceptora estão relacionadas à sua morfologia (revisado em CHAPMAN, 1998). Apesar de morfologicamente simples, as sensilas apresentam uma grande variedade de funções, sendo capazes de receber estímulos luminosos, térmicos, químicos e mecânicos, bem como variações na umidade relativa do ar. Embora as funções das sensilas variem, sua composição celular é relativamente uniforme, sendo compostas por neurônios bipolares, células tecogênicas, tricogênicas e tormogênicas (revisado em KEIL, 1997).

A classificação, a abundância e a distribuição de sensilas nas antenas dependem da espécie de inseto (FAUCHEX *et al.*, 2006). As sensilas antenais das abelhas, por exemplo, são classificadas como sendo dos tipos tricóideia, basicônica, celocônica, campaniforme, placóideia e ampulácea (CRUZ-LANDIM, 2009).

Além de variar quanto à espécie, a quantidade e o tipo de sensilas também podem variar entre indivíduos de uma mesma espécie dependendo da sua distribuição geográfica (ESTEBAN, *et al.*, 2005). Nesse contexto, no presente trabalho foram estudados os tipos, a distribuição e a quantidade de sensilas tricóides retas e curvadas das extremidades antenais de duas populações de *M. scutellaris* de diferentes altitudes.

MATERIAL E MÉTODO

Operárias forrageadoras de *M. scutellaris* foram coletadas diretamente nas entradas dos ninhos em regiões de altitudes diferentes no estado da Bahia. Foi utilizado um indivíduo por ninho, sendo 10 indivíduos oriundos da região do município de Cruz das Almas (12°39'S e 39°06'W, 200m), localizado a 200m de altitude (denominado grupo de 200m de altitude), seis indivíduos oriundos de Maracás (13°26'S 40°25'W, 915m) e quatro do Morro do Chapéu (11°33'S 41°09'W, 1100m) (grupo acima de 900m de altitude).

Foi retirada uma antena de cada indivíduo do lado direito ou esquerdo, lavadas com solução fisiológica, seguido da desidratação em solução de acetona em concentrações crescentes (50%-100%) por 7 minutos em cada uma. As amostras foram submetidas à secagem no aparelho de ponto crítico com CO₂ e posteriormente montadas em suportes de alumínio, metalizadas com ouro e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo LEO VP1430 no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

Os dados para a identificação e a quantificação das sensilas antenais foram obtidos diretamente das elétron-micrografias, considerando apenas os três últimos flagelômeros (mais distais) pelo fato dos mesmos concentrarem a maior parte das sensilas antenais (CRUZ-LANDIM, 2009). Para a quantificação, foram consideradas apenas as sensilas tricóides (quimiorreceptoras) de extremidades reta e curvada por estas estarem em maior quantidade e por serem de fácil visualização e identificação, comparativamente às demais sensilas. Os números de sensilas foram obtidos pela contagem em uma área quadrada de tamanho fixo de 960 pixels ao longo de cada flagelômero utilizando o programa *Adobe Photoshop 7.0*. Também foi aferido o comprimento (µm) das sensilas tricóides curvadas. Todas as imagens analisadas possuíam 72 pixels/polegada. As medidas do comprimento (µm) foram feitas com o auxílio do programa *Image ProPlus 4.5*.

As comparações do número e comprimento das sensilas tricóides entre os dois grupos estudados foram feitas com o auxílio do programa SAEG (Sistema para análises Estatísticas). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

As antenas de operárias adultas de *M. scutellaris* consistem de 10 flagelômeros conectados ao escapo por meio de um pedicelo e apresentam sensilas distribuídas ao longo de todo seu comprimento (Fig. 1A). Em relação aos tipos de sensilas encontradas nos três últimos flagelômeros antenais de *M. scutellaris*, foram identificadas as do tipo tricóide, placóide, basicônica, celocônica, ampulácea e campaniforme. No caso das sensilas tricóides, as mesmas exibem tamanhos e curvaturas diferentes, sendo as do subtipo curvada mais abundantes no flagelômero mais distal (Fig. 1B).

Os números de sensilas tricóides de extremidade reta são diferentes entre os dois grupos de *M. scutellaris* estudados, considerando os três flagelômeros (F8, F9 e F10) analisados [F8 (F=0,00007, P<0,05); F9 (F=0,00470, P<0,05); F10 (F=0,01648, P<0,05)] (Fig. 2A). No grupo de 200m de altura, o número de sensilas tricóides de extremidade reta é maior do que no grupo acima de 900m de altitude, sendo as médias dos números dessas sensilas no grupo de 200m de F8= 62,9±1,05, F9=64,6±0,92 e F10=62,4±1,17; enquanto as médias do grupo de acima de 900m de altitude são de F8=57,7±1,46, F9=59,5±1,29 e F10=58,1±1,10 (Fig. 2A).

