

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DETECÇÃO DE POLIMORFISMO EM *Melipona scutellaris*
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Ana Carolina Silva Siquieroli

Monografia apresentada à Coordenação do Curso
de Ciências Biológicas, da Universidade Federal
de Uberlândia, para a obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Julho - 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DETECÇÃO DE POLIMORFISMO EM *Melipona scutellaris*
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Ana Carolina Silva Siquieroli

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Julho - 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DETECÇÃO DE POLIMORFISMO EM *Melipona scutellaris*
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Ana Carolina Silva Siquieroli

Aprovado Pela Banca examinadora em 02/07/2004
Nota 100,00

Prof^a Dr^a Ana Maria Bonetti
Orientadora

Msc Milla Alves Baffi

Biólogo Carlos Ueira Vieira

Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Dr. Ana Maria Bonetti
Curso de Ciências Biológicas

Uberlândia, 02 de julho de 2004.

Dedico esse trabalho
aos meus pais, Janirce e Anísio, ao
meu irmão Tiago, ao meu namorado
Marcos Paulo e à minha Orientadora
Ana Maria Bonetti.

Feliz o homem que se aplica à sabedoria,
e raciocina com sua inteligência;
Que medita no coração em seus caminhos,
e reflete em seus segredos.

(Eclo 14, 20-21)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que esteve sempre presente, guiando meus caminhos, e com certeza, me iluminando.

Agradeço a poderosa Natureza, por ter me “emprestado” para estudo esse pequeno e maravilhoso inseto: a abelha *Melipona scutellaris*, pela qual criei afeto e admiração.

Agradeço aos meus pais, Janirce e Anísio, que são os responsáveis por mim e pelo que sou. Obrigada por me guiarem e me educarem por esses 21 anos e estarem presentes em todos momentos da minha vida. Obrigada, principalmente pelo amor e paciência dedicados a mim. Mãe, pai, obrigada por tudo!

Obrigada ao meu irmão, Tiago por também estar sempre presente ao meu lado e colaborando em vários momentos da minha vida.

Obrigada ao meu grande amor, Marcos Paulo, a quem admiro muito. Obrigada pela paciência, pelo carinho, pela preocupação, pelos conselhos e claro pelo amor. Obrigada pela companhia ao laboratório nos finais de semana, pelas idas ao Meliponário, principalmente sábado à noite, obrigada pelas várias vezes que me buscou e me esperou para almoçar. Obrigada sempre, por estar ao meu lado!

Obrigada aos meus avós Sônia, Luzia e Jamiro que sempre incentivaram minhas escolhas. Obrigada pelos elogios e preocupações!

Obrigada à minha família e à família do meu namorado, pelo incentivo e apoio às minhas escolhas profissionais.

Obrigada à minha orientadora, Ana Maria Bonetti, que me deu a oportunidade de estagiar em seu laboratório e permitir que todo esse trabalho se realizasse. Obrigada pelos ensinamentos, pelos conselhos, pelas opiniões e principalmente pela amizade!

Obrigada ao Dr. Kerr, grande iniciador do estudo com abelhas. Obrigada pelos conhecimentos a mim repassados. Obrigada pela sua simplicidade, humildade e ajuda!

Obrigada à Dona Lígia, que sempre nos recebeu em sua casa onde íamos cuidar das abelhas. Obrigada pelos sucos e doces oferecidos!

Obrigada ao mestrando Carlos pelo grande auxílio prestado durante o trabalho, pelas opiniões, sugestões e contribuições.

Obrigada à doutoranda Milla, quem me ensinou tudo sobre esterases.

Obrigada à Juliana, que me acompanha desde que entrei no laboratório e que me ensinou muito sobre a técnica de LIS-SSCP.

Obrigada à doutoranda Rosana pelas grandes contribuições a esse trabalho e pelos seus ensinamentos.

Obrigada aos meus amigos do Laboratório de Genética: Flávia, Cristina, Soraya, Rosana, Alcione, Vânia, Vanessa, Marcolino, Cícero, Narcisa, Luciana, Tiago, André e Dona Norita pelo aprendizado, pelas ajudas prestadas, pelos conselhos, pelas opiniões e pela companhia.

Obrigada às minhas amigas Cynara e Lorena, que sempre estiveram comigo. Obrigada Cy por todo apoio e amizade dentro e fora do laboratório. Obrigada Lorena pela grande amizade que aqui se iniciou e pela companhia em todos nossos anos de faculdade.

Obrigada à Cristiane, Maria Luisa e Marília pela amizade, pelo consolo, pelas conversas, pelos jantares, pelos lanches, pelas risadas,... e é claro pela diversão!

Obrigada aos meus colegas da 54^o Turma de Ciências Biológicas. Obrigada por esses anos compartilhados e pelo companheirismo. Desejo sucesso na carreira de Biólogos!

Obrigada à CNPq pela bolsa de Iniciação Científica.

Obrigada à CAPES, FAPEMIG e UFU pelo apoio financeiro.

RESUMO

A técnica de *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) foi desenvolvida como forma de detectar mutação em fita simples de DNA. As esterases pertencem a um grupo de enzimas que hidrolisam preferencialmente ésteres de ácidos carboxílicos. É uma técnica que pode ser utilizada para caracterizar a variabilidade genética de populações naturais, estudando o fluxo gênico e os processos de hibridação. Com o objetivo de comparar populações de *Melipona scutellaris*, introduzidas no Meliponário Uberlândia, Uberlândia-MG, em diferentes períodos de tempo, colônias K, introduzidas em 1987 e colônias AB e N, introduzidas em 1999 e 2000, respectivamente, utilizou-se a técnica de LIS-SSCP para analisar polimorfismo na região 16S mtDNA e análise de esterases por hidrólise aos substratos α e β naftil-acetatos. Os resultados mostram que não houve polimorfismo pela técnica de LIS-SSCP entre as colônias, embora houvesse nítidas diferenças morfológicas e comportamentais entre elas. Na análise da atividade esterásica foram detectadas quatorze bandas, denominadas de EST1 a EST14. Os resultados obtidos mostram que houve variações com relação à frequência e à presença das regiões esterásicas entre os grupos estudados, e ainda apontam para variações dentro de cada grupo, o que sugere a ocorrência de fluxo gênico entre eles.

UNITERMOS: *Melipona scutellaris*, LIS-SSCP, esterases

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Abelha sem ferrão	1
1.2 O DNA mitocondrial (mtDNA)	3
1.3 <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i> – SSCP	5
1.4 Considerações sobre Isoenzimas e Esterases	6
2. OBJETIVOS	9
3. Material e Métodos	10
3.1 Material Biológico	10
3.2.1 – <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i> – SSCP	12
3.2.1.a) Extração do DNA	12
3.2.1.b) Amplificação do DNA	13
3.2.1.c) Visualização dos resultados	13
3.2.1 – Esterases	14
3.2.1.a) Preparo das Amostras	14
3.2.1.b) Preparo dos Géis	16
3.2.2.c) Condições de Eletroforese	17
3.2.2.d) Identificação das Esterases	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i> – SSCP	18
4.2 Esterases	23
5. CONCLUSÃO	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Sequência do par *primers* 16S mtDNA de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae, Apinae).....pág. 13
- Tabela 2:** Gel de poliacrilamida 12% não desnaturante para LIS-SSCP.....pág. 14
- Tabela 3:** Preparo da curva padrão BSA.....pág. 15
- Tabela 4:** Mini-Gel de Separação 12%, não desnaturante.....pág. 16
- Tabela 5:** Mini-Gel de Empilhamento 4% não desnaturante.....pág. 16
- Tabela 6:** Representação da presença ou ausência das regiões esterásicas (EST1 à EST7) nas colônias analisadas.....pág. 32
- Tabela 7:** Representação da ausência ou não das regiões esterásicas (EST8 à EST14) nas colônias analisadaspág. 32
- Tabela 8:** Frequência das regiões com atividade esterásica nas colônias analisadas.....pág. 33
- Tabela 9:** Frequência das regiões esterásicas.....pág. 34
- Tabela 10:** Frequência das regiões esterásicas entre os grupos analisados.....pág. 35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).....pág. 2
- Figura 2:** Genoma mitocondrial completo de *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).pág. 5
- Figura 3:** Diferenças morfológicas (diferentes colorações do tórax) entre grupos de *Melipona scutellaris*.pág. 8
- Figura 4:** Mapa geográfico do Estado da Bahia, destacando os municípios de origem das abelhas em estudo.....pág. 10
- Figura 5:** Material biológico em estudo.....pág. 11
- Figura 6:** Extração de DNA segundo protocolo SHEPPARD *et al.* (1992) visualizada em gel de agarose 1%.....pág. 21
- Figura 7:** Amplificação do 16S mtDNA de *Melipona scutellaris* visualizada em gel de agarose 1,5%.....pág. 21
- Figura 8:** Perfil eletroforético da região 16S mtDNA de *Melipona scutellaris* em gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata.....pág. 22