O grupo de 200m de altitude possui um menor número de sensilas tricóides curvadas no F9, com uma média de 16,3±0,95 sensilas para 200m e 20,0±1.35 para acima de 900m de altitude (F=0,03733, P<0,05) (Fig. 2B). A sensila curvada apresenta menor comprimento no grupo de 200m de altitude apenas no F10, medindo em média nesse caso 15.0±0.40µm contra 15,5±0,43µm no grupo acima de 900m (F=0,00071 P<0,05) (Fig. 2C).

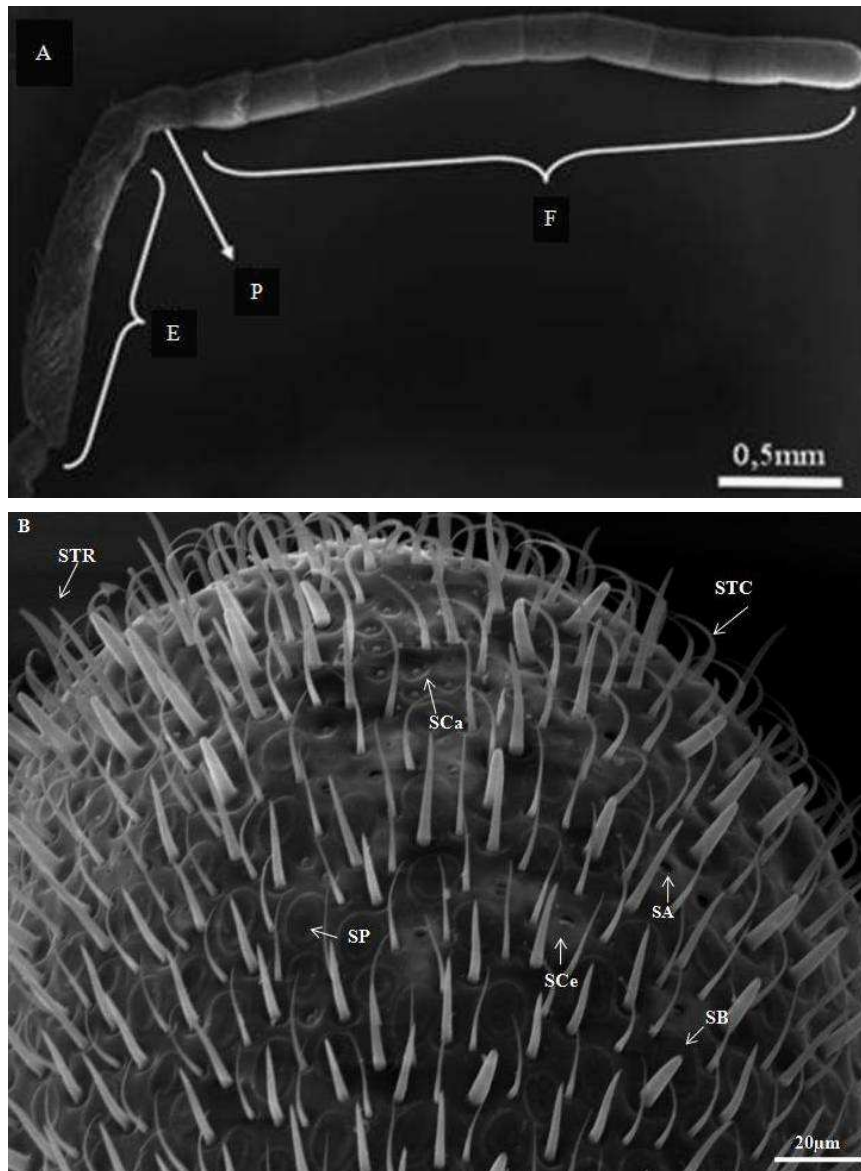


Figura 1. Micrografias eletrônicas de varredura mostrando aspectos gerais e detalhados da superfície dorsal da antena de operárias adultas de *M. Scutellaris*. **(A)** Micrografia mostrando aspectos gerais da antena com suas principais partes: **E**-escapo, **P**- pedicelo, e **F**- flagelômeros. **(B)** Micrografia evidenciando diferentes tipos de sensilas **STR**: sensila tricóide de extremidade reta; **STC**: sensila tricóide de extremidade curvada; **SCa**: sensilas campaniforme; **SB**: sensila basicônica; **SA**: sensila ampulácea; **SP**: sensila placóides e **SCe**: sensila celocônica.

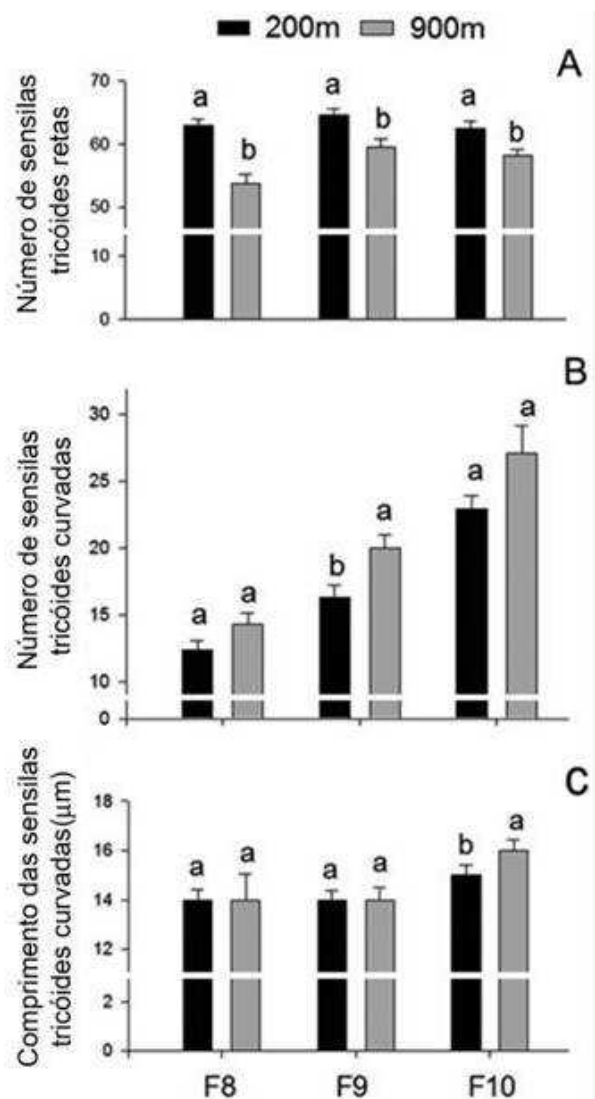


Figura 2. Número e tamanho das sensilas tricóides da superfície dorsal dos flagelômeros F8, F9 e F10 da antena de operárias adultas de *M. Scutellaris* de diferentes altitudes. As barras de cor preta representam população de 200m de altitude, enquanto que as de cor cinza representam população localizada acima de 900m de altitude. As letras **a** e **b** representam diferenças significativas a 5%. (A) Número das sensilas tricóides de extremidades retas; (B) Número e (C) tamanho das sensilas tricóides de extremidades curvadas.

DISCUSSÃO

A análise por MEV possibilitou identificar os tipos de sensilas presentes em *M. scutellaris*, sendo elas dos tipos basicônica, placóide, celocônica, tricóide, campaniforme e ampulácea. Esses resultados corroboram observações feitas em antenas de outras espécies de abelhas, sendo esses seis tipos de sensilas observados, também, em *M. quadrifasciata* Lepeletier 1836 e *Apis mellifera* Linnaeus 1758 (FRASNELLI *et al.*, 2010). Essas sensilas também são descritas em formigas das espécies *Solenopsis invicta* Buren 1972 (RENTHAL *et al.*, 2003) e *Dinoponera lucida* Emery 1901 (MARQUES-SILVA *et al.*, 2006).

As sensilas placóides possuem função olfativa (OCHIENG *et al.*, 2000) e em geral são encontradas em toda a superfície da antena de *M. scutellaris*. Pela simples inspeção visual, é possível notar que a quantidade dessas estruturas aumenta à medida que se aproxima da extremidade antenal. A função dessas sensilas foi estudada na espécie de abelha *Bombus terrestris* Linnaeus 1758 (Hymenoptera: Apidae), sendo que dentro de uma mesma colônia, os indivíduos com maior densidade dessas sensilas exibiam melhor capacidade de resposta a odores do que os indivíduos com antenas pequenas e menor densidade de sensilas (SPAETHE *et al.*, 2007). Em *M. scutellaris*, estudos futuros são necessários para elucidar a função dessas estruturas na espécie.