Figura 9: Perfil eletroforético da atividade esterásica dos indivíduos das colônias de *Melipona scutellaris* submetidos a coloração com β -naftil acetato.....pág. 26

Figura 10: Zimograma representativo das regiões esterásicas dos indivíduos das colônias de *Melipona scutellaris* submetidos a coloração com β -naftil acetato.....pág.27

Figura 11: Perfil eletroforético da atividade esterásica dos indivíduos das colônias de *Melipona scutellaris* submetidos a coloração com α -naftil acetato.....pág. 28

Figura 12: Zimograma representativo das regiões esterásicas dos indivíduos das colônias de *Melipona scutellaris* submetidos a coloração com α -naftil acetato.....pág. 29

Figura 13: Perfil eletroforético da atividade eterásica dos indivíduos das colônias de *Melipona scutellaris* submetidos a coloração com α -naftil acetato e β -naftil acetato.....pág. 30

Figura 14: Zimograma representativo das regiões esterásicas dos indivíduos das colônias de *Melipona scutellaris* submetidos a coloração com α -naftil acetato e β -naftil acetato.....pág. 31

Figura 15: Representação da frequência das regiões com atividade esterásica nas colônias analisadas.....pág. 33

Figura 16: Representação da frequência das regiões esterásicas.....pág. 34

Figura 17: Frequência das regiões com atividade esterásica no grupo K (introduzidas no Meliponário em 1987).....pág. 35

Figura 18: Frequência das regiões com atividade esterásica no grupo AB (introduzidas no Meliponário em 1999).....pág. 36

Figura 19: Frequência das regiões com atividade esterásica no grupo N (introduzidas no Meliponário em 2000).....pág. 36

1. INTRODUÇÃO

1.1 Abelha sem ferrão

As abelhas sem ferrão pertencem à família Apidae, que está subdividida em quatro subfamílias: Apinae, Meliponinae, Bombinae, Euglossinae (KERR *et al.* 1996). A subfamília Meliponinae divide-se em duas tribos, Trigonini, com diversos gêneros e Meliponini, com apenas o gênero *Melipona* (KERR, 1948; MOURE, 1970; KERR *et al.* 1996). Em Meliponinae estão descritos 52 gêneros com mais de 300 espécies, espalhadas em todo o mundo. Os povos pré-colombianos já conheciam as abelhas sem ferrão e as domesticaram, dando-lhes nomes que ainda hoje persistem na cultura popular brasileira como, jataí, urucu, tiúba, mombuca, irapuá, tataíra, jandaíra, guarupu, manduri.

As abelhas são parte integrante do ecossistema da região em que vivem. Sua principal função na natureza é a polinização das flores e, conseqüentemente, produção de sementes e frutos. As abelhas brasileiras sem ferrão são responsáveis por 40 a 90% da polinização das árvores nativas; as restantes são polinizadas por abelhas solitárias, borboletas, coleópteros,

morcegos, aves, alguns mamíferos, água, vento e pelas abelhas africanizadas (KERR *et al.* 1996).

Para a implantação de um Meliponário, local onde são mantidas as colméias de meliponídeos, devem ser considerados vários fatores importantes tais como: local onde haja florada, água, sol e sombreamento em proporção adequada e, principalmente, considerar o número de colméias ali colocadas o que é importante para que não se perca a variabilidade genética devido ao endocruzamento, com conseqüente morte das colônias. Esse número corresponde ao mínimo de 44 colônias de uma mesma espécie, em um mesmo local. Esse número de colônias foi determinado em função do sistema de determinação do sexo e de acasalamento dos Meliponíneos (YOKOYAMA & NEI, 1979).



Figura 1: Abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).

A abelha sem ferrão, popularmente conhecida como Uruçu do Nordeste, que se constitui no objeto de estudo para as informações desse trabalho, pertence à espécie *Melipona scutellaris* (Figura 1) e tem se mostrado um excelente material biológico para análises genéticas devido ao seu mecanismo peculiar de determinação de castas, que se faz por fatores

genético-alimentares, o que difere do padrão apresentado por outros Apidae. Ela é encontrada da Bahia até o Rio Grande do Norte ocupando, principalmente, a Zona da Mata (CARVALHO, 1996).

A Uruçu do Nordeste foi domesticada pelos índios Potiguara, Xiriri, Xucuru, Pataxo, Paiaku, Tupirucuba, Caeté, Aymore e outros do Nordeste, com técnicas de cultivo que foram, imediatamente, passadas aos lavradores portugueses (KERR *et al.* 1996).

Considerando-se que estas abelhas estão intrinsecamente ligadas à polinização de espécies vegetais que compõem a diversidade da flora brasileira, torna-se importante conhecer sua biologia e os mecanismos genéticos envolvidos no seu desenvolvimento para contribuir com a sua preservação e conseqüente preservação da biodiversidade.

1.2 O DNA mitocondrial (mtDNA)

Desde as décadas de 70-80, do século passado, a molécula do DNA mitocondrial (mtDNA) passou a fazer parte de muitos, senão da maioria dos estudos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas e o entendimento de vários aspectos biológicos e evolutivos de uma grande variedade de organismos (WILSON *et al.* 1985; AVISE *et al.* 1987; MORITZ *et al.* 1987; AVISE, 1994).

Uma das características mais intrigantes do genoma mitocondrial diz respeito a sua origem. Embora ainda controversa, a teoria do endossimbionte tem sido a mais aceita para a explicação da origem da mitocôndria e do seu genoma. Essa teoria baseia-se em que uma célula eucariótica teria fagocitado uma α -protobactéria e esta se diferenciado em mitocôndria (GRAY *et al.* 2001).

Muitas características genéticas e estruturais do genoma mitocondrial têm atraído os pesquisadores. Dentre elas podemos citar: é um genoma pequeno (aproximadamente 16 kb

nos animais) e circular, com raras exceções; apresenta herança materna e ausência de recombinações, também com exceções; possui poucos genes, 37 no total (13 genes codificadores de proteínas, 22 para RNA transportador e 2 para subunidades ribossômicas); possui uma região não codificadora, conhecida como D-Loop (em vertebrados e equinodermas) ou região rica em A+T (invertebrados), que parece exercer o controle da replicação e transcrição do mtDNA; é considerado como um genoma compacto pois, raramente, possui seqüências espaçadoras, seqüências repetitivas, pseudogenes e introns e a taxa evolutiva, ou seja, de substituições de base é muito alta, quando comparada ao genoma nuclear.

O emprego do mtDNA em estudos populacionais e evolutivos se vale, principalmente, do fato dele possuir uma alta taxa de substituições de base e apresentar alterações no tamanho total da molécula devido a inserções e deleções, principalmente na região rica em A+T. Várias metodologias têm sido aplicadas com o intuito de se caracterizar esse genoma e/ou encontrar variabilidade genética entre populações ou espécies (ARIAS *et al.* 2003) sendo um dos métodos de análise, o SSCP.

Dentre os Hymenoptera, o genoma mitocondrial completo de *Apis mellifera* foi obtido em 1993 (CROZIER & CROZIER, 1993). Assim como o de *Melipona bicolor* (Figura 2) que também foi completamente seqüenciado (NCBI...2004).