Outros tipos de sensilas com funções relacionadas à percepção dos estímulos ambientais, como as ampuláceas, celocônicas e campaniformes, estão concentradas na extremidade do último flagelômero (F10) antenal de *M. Scutellaris*, porém, em quantidade relativamente baixa em comparação às tricóides e placóides. Sugerimos que a maior concentração de sensilas na extremidade antenal facilitaria a percepção de estímulos externos. Além disso, essas sensilas representariam um importante papel na detecção da umidade e temperatura para a atividade de forrageio (SILVA *et al.*, 2011).

Apesar de sido observado maior quantidade de sensilas tricóides e placóides em relação às, sensilas basicônicas, estas últimas são consideradas importantes quimiorreceptoras (MARTINI & SCHMIDT, 1984).

As variações morfométricas observadas nas sensilas tricóides de extremidade reta e extremidade curvada entre os grupos avaliados não são exclusividade dos órgãos sensoriais de populações de *M. scutellaris* de diferentes altitudes. Por exemplo, foi mostrado que o tamanho das asas das operárias dessa espécie também variou de acordo com a altitude (NUNES *et al.*, (2007). Esses estudos da morfometria das asas realizadas por NUNES *et al.*, (2007) separaram *M. scutellaris* em três grupos distintos de indivíduos conforme a altitude: grupos de 1100m, grupos localizados de 0 a 560m e de 600 a 964m. Outras diferenças morfológicas nessa espécie foram observadas por PINTO M.F.F.C. (dados não publicados), onde os espécimes coletados próximos ao nível do mar apresentavam abdômen relativamente grande e escuro, enquanto que à medida que aumentava a altitude, o tamanho do abdômen diminuía gradativamente e as abelhas apresentavam coloração mais clara e maior pilosidade no tórax.

O maior número de sensilas de extremidade reta nos três flagelômeros das abelhas do grupo de 200m pode estar refletindo uma adaptação a fatores como a umidade do ar relativamente alta e uma menor incidência de ventos, que poderiam dificultar a difusão de odores. A percepção da umidade de modo mais acurado permite ao inseto determinar as condições meteorológicas mais apropriadas para o forrageamento ou, aliado ao aparato olfativo, determinar o melhor local e condições do alimento a ser coletado (KLEINEIDAM & TAUTZ, 1996; WEIDENMULLER, *et al.*, 2002).

.As abelhas de altitude mais elevada e com temperatura e índice pluviométrico menores em relação à altitude menos elevada, apresentam um maior número de sensilas tricóides curvadas pelo menos em F9. Além disso, essas sensilas são maiores em relação às observadas nos indivíduos do grupo de 200m de altitude e com características climáticas e localização diferente do grupo de acima de 900m de altitude.

O maior número e tamanho sensilas tricóides curvadas nos indivíduos altitude acima de 900m pode ser uma adaptação desses indivíduos que vivem em altitudes relativamente maiores. Porém, até o momento, o papel de órgãos sensoriais mais desenvolvidos para esse tipo de ambiente é desconhecido.

Dentre os fatores abióticos determinantes das diferenças fenotípicas, sugerimos que a altitude e fatores associados como umidade, pluviosidade e

temperatura podem estar estreitamente relacionados com as diferenças observadas entre os dois grupos de *M. scutellaris* estudados.

Embora os mesmos tipos de sensilas tenham sido encontrados nas antenas das *M. scutellaris* dos dois grupos avaliados, diferenças significativas foram observadas no número e no comprimento dos dois morfotipos de sensilas tricóides. Estes resultados mostram que a análise de sensilas nestas abelhas pode constituir em uma ferramenta importante para o entendimento da interação destes insetos com o ambiente.

Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo mostram que a altitude e fatores associados à mesma podem estar contribuindo com as diferenças no tamanho e número de sensilas tricóides observadas entre os grupos de *M. scutellaris* estudados. Análises com outros tipos de sensilas poderão resultar em dados que associados aos obtidos aqui irão contribuir para o entendimento do papel destes órgãos sensoriais em *M. scutellaris*.

AGRADECIMENTOS

À Secretaria de Educação do Estado de Mato Grosso (SEDUC/MT), à Fapemig, à Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao CNPq pelo apoio financeiro e ao Núcleo de Microscopia e Microanálise pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, O. A. 1999. **Informações metereológicas do CNP: mandioca e fruticultura tropical**. Cruz das Almas-BA, Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura. 35p.
- BRUYNE, M. & BAKER, T.C. 2008. Odor detection in insects: Volatile Codes. **Journal of Chemical Ecology** **34**: 882-897.
- ESTEBAN, L; ANGULO, V.M; FELICIANGELI, M. D & SILVIA CATALÁ, S. 2005. Analysis of antennal sensilla patterns of *Rhodnius prolixus* from Colombia and Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **100**(8): 909-914.
- CAMARGO, J. M. F & PEDRO, S. R. M. 2007. Meliponini Lepeletier, 1836. *In*: Moure, J. S.; Urban, D. & Melo, G. A. R. eds. **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**. Sociedade Brasileira de Entomologia. p.272-578.
- CHAPMAN, R. F. 1998. **The Insects Structure and Function**. Cambridge University Press, 770p.
- CRUZ-LANDIM, C. 2009. **Abelhas: Morfologia e função de sistemas**. São Paulo. 408p.
- DIETZ, A. & HUMPHREYS W. J. 1971. Scanning eletron microscopy studies of antennal receptors of the worker honey bee including sensila campaniformia. **Annals of the Entomological society of America** **64**(4):919-925.
- FAUCHEUX, M.J.; KRISTENSEN N.P. & YEN, S.H. 2006. The antennae of neopseustid moths: morphology and phylogenetic implications with special reference to the sensila (Insecta; Lepidoptera; Neopseustidae). **Zoologischer Anzeiger** **245**:131-142.
- FRASNELLI, E.; ANFORA, G.; TRONA, F.; TESSAROLO, F. & VALLORTIGARA, G. 2010. Morpho-functional asymmetry of the olfactory receptors of the honeybee (*Apis mellifera*). **Behavioural Brain Research** **209**:221-225.
- GIANNAKAKIS, A.; FLETCHER, B.S. 1985. Morphology and distribution of antennal sensilla of *Dacus tryoni* (Froggatt) (Diptera, Tephritidae). **Journal of the Australian of entomological Society. Brisbane** **24**:31-35.

- KEIL T.A. 1997. Comparative morphogenesis of sensilla: A review. **International Journal of Morphology & Embryology** **26**(3):151-160.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A. & NASCIMENTO, V. A. 1996. **Abelha Uruçu. Biologia, Manejo e Conservação**. Belo Horizonte, Acangauá. 144p.
- KLEINEIDAM, C. & TAUTZ, J. 1996. Perception of Carbon Dioxide and other "air-condition" P parameters in the leaf cutting ant *Atta cephalotes* **Naturwissenschaften** **83**:566-568.
- KÖPPEN, W. 1948. **Climatologia com un estudio de los climas de la Tierra**. Mexico, Fondo de Cultura Económica. 479p.
- MARQUES-SILVA S.; MATIELLO-GUSS, C.P.; DELABIE, J. H. C.; MARIANO, C.S.F.; ZANUNCIO, J.C. & SERRÃO J.E. 2006. Sensilla and secretory glands in the antennae of a primitive ant: *Dinoponera lucida* (Formicidae: Ponerinae). **Microscopy Research and Technique** **69**:885-890.
- MARTINI, R. & SCHMIDT, K. 1984. Ultrastructure and early development of the pore plate sensilla of the *Gymnomerus laevipes* (Shuckard) (Vespoidea, Eumenidade). **Protoplasma** **119**:197-211.
- MAURY, C. M. 2002. **Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira**. Brasília, Ministério do Meio Ambiente. 340p.
- NUNES, L.A.; PINTO, M.F.F.C.; CARNEIRO, P.; PEREIRA, D.G. & WALDSCHMIDT, A.M. 2007. Divergência genética em *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera: Apidae) com base em caracteres morfológicos. **Bioscience Journal** **23**(1):1-9.
- OCHIENG, S. A.; PARK, K. C.; ZHU, J. W. & BAKER, T. C. 2000. Functional morphology of antennal chemoreceptors of the parasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Arthropod Structure and Development** **29**(3):232-240.
- RENTHAL, R.; VELASQUEZ, D.; OLMOS, D.; HAMPTON, J. & WERGIN, W.P. 2003. Structure and distribution of antennal sensilla of the red imported fire ant. **Micron** **34**:405-413.

ROCHA, A. J. D. & PEDREIRA, A. J. 1995. Geologia. *In*: ROCHA, A. J. D. & COSTA, I. V. G. eds. **Projeto Mapas Municipais- Município de Morro do Chapéu (BA): informações básicas para o planejamento e administração do meio físico.** Salvador, CPRM, v.3, p53-60.