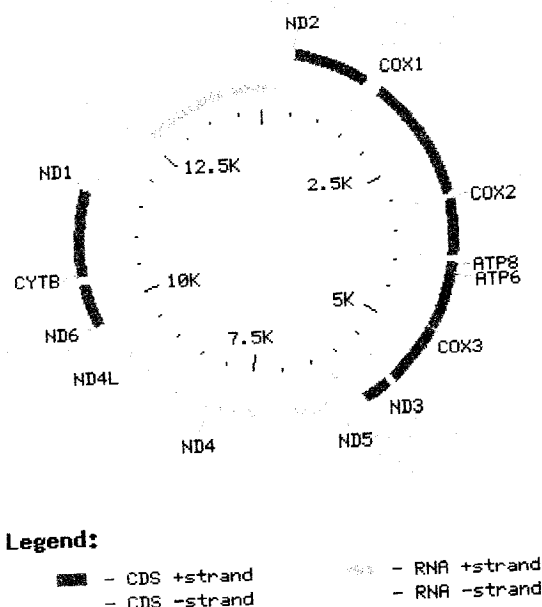


Figura 2: Genoma mitocondrial completo de *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). SILVESTRE & ARIAS (2003) em Gene bank: NC 004529 (NCBI...2004).

1.3 *Single Strand Conformation Polymorphism* – SSCP

A técnica de *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) foi desenvolvida por ORITA *et al.* (1988), como forma de detectar mutação em fita simples de DNA. MARUYA *et al.* (1996) otimizaram a técnica, propondo o uso de um tampão de desnaturação composto por uma solução de baixa força iônica (LIS), a base de sacarose. Por isso a técnica passou a ser denominada de *Low Ionic Strength Single-Strand Conformation Polymorphism* (LIS-SSCP). As fitas desnaturadas adquirem uma nova conformação e alcançam uma nova estabilidade de acordo com a sua seqüência específica e peso molecular, o que confere uma migração diferencial em gel de poliacrilamida, produzindo um Polimorfismo Conformacional de Fita Simples.

Por meio da técnica de SSCP, analisamos um fragmento de, aproximadamente, 600 pares de base (pb) da região 16S mtDNA, para comparar populações de *Melipona scutellaris* introduzidas em 1999 e 2000, com populações mantidas no Meliponário Uberlândia desde 1987.

1.4 Considerações sobre Isoenzimas e Esterases

Isoenzimas são as diversas formas moleculares de uma enzima, presentes em um indivíduo. São marcadores importantes no campo da pesquisa básica e aplicada. O princípio básico da técnica de eletroforese de isoenzimas reside no uso de gel de amido ou poliacrilamida e na visualização do produto enzimático por métodos histoquímicos. É uma técnica que pode ser utilizada para caracterizar a variabilidade genética de populações naturais, estudar o fluxo gênico entre populações, os processos de hibridação natural e, ainda, permite analisar os resultados de cruzamentos entre indivíduos com fenótipos diferentes e examinar F1 e outras gerações, para concluir sobre processos de especiação (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

O controle genético das isoenzimas ocorre por meio de vários genes, que podem ser alelos de um mesmo *locus* ou estarem situados em diferentes *loci*. As isoenzimas permitem uma avaliação rápida, acessível e direta, por meio da visualização do fenótipo molecular das esterases de um determinado número de marcadores genéticos (HAMRICK, 1982).

As esterases pertencem a um grupo de enzimas que hidrolisam preferencialmente ésteres de ácidos carboxílicos, podendo atuar também sobre outros substratos que contenham ligações amidas (OAKESHOTT *et al.* 1993).

Atualmente vem sendo amplamente estudadas com a finalidade de esclarecer melhor seu papel biológico durante o desenvolvimento dos insetos. Dentre esses estudos, destacam-se aqueles que visam a classificação dessas enzimas por meio de dois sistemas: especificidade por substratos e inibidores de esterases (ANDRADE, 2000).

Estas enzimas são classificadas, com base na sensibilidade a diferentes inibidores, em quatro classes:

1. Arilesterases: inibidas somente por agentes sulfidrílicos e cátions metálicos bivalentes como Hg^{+2} e o Cu^{+2} e, geralmente, preferem substratos aromáticos;
2. Carboxilesterases: inibidas somente por organofosforados, com preferência por ésteres alifáticos de cadeia longa;
3. Colinesterases: inibidas por organofosforados e sulfato de eserina, com preferência por substratos carregados (como ésteres de colina);
4. Acetilesterases: não são afetadas por nenhum dos inibidores e, geralmente, preferem substratos alifáticos, derivados do ácido acético.

As esterases possuem ampla especificidade de substratos e são as enzimas mais polimórficas em insetos e outros organismos. Nos insetos, as esterases são sintetizadas pelo corpo gorduroso e são encontradas na hemolinfa e em outros tecidos.

CONTEL & MESTRINER (1974) descreveram o primeiro polimorfismo dos Meliponíneos, no locus EST3 de *Melipona sunitida* e *Melipona quadrifasciata*. Depois disso, uma grande quantidade de informações sobre polimorfismos de populações têm sido descritas para o grupo.

Estas enzimas podem, também, estar relacionadas com outras atividades fisiológicas, como a regulação dos níveis de Hormônio Juvenil (HIDAYAT & GOODMAN, 1994); processos digestivos (ARGENTINE & JAMES, 1995) e no comportamento reprodutivo (LABATE *et al.* 1990).

Os dados de literatura mostram que essas enzimas têm sido detectadas em todas as fases do desenvolvimento e em muitos tecidos dos insetos, o que demonstra a importância desta classe de enzimas no desenvolvimento normal desses organismos e reforça a relevância de novos estudos nesta área (BONETTI, 1982; CERON, 1988; RITZ, 1997).

Em abelhas, alguns estudos sobre o padrão de esterases durante o desenvolvimento foram conduzidos. BONETTI (1990) investigou o perfil eletroforético das formas esterásicas presentes na hemolinfa durante estágios do desenvolvimento ontogenético em operárias e rainhas de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, que receberam ou não tratamento com Hormônio Juvenil (HJ).

Esse estudo originou-se da observação de diferenças morfológicas (Figura 3) registradas por TANNÚS-NETO (2001) referentes à coloração das nervuras das asas, dos pêlos do tórax, do ecutelo, do clipeo, dos olhos, da tíbia e das corbículas, além de diferenças comportamentais, evidenciadas pela diferença de defensividade quando da revisão periódica das colméias, entre as colônias K e as mais recentes (AB e N) analisadas neste estudo.

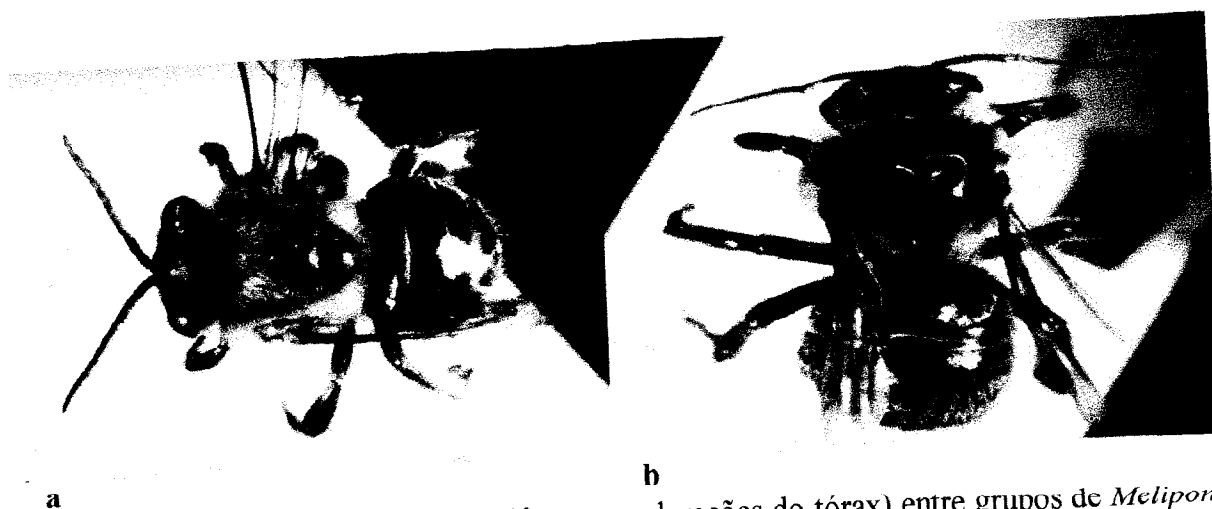


Figura 3: Diferenças morfológicas (diferentes colorações do tórax) entre grupos de *Melipona scutellaris*. Colônias K (a) e colônias AB e N (b).