SILVA, M. D.; RAMALHO, M. & ROSA J. F. 2011. Por que *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae) forrageia sob alta umidade relativa do ar? **Iheringia, Série Zoologia** **101**(1-2):131-133.

SPAETHE, J.; BROCKMANN.; A. HALBIG, C. & TAUTZ, J. 2007. Size determines antennal sensitivity and behavioral threshold to odors in bumblebee workers. **Naturwissenschaften** **97**:733-739.

WEIDENMULLER, A.; KLEINEIDAM, C.; TAUTZ, J. (2002). Collective control of nest climate parameters in bumblebee colonies. **Animal Behaviour** **63**:1065-1071.

Capítulo 3

Imunolocalização da proteína heterocromatina 1 em abelhas do gênero *Melipona* com alto ou baixo conteúdo de heterocromatina

RESUMO: Em *Melipona* são encontradas espécies com diferentes características na heterocromatina sendo possível distinguir espécies com alto conteúdo de heterocromatina e outras com baixo conteúdo. Neste estudo foi investigada a presença de HP1 em abelhas do gênero *Melipona* e sua relação com alto e baixo conteúdo de heterocromatina destes insetos. Larvas pós-defecantes de *M. mondury* (alto de conteúdo heterocromatina) e *M. quadrifasciata* (baixo conteúdo de heterocromatina) foram avaliadas com base em ensaio de imunolocalização e análise de *Western Blotting*. O resultado obtido mostrou que a proteína HP1 é expressa nas duas espécies analisadas. A presença de três marcações de imunolocalização para HP1 para cada espécie analisada sugere que possíveis isoformas de HP1 são expressas em *Melipona*. A possível isoforma de *M. mondury* que apresentou marcação mais intensa pode estar relacionada com o alto conteúdo de heterocromatina nesta espécie, o que pode ser confirmado com a implementação de outras análises.

Palavras-chave: Proteína HP1, Isoformas, *Western Blotting*

INTRODUÇÃO

As abelhas da tribo Meliponini apresentam cromossomos com padrão de distribuição de heterocromatina muito semelhante entre as espécies, sendo observado, na maioria das espécies, um braço cromossômico heterocromático e um eucromático. Esses dados coincidem com a explicação da evolução cromossômica desta tribo, pela Teoria da Interação Mínima proposta por IMAI (1991). Porém, um padrão diferente foi observado no gênero *Melipona* por possuírem espécies com baixo (Grupo 1) e espécies com alto conteúdo (Grupo 2) de heterocromatina (ROCHA & POMPOLO (1998). No primeiro grupo a heterocromatina apresentou uma distribuição pericentromérica ou no braço curto dos acrocêntricos. Já no segundo, o percentual de heterocromatina atingiu valores superiores a 50% e encontra-se distribuída por quase toda extensão do cromossomo (ROCHA & POMPOLO 1998).

Dentre o grupo de espécies de *Melipona* que apresenta alto conteúdo de heterocromatina, do qual faz parte *Melipona scutellaris*, *Melipona capixaba* e *Melipona mondury*, observou-se uma variação cariotípica muito pequena e, assim, a caracterização de outros elementos é necessária para auxiliar o entendimento de aspectos relacionados com a evolução dessas espécies. Embora seja considerado que as abelhas “sem ferrão” são citogeneticamente pouco caracterizadas, o padrão de distribuição da heterocromatina e características associadas a ela, tais como composição, proteínas associadas podem contribuir para o entendimento da evolução cariotípica do grupo (LOPES *et al.*, 2011).

Domínios heterocromáticos do DNA desempenham papéis importantes na manutenção da integridade dos cromossomos e regulação da expressão gênica em eucariotos (MOTAMEDI *et al.*, 2008) GREWAL (2000) em estudos com *Schizosaccharomyces pombe* (Schizosaccharomycetales:Schizosaccharomycetaceae), demonstrou que a estrutura da cromatina também é essencial para a organização funcional de domínios heterocromaticos, como o centrômeros e telômeros.

Dentre as proteínas que se associam à cromatina e determinam suas propriedades encontra-se a família de Proteína Heterocromatina 1 (HP1). Esta família de proteína cromossômica é conservada e parece desempenhar importante papel no processo de condensação da cromatina e silenciamento gênico (SADAIE *et al.*, 2008).

Diferentes isoformas da proteína HP1 já foram identificadas em vários organismos como mamíferos (HP1 α , HP1 β e HP1 γ), anfíbios (HP1 α e HP1 γ), insetos (HP1b HP1 e HP1c) e levedura (Swi6 e CHP2) (LOMBERK *et al.*, 2006). Porém, ainda não há registro da presença de HP1 em abelhas. Assim, por ser a heterocromatina em abelhas tão pouco estudada, em relação à sua composição e estrutura, o objetivo deste estudo foi investigar a presença dessa proteína nas espécies *Melipona mondury* e *M. quadrifasciata* que possuem alto e baixo conteúdo de heterocromatina respectivamente.

MATERIAL E MÉTODO

Material Biológico

Larvas de *Melipona mondury* espécie que apresenta alto conteúdo de heterocromatina e *Melipona quadrifasciata* com baixo conteúdo de heterocromatina procedentes do apiário da Universidade Federal de Viçosa foram utilizadas nas análises.

Extração de proteínas e Análise por *Western blotting*

Extração de proteínas

Para a extração das proteínas, gânglios cerebrais de larvas em estágio pós-defecante foram retirados e macerados em tampão de extração obtido conforme PLATERO (1995), com modificações que consistiu de Tris-EDTA (TE) e inibidor de protease P2714-1BTL *Protease Inhibitor Cocktail, lyophilized* 10%. Em seguida, o material macerado foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante coletado. Uma segunda centrifugação foi realizada por 5 minutos a 10000 rpm, o sobrenadante foi coletado e utilizado no procedimento de *Western blotting*. Após a extração, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro e com base na curva padrão construída a partir dos valores obtidos na quantificação, foi determinada a quantidade de proteína total a ser utilizada na eletroforese.

Análise de Western blotting

Na análise de *Western blotting* as proteínas foram submetidas inicialmente à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 12% (150 mA por 4h). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose usando o aparelho *Semidry electroblotting* (BioRad) (280 mA por 3h). Após a transferência, a membrana foi bloqueada por 3h a 4° C com uma solução de leite em pó desnatado a 5% em TBST (0,05% Tween 20, TBS 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM)). Em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo anti-HP-1 (C1A9 monoclonal), 1:500 em TBST, “overnight” à temperatura ambiente sob leve

agitação. Após este período, a membrana foi lavada três vezes em TBST por 15 min cada e incubada por 2h em anticorpo secundário anti-IgG-mouse conjugado com HRP (Peroxidase) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) com diluição de 1:2000 em TBST. Três lavagens adicionais em TBST durante 15 minutos cada foram realizadas. A detecção das bandas foi feita em solução de DAB (3,3'-diaminobenzidina), sulfato de níquel e H₂O₂. Como controle positivo o mesmo procedimento foi realizado com gânglios *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As marcações de imunolocalização de HP1 observadas nos extratos de *D. melanogaster*, *M. mondury* e *M. quadrifasciata* indicam que HP1 é expressa, também, nas duas espécies de *Melipona* avaliadas (Figura 1). Foram observadas três marcações em *M. mondury*, e quatro marcações em *M. quadrifasciata*. Estas marcas para HP1 podem estar representando isoformas desta proteína. Isoformas de HP1 têm sido identificadas em diferentes organismos como, por exemplo, Swi6 e CHP2 em levedura (SADAIE *et al.*, 2008) e HP1a e 1b em *Bombix mori* (MITSUNOBU *et al.*, 2012).

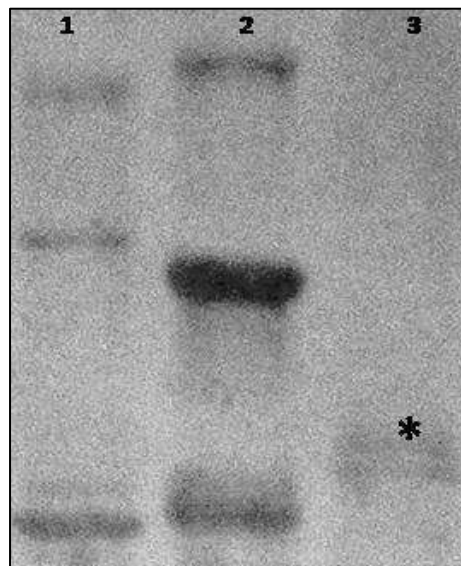


Figura 1. Imunomarcagem de HP1 (proteína heterocromatina 1) e possíveis isoformas no gênero *Melipona*; 1: *Melipona quadrifasciata*, 2: *Melipona mondury*, 3: *Drosophila melanogaster* *: imunomarcagem de proteína HP1 em *D. melanogaster* (controle positivo).