2. OBJETIVOS

1 – Analisar, por meio da técnica de *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP), um fragmento de aproximadamente 600 pares de base (pb) da região 16S mtDNA, para comparar populações de *Melipona scutellaris* introduzidas em 1999 e 2000, com populações mantidas no Meliponário Uberlândia desde 1987.

2 – Comparar o perfil eletroforético de esterases entre populações de *Melipona scutellaris* mantidas no Meliponário Uberlândia desde 1987 com populações introduzidas em 1999 e 2000.

3. Material e Métodos

3.1 Material Biológico

Foram utilizadas abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris*, provenientes de Catu (litoral da Bahia – S 12° 21'; W-GR 38° 23'); Lençóis (Chapada Diamantina-Bahia – S 12° 34'; W-GR 41°23'); Piatã-Bahia (200Km a oeste de Lençóis - Bahia); e de Andaraí (Chapada Diamantina – Bahia), segundo mostra a Figura 4, e que são mantidas no Meliponário Uberlândia (Uberlândia-MG – S 18° 55'; W-GR 48° 17').

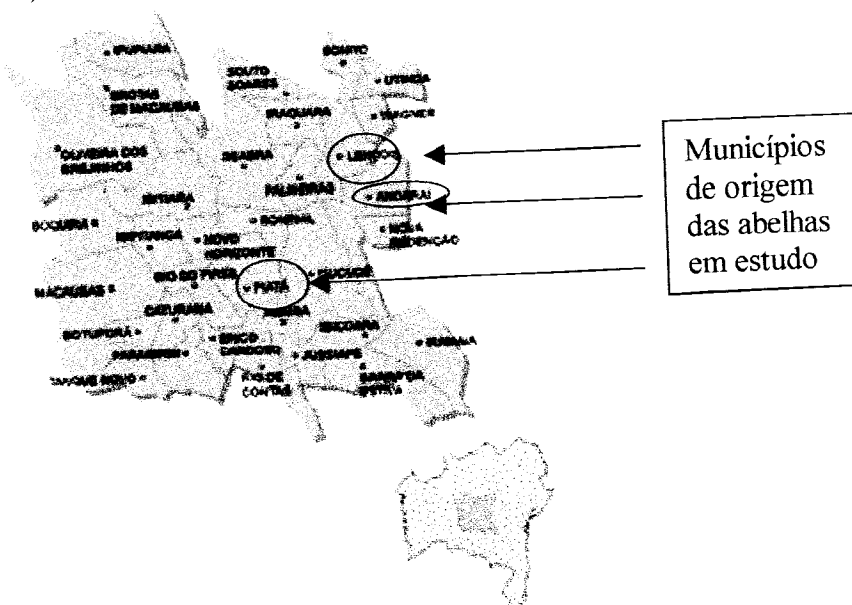


Figura 4: Mapa geográfico do Estado da Bahia, destacando os municípios de origem das abelhas em estudo.

As abelhas utilizadas nesse estudo (Figura 5) foram divididas em três grupos, de acordo com o período em que foram introduzidas no Meliponário: colônias K que estão no Meliponário desde 1987, colônias AB, mantidas no Meliponário desde Agosto de 1999 e colônias N, que passaram a integrar o Meliponário em Outubro de 2000.

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Genética do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

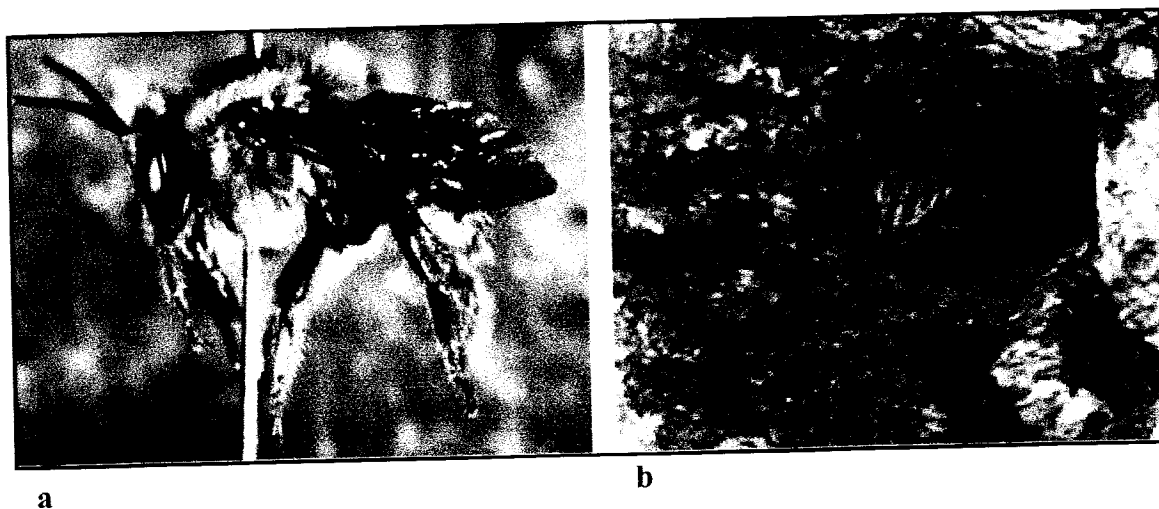


Figura 5: Material biológico em estudo. *Melipona scutellaris* (a) e a entrada de uma colméia de *M. scutellaris* (b).

3.2 Métodos

3.2.1 – *Single Strand Conformation Polymorphism* – SSCP

3.2.1.a) Extração do DNA

Foram feitos bulks com cinco indivíduos de cada colônia em estudo. As abelhas foram coletadas na entrada de cada colméia e conservadas no ultrafreezer a -80°C , até o momento da extração do DNA que foi realizada segundo protocolo SHEPPARD *et al.* (1992).

Em cadinhos de porcelana, macerou-se a abelha (somente o tórax e cabeça) em nitrogênio líquido e com 600 μl de tampão de Grinding (Tris 10mM, NaCl 60mM, Sacarose 30mM, EDTA 10mM). Depois de macerados, foram transferidos para eppendorf de 2ml no qual acrescentou-se 600 μl de tampão de Lise (Tris 300mM, SDS 40mM, EDTA 20mM, DEPEC 0,7%). Em seguida, adicionou-se 10 μl de proteinase K (10mg/ml) e os eppendorfs foram mantidos em banho-maria à 45°C por 45min. Acrescentou-se 10 μl de RNase (10mg/ml) e novamente manteve-se as amostras em banho-maria a 37°C por 1h. Procedeu-se com duas lavagens sucessivas com fenol, a fim de retirar o excesso de proteínas da abelha e em seguida à duas lavagens com clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico – 24:1) seguidas do acréscimo de 1/10 do volume de NaCl 2M, completando-se o volume com etanol 100% gelado. Incubou-se o DNA por 2h ou “overnight” para a precipitação. Os DNAs foram centrifugados por 15min a 13.000g, lavados com etanol 70% e secos ao ar. Em seguida, ressuspendeu-se em 70 μl de água destilada.

O DNA foi quantificado em absorbância a 260nm em espectrofotômetro Hitachi U-2000 e sua qualidade avaliada submetendo-se 5 μl do DNA à eletroforese em gel de agarose 1% (SAMBROOK *et al.* 1989).

3.2.1.b) Amplificação do DNA

Constatada a qualidade do DNA, as reações de amplificação foram processadas com: 50ng de DNA, 6pmoles de cada *primer* 16S (Tabela 1), 2mM de MgCl₂, 1U de DNA polimerase, tampão 1X e 100µM de cada dNTPs, nas condições: 94°C a 5min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30s, 48°C por 30s e 72°C 1min, seguidos de 72°C por 10min. Para verificar a eficiência das amplificações e possíveis contaminações submeteu-se 5µl de cada reação a gel de agarose 1,5% por 2h de migração a 150V.

<i>Primers</i>	Seqüência 5' → 3'
16S mtDNA	TTATTCACCTGITTATCAAACAT TATAGATAGAAACCAAYCTG

Tabela 1: Seqüência do par de *primers* 16S mtDNA de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae, Apinae).

3.2.1.c) Visualização dos resultados

Os produtos das amplificações foram preparados para desnaturação num volume final de 20µl, sendo 5µl do produto de PCR e 15µl de tampão LIS-SSCP (10% de sacarose, 0,01% de azul de bromofenol, 0,01% de xileno cianol e água para ajustar o volume final).

Em seguida, procedeu-se a desnaturação das amostras a 95°C por 5min e separação em gel de poliácridamida 12% por 18h a 15mA.

Os géis (Tabela 2) foram preparados em placas de vidro 17,5cm por 23cm, com espaçadores de a 0,7mm.

COMPONENTE	VOLUME
Água deionizada	9ml
Acrilamida – Bis-acrilamida (49:1)	9ml
Tampão TBE 5X	4,5ml
Persulfato de amônio 10%	0,192ml
Temed	0,0096ml

Tabela 2: Gel de poliacrilamida 12% não desnaturante para LIS-SSCP.

Os resultados no gel foram visualizados por coloração com nitrato de prata de acordo com BLUM *et al.* (1987), com modificações de BASAM *et al.* (1991).

Os géis foram colocados em solução de ácido acético por 10min e, em seguida, lavados 2 vezes por 2min em água destilada. Posteriormente foram imersos em solução 0,012M de nitrato de prata e 0,056% de formaldeído por 20min e novamente lavados 2 vezes por 30s em água destilada.

A revelação ocorreu com solução gelada 0,28M de carbonato de sódio anidro, 0,056% de formaldeído e 4 μ M de tiosulfato, até o aparecimento das bandas no gel. A reação foi paralisada com ácido acético glacial 10%.

3.2.1 – Esterases

3.2.1.a) Preparo das Amostras

As abelhas foram coletadas na entrada das colméias em estudo (colônias K, AB e N) e estocadas à -80°C até o momento da análise. Foi utilizado um indivíduo de cada colméia, sendo que cada abelha foi macerada em cadinho de porcelana com auxílio de bastão de vidro, em nitrogênio líquido solubilizada em 400 μ l de tampão de amostra (fosfato de sódio 0,01M, pH 6,5, contendo glicerol a 10%, azul de bromofenol a 0,001%, sacarose a 20%, EDTA

0,001M e Triton X-100 a 0,5%) e submetidas à centrifugação a 10000rpm por 10min a 4° C e, posteriormente, coletados os sobrenadantes.

A dosagem de proteínas foi realizada com base no princípio proteína-corada, de acordo com BRADFORD (1976). Nesse método, utilizou-se soroalbumina bovina (BSA) como proteína padrão.

A curva padrão BSA foi definida inicialmente como mostra a Tabela 3.

Tubos	Volume BSA	Volume H ₂ O	Volume Final
1	-	10 µl	100µl
2	5µl	95 µl	100µl
3	10 µl	90 µl	100µl
4	15 µl	85 µl	100µl
5	20 µl	80 µl	100µl
6	25 µl	75 µl	100µl
7	30 µl	70 µl	100µl

Tabela 3: Preparação da curva padrão BSA.

A cada um dos tubos foi adicionado 3ml de reagente de Bradford. A leitura em espectrofotômetro (HITACHI U-2000 Spectrophotometer) a 595nm, foi feita depois de, no mínimo, 2min, tempo suficiente para o reagente de Bradford sensibilizar as amostras.

Todas as amostras, incluindo a curva padrão, foram feitas em duplicatas e utilizou-se os valores das médias aritméticas das amostras.

A equação da reta foi obtida utilizando-se o programa EXCEL (MICROSOFT OFFICE 2000) e as médias das leituras das amostras foram substituídas, nessa equação, para se obter a concentração de proteína de cada amostra. A partir da quantificação padronizou-se a concentração das amostras utilizadas. Foram aplicados 100µg de cada amostra em gel de poliacrilamida nativo para análise.

3.2.1.b) Preparo dos Géis

Foram preparados Mini-Géis de Separação 12% não desnaturante, em placa de vidro de 12cm x 16,5cm, conforme a Tabela 4.

COMPONENTES	VOLUMES
Água deionizada	5,0 ml
Acrilamida - Bis-acrilamida (30:0,8)	5,2ml
Tampão TRIS-HCL 1,5M pH 8,8	2,6ml
Persulfato de amônia 10%	0,200ml
Temed	0,020ml

Tabela 4: Mini-Gel de Separação a 12%, não desnaturante.

Na Tabela 5 estão sumariados os volumes de água e soluções estoque necessários para o preparo do Mini-Gel de Empilhamento 4%, não desnaturante.

COMPONENTES	VOLUMES
Água deionizada	3,0ml
Acrilamida-Bis-acrilamida (30:1,6)	0,675ml
Tris-HCL 0,5M (Ph 6,8)	1,25ml
Persulfato de amônio 10%	0,075ml
Temed	0,020ml

Tabela 5: Mini-Gel de Empilhamento 4% não desnaturante.

3.2.2.c) Condições de Eletroforese

Os géis foram submetidos a uma pré-corrida de 1h a 150V e, posteriormente, a 200V por 3h. Os compartimentos superior e inferior da cuba foram preenchidos com Tampão Tris-Glicina (Tris 0,0125M, Glicina 0,096M) pH 8,3.

3.2.2.d) Identificação das Esterases

A identificação das bandas com atividade esterásica, nos géis, baseou-se nos métodos de coloração de acordo com STEINER & JOHSON (1973) citado em CERON (1988), com pequenas modificações. Os géis foram pré-incubados à temperatura ambiente em 100ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 6,2 por 20min. Após esse período, foram submetidos à coloração por 45min à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. A solução de coloração foi preparada com 50mg de β -naftil acetato e/ou 50mg de α -naftil acetato, dissolvidos em 1ml de acetona e misturados com uma solução recém-preparada e filtrada, contendo 100ml de tampão fosfato e 100mg de Fast Blue RR Salt (SIGMA). As atividades das α e β esterases foram visualizadas nos géis como bandas de coloração preta e vermelha, indicando a hidrólise preferencial do α ou do β naftil-acetato, respectivamente, ou ambos, dependendo do substrato utilizado. Após a coloração, os géis foram tratados com 100ml de solução de descoloração contendo álcool etílico comercial: ácido acético: glicerol (250:100:15) diluídos em 1L de água, por 24 a 48h. Após a descoloração, os géis foram prensados entre folhas de papel celofane, fixados por garras e deixados secar a temperatura ambiente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *Single Strand Conformation Polymorphism* – SSCP

A Figura 6 apresenta as amostras de DNA extraídas segundo protocolo SHEPPARD *et al.* (1992) e que foram visualizadas em gel de agarose 1%. A concentração média de DNA extraído nas amostras foi de 415,16ng/μl. A qualidade do DNA foi boa, o que possibilitou a continuação do experimento.

O padrão de amplificação do 16S mtDNA foi visualizado em gel de agarose 1,5% (Figura 7).

A Figura 8 mostra o resultado da análise por LIS-SSCP de polimorfismo para o fragmento do 16S mtDNA entre as colônias K e colônias AB e N de *Melipona scutellaris*, nos quais não se verifica polimorfismo. Isso pode ser devido à baixa taxa de mutações nesse gene que, segundo a literatura, apesar ser considerado altamente conservada, já que codifica a subunidade maior do rRNA mitocondrial, os trabalhos citados neste estudo revelam que essa

região tem apresentado polimorfismo suficiente para separar subespécies ou até mesmo populações com auxílio da técnica de SSCP.