A observação de marcação muito mais intensa de uma possível isoforma em *M. mondury*, sugere maior expressão de HP1 nesta espécie com alto conteúdo de heterocromatina. A possível relação entre a alta expressão de HP1 e o conteúdo de

heterocromatina em *M.mondury* pode ser investigada utilizando metodologias apropriadas.

Uma das funções atribuídas à HP1 é a resposta a danos no DNA (DINANT & LUIJSTERBURG, 2009). Segundo estes autores, a HP1 pode facilitar o reparo do DNA por reorganizar a cromatina envolvendo interações entre HP1 fosforilada e outras proteínas de resposta ao dano (DINANT & LUIJSTERBURG, 2009). Esta pode ser uma das funções de HP1 nos meliponíneos, considerando que a Teoria utilizada para explicar a evolução do cariótipo nesse grupo de abelhas envolve eventos de quebra e amplificação da heterocromatina, duas funções que requerem a participação da HP1.

Este é o primeiro relato de expressão de proteínas da família HP1 em abelhas. Análises mais detalhadas estão sendo realizadas visando obter conhecimentos que poderão contribuir para o entendimento do papel desta proteína no mecanismo de heterocromatinização em *Melipona*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DINANT, C. & LUIJSTERBURG, M. S. (2009). The Emerging Role of HP1 in the DNA Damage Response. *Molecular And Cellular Biology* . 29: (24) 6335–6340

GREWAL, S. I. (2000). Transcriptional silencing in fission yeast. *Journal of Cellular Physiology*. 184: 311-318.

IMAI, H. T. (1991). Mutability of constitutive heterochromatin (c-bands) during eukaryotic chromosomal evolution and their cytological meaning. *Japanese Journal of Genetics* 66: 635-661.

LOMBERK, G.; WALLRATH, L. & URRUTIA, R. (2006). The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome Biology*. 7: 228.1-228.8.

LOPES, D. M.; FERNANDES, A.; PRACA-FONTES, M. M.; WERNECK, H. A.; RESENDE, H. C & CAMPOS, L. A. O. (2011). Cytogenetics of Three *Melipona* Species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Sociobiology*. 57(2):1-10.

MITSUNOBU, H.; IZUMI, M.; MON, H.; TATSUKE, T.; LEE, J. M. & KUSAKABE, T. (2012). Molecular characterization of heterochromatin proteins 1a and 1b from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*. 21(1): 9–20.

MOTAMEDI, M. R.; HONG, E. EUN-JIN.; LI, X.; GERBER, S.; DENISON C.; G, STEVEN. & MOAZED, D. (2008). HP1 Proteins Form Distinct Complexes and Mediate Heterochromatic Gene Silencing by Nonoverlapping Mechanisms. *Molecular Cell*. 32: 778–790.

ROCHA, M. P. & POMPOLO, S. G. (1998). Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genetics and Molecular Biology*. 2 (1): 41-45.

SADAIE, M.; KAWAGUCHI, R.; OHTANI, Y.; ARISAKA, F.; TANAKA, K.; SHIRAHIGE, K. & NAKAYAMA, J. (2008). Balance between distinct HP1 proteins controls heterochromatin assembly in fission yeast. *Molecular and Cellular Biology*. 28:(23): 6973-6988.

CONCLUSÕES GERAIS

A análise por PCR-RFLP permitiu a detecção de sítios de restrição em *M. scutellaris* e a identificação de diferentes haplótipos nas populações amostradas. A alta estruturação genética das populações analisadas e os dados da rede de haplótipos e da análise UPGMA mostram que a altitude influencia a estrutura genética de *M. scutellaris*.

Com base nos dados obtidos no estudo morfológico de sensilas antenais, é possível concluir que a altitude pode estar contribuindo com as diferenças no tamanho e número de sensilas tricóides observadas entre os grupos de *M. scutellaris* estudados (de 200 e acima de 900m). Estudos posteriores com outros tipos de sensilas poderão contribuir para melhor entendimento do papel destes órgãos sensoriais em *M. scutellaris*.

A Proteína HP1 é expressa em Melipona; Na espécie com alto conteúdo de heterocromatina, a expressão de HP1 é maior. Estudos envolvendo caracterização de isoformas, localização nos cromossomos, sequenciamento e comparação dos genes que codificam para HP1, certamente irão contribuir para o esclarecimento da função e mecanismos de ação de HP1 em meliponíneos e nos insetos em geral.