Pode se observar que houve o aparecimento de mais bandas que as duas esperadas pela técnica (Figura 8) mesmo não sendo vistas bandas inespecíficas no gel de agarose. Esses resultados podem ser explicados pelo uso de *primers* heterólogos.

Mesmo sendo obtidas bandas inespecíficas no gel de SSCP é possível notar que há um padrão de bandas que se conserva, demonstrando assim a ausência de polimorfismo para essa região do mtDNA em *Melipona scutellaris* entre os grupos analisados.

CARVALHO (2000) estudou 29 populações de *Melipona scutellaris*, proveniente de quatro Estados brasileiros onde essa espécie é nativa: Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, analisando a presença de polimorfismos do mtDNA por meio da técnica de SSCP. Os resultados obtidos assemelham-se aos encontrados nesse estudo, já que não houve nenhum polimorfismo entre as 29 populações analisadas.

No entanto, OLIVEIRA *et al.* (1999) utilizando a técnica de SSCP, mostraram polimorfismos no mtDNA em 30 amostras de *Tetragonisca angustula* ao longo da América Latina. Foram obtidos quatro haplótipos diferentes para um fragmento da subunidade 16S mtDNA. Os autores concluem que a técnica de SSCP foi eficiente na detecção de polimorfismos.

VASCONCELOS *et al.* (1998) também utilizando essa técnica, analisaram a ocorrência de polimorfismos no mtDNA em populações de *Melipona rufiventris*, conseguindo a diferenciação entre haplótipos. O mesmo foi obtido por COBO *et al.* (1999) em *Frieseomelitta varia*.

NASCIMENTO *et al.* (1999) analisando seis espécies de *Melipona* (*M. scutellaris*, *M. capixaba*, *M. compressipes*, *M. quadrifasciata*, *M. bicolor* e *M. rufiventris*) para a região 16S

mtDNA e gene COI-COII do mtDNA, usando a técnica SSCP, encontraram polimorfismos variáveis entre as espécies.

Outro resultado interessante com a técnica foi encontrado por VASCONCELOS *et al.* (1999) que conseguiram diferenciar as subespécies *M. quadrifasciata quadrifasciata* e *M. quadrifasciata anthidioides*.

As diferenças morfológicas e de defensividade entre os grupos de abelhas analisados nesse estudo, devem estar associadas a outros genes que essa técnica não permitiu analisar.



Figura 6: Extração de DNA segundo protocolo SHEPPARD *et al.* (1992) visualizada em gel de agarose 1%.

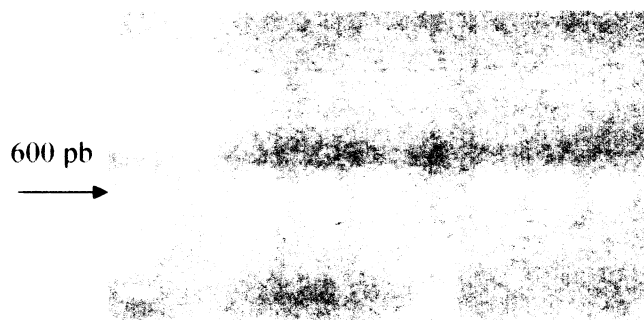


Figura 7: Amplificação do 16S mtDNA de *Melipona scutellaris* visualizada em gel de agarose 1.5%.

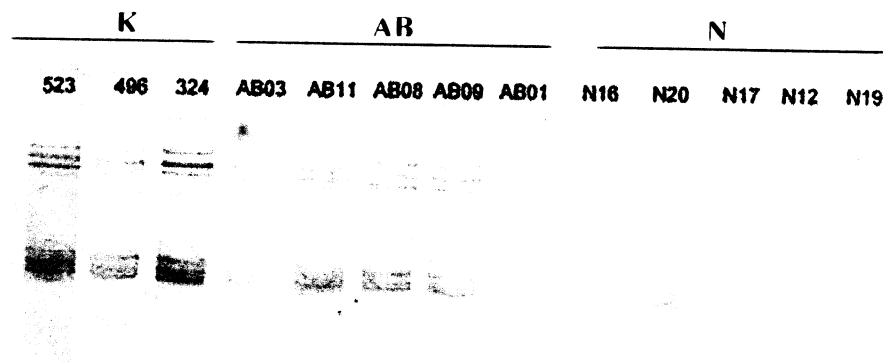


Figura 8: Perfil eletroforético da região 16S mtDNA de *Melipona scutellaris* em gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata. COLÔNIAS K: introduzidas no Meliponário em 1987; COLÔNIAS AB E N: introduzidas no Meliponário em 1999 e 2000, respectivamente.

4.2 Esterases

No presente trabalho, para identificação das esterases usamos como substratos o β -naftil acetato e o α -naftil acetato.

As Figuras 9 e 10 mostram o padrão de regiões esterásicas obtido quando os géis de poliacrilamida foram submetidos a coloração com o β -naftil acetato.

Nas Figuras 11 e 12 têm-se o perfil esterásico resultante da utilização do substrato α -naftil acetato.

Quando os géis foram submetidos à coloração utilizando os dois substratos simultaneamente, obteve-se o padrão apresentado nas Figuras 13 e 14.

Na análise do padrão de bandas esterásicas obtido, foram detectadas quatorze regiões com atividade esterásica, denominadas de EST1 à EST14, a partir da extremidade anódica do gel.

Do total de regiões analisadas, as EST1, EST8 e EST12 foram consideradas α esterases e as demais regiões foram consideradas α - β esterases, sendo que as regiões EST6, EST10, EST11 e EST14 foram consideradas α - β esterases com hidrólise preferencial para α -naftil acetato (Tabelas 6 e 7).

Essa situação é semelhante à encontrada na maioria dos organismos já analisados, os quais apresentam α e β esterases (RUIZ, 1995). Algumas espécies de *Drosophila* incluem-se nessa situação como por exemplo, em *D. mulleri* e *D. arizonensis* (CERON, 1988; NANYA, 1993); em *D. serido* (LAPENTA, 1992) e em *D. melanogaster* (WRIGHT & McINTYRE, 1963).

Na análise da frequência de atividade esterásica em cada colméia analisada (Figura 15) têm-se que nenhuma delas apresentou atividade esterásica de 100%, ou seja, nenhuma das colméias apresentou as quatorze regiões esterásicas encontradas nesse trabalho. Segundo a Tabela 8, a caixa N19 foi a que apresentou maior atividade esterásica com 78,57%, seguida pela caixa AB01, com 71,43%.

Provavelmente, tais resultados estejam relacionadas à maior defensividade, ou seja, uma maior agressividade quando da revisão periódica, que tais colméias apresentam.

Na Tabela 9 têm-se a frequência com que as regiões esterásicas foram encontradas nas amostras. Os resultados mostram que EST2, EST3, EST11, EST13 e EST14 foram as regiões que estiveram presentes em todas as caixas analisadas (Figura 16). Supõe-se que essas esterases são codificadas por genes estruturais e que provavelmente estão relacionadas a papéis fisiológicos importantes para os organismos nos quais foram encontradas.

Analisando a frequência das regiões esterásicas nos grupos K, AB e N (Tabela 10), observa-se que não há uma regularidade na distribuição das regiões esterásicas entre os grupos. No entanto, nota-se que a EST1 esteve presente apenas no grupo K, enquanto a EST8 esteve presente apenas no grupo N e a EST9 presente nos grupos K e AB estando ausente no grupo N.

Estas informações sugerem que a EST1 pode estar relacionadas às diferenças morfológicas e comportamentais existentes entre o grupo K e os grupos AB e N, enquanto que as EST8 e EST9 relacionadas às diferentes taxas de mortalidade que tais grupos apresentam em épocas do ano não favoráveis, como outono e inverno, nas quais há reduzida oferta de alimento e baixas temperaturas.

As Figuras 17, 18 e 19 representam a frequência das regiões esterásicas nos grupos K, AB e N, respectivamente.

Os resultados indicam que houve variações com relação à presença e à frequência das regiões esterásicas entre os grupos analisados. Também foram observadas variações dentro de cada grupo (K, AB e N) o que sugere a ocorrência de fluxo gênico entre os grupos introduzidos em diferentes períodos de tempo, já que tais grupos vem se mantendo em simpatria por, aproximadamente, 5 anos.

Varição intragrupo já foi identificada em humanos, por pesquisadores americanos da Universidade do Sul da Califórnia, por meio de análise de DNA, demonstrando que há mais diversidade em uma mesma população do que entre populações diferentes. Detectaram 93-95% de diferença em um mesmo grupo e 3-5%, entre diferentes populações.

Pesquisa de COSMIDES *et al.* (2003), mostrou que a variabilidade genética dentro de uma população é 10 vezes maior do que a variação entre populações, isto é, 2 indivíduos de uma mesma população diferem mais, geneticamente falando, do que membros de populações diferentes.

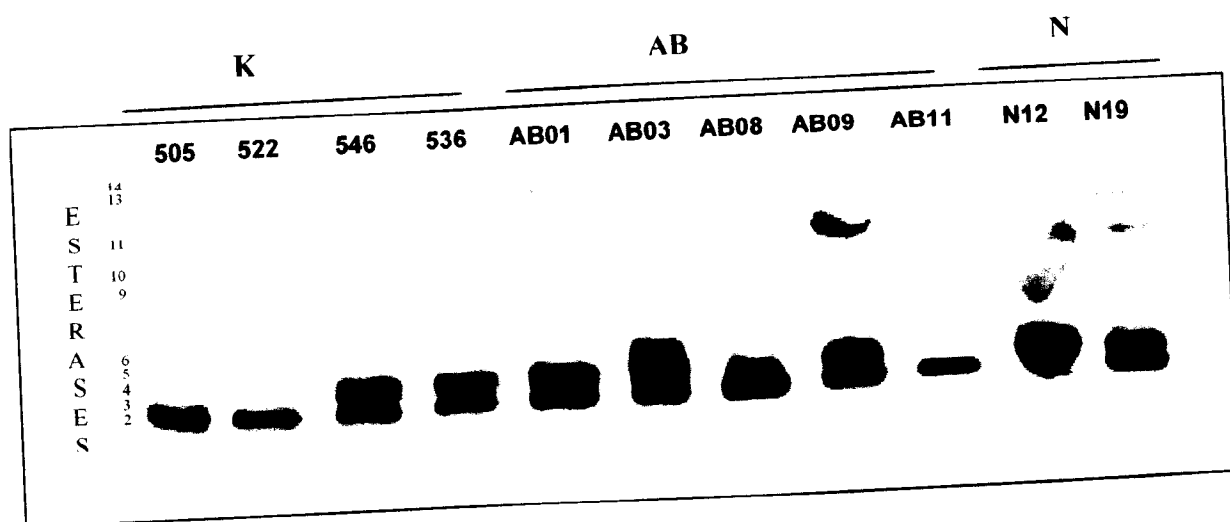


Figura 9: Perfil eletroforético da atividade esterásica dos indivíduos das colônias de *Melipona scutellaris* submetidos a coloração com β -naftil acetato. COLÔNIAS K: introduzidas no Meliponário em 1987; COLÔNIAS AB e N: introduzidas no Meliponário em 1999 e 2000, respectivamente. Gel de poliacrilamida (empilhamento 4% e de separação 12%).

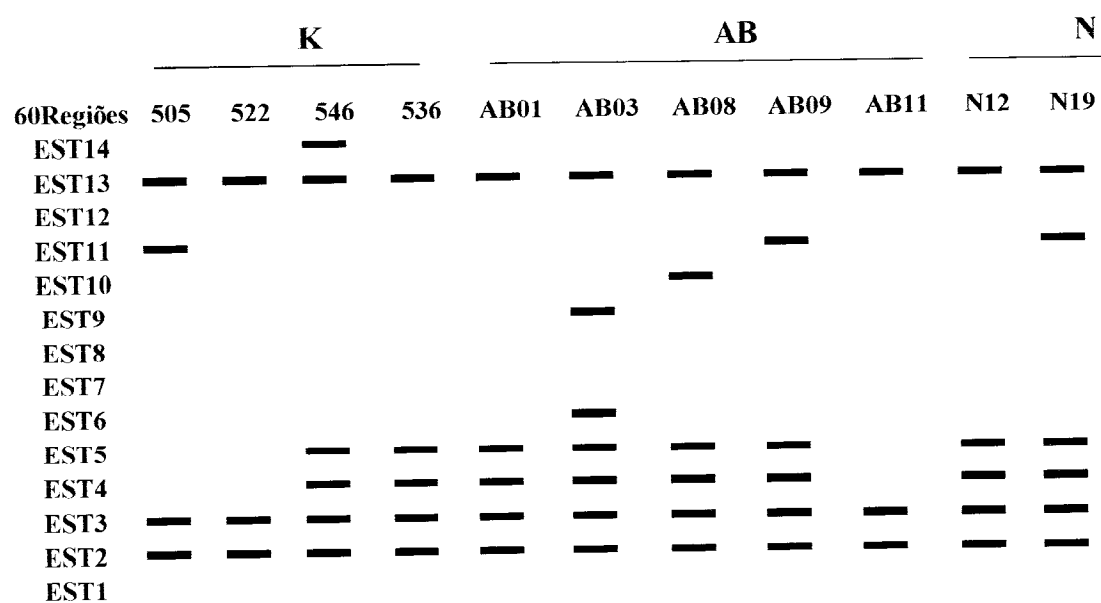


Figura 10: Zimograma representativo das regiões esterásicas dos indivíduos das colônias de *Melipona scutellaris* submetidos a coloração com β -naftil acetato. COLÔNIAS K: introduzidas no Meliponário em 1987; COLÔNIAS AB e N: introduzidas no Meliponário em 1999 e 2000, respectivamente.

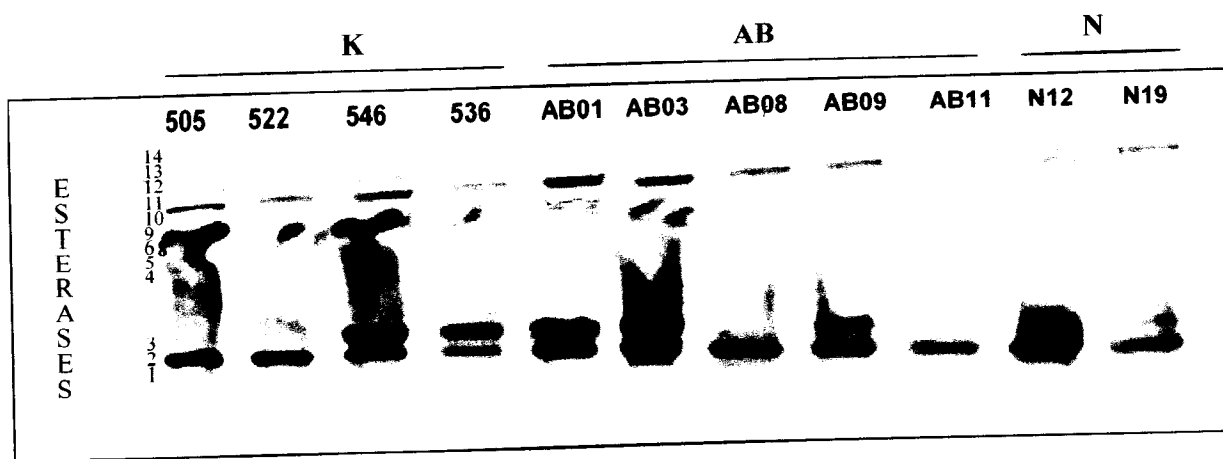


Figura 11: Perfil eletroforético da atividade esterásica dos indivíduos das colônias de *Melipona scutellaris* submetidos a coloração com α -naftil acetato. COLÔNIAS K: introduzidas no Meliponário em 1987; COLÔNIAS AB e N: introduzidas no Meliponário em 1999 e 2000, respectivamente. Gel de poliacrilamida (empilhamento 4% e de separação 12%).

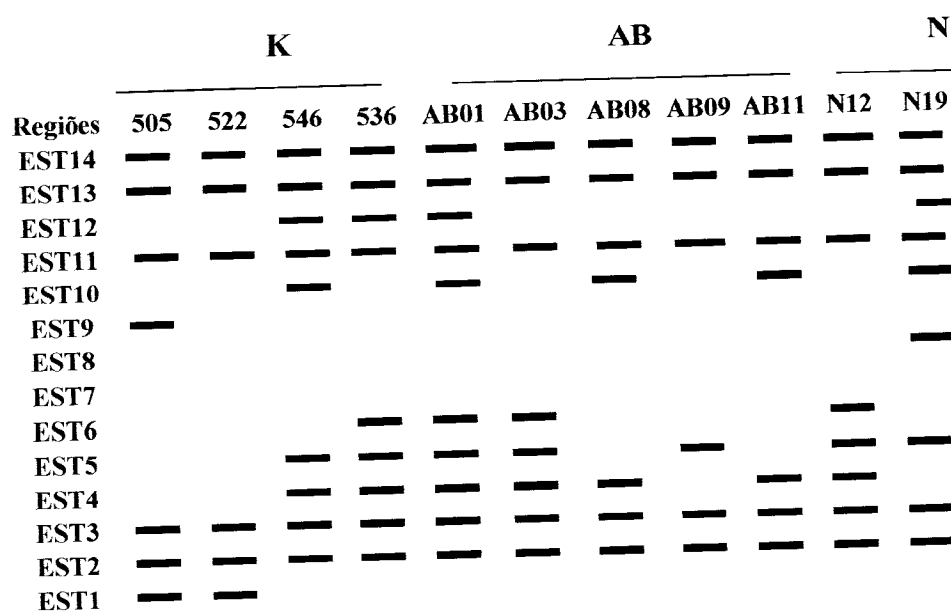


Figura 12: Zimograma representativo das regiões esterásicas dos indivíduos das colônias de *Melipona scutellaris* submetidos a coloração com α -naftil acetato. COLÔNIAS K: introduzidas no Meliponário em 1987; COLÔNIAS AB e N: introduzidas no Meliponário em 1999 e 2000, respectivamente.

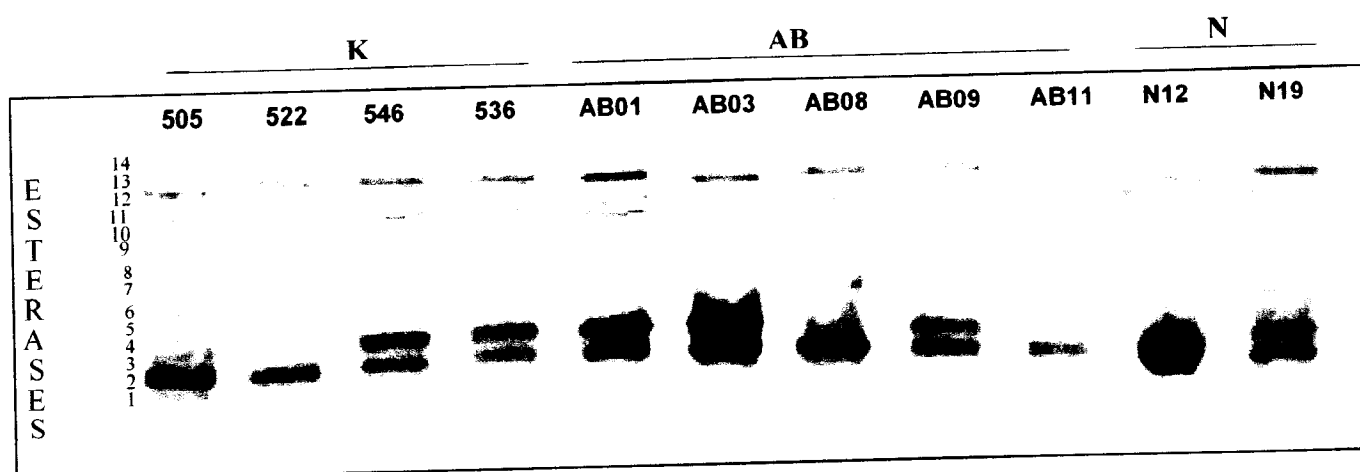


Figura 13: Perfil eletroforético da atividade esterásica dos indivíduos das colônias de *Melipona scutellaris* submetidos a coloração com α -naftil acetato e β -naftil acetato. COLÔNIAS K: introduzidas no Meliponário em 1987; COLÔNIAS AB E N: introduzidas no Meliponário em 1999 e 2000, respectivamente. Gel de poliacrilamida (empilhamento 4% e de separação 12%).

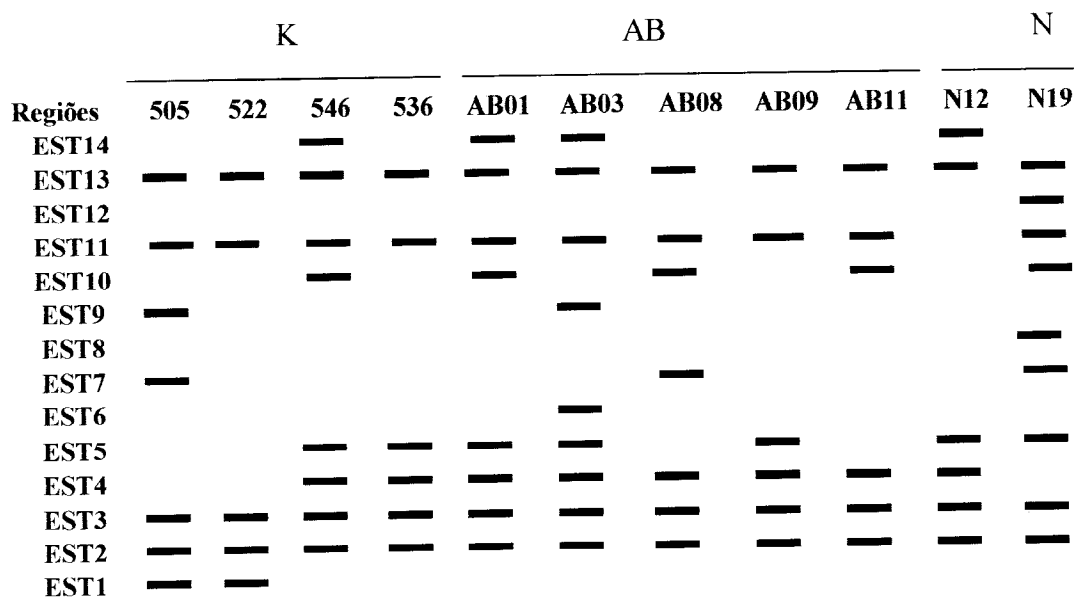


Figura 14: Zimograma representativo das regiões esterásicas dos indivíduos das colônias de *Melipona scutellaris* submetidos a coloração com α -naftil acetato e β -naftil acetato. COLÔNIAS K: introduzidas no Meliponário em 1987; COLÔNIAS AB e N: introduzidas no Meliponário em 1999 e 2000, respectivamente.

Tabela 6: Representação da presença ou ausência das regiões esterásicas (EST1 à EST7) nas colônias analisadas. α : coloração com α -naftil acetato; β : coloração com β -naftil acetato e $\alpha\beta$: coloração com α -naftil acetato e β -naftil acetato.

CAIXAS	EST 1			EST 2			EST 3			EST 4			EST 5			EST 6			EST 7			
	α	β	$\alpha\beta$	α	β	$\alpha\beta$	α	β	$\alpha\beta$	α	β	$\alpha\beta$	α	β	$\alpha\beta$	α	β	$\alpha\beta$	α	β	$\alpha\beta$	
505	+		+	+	+	+	+	+														+
522	+		+	+	+	+	+	+														
546				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+							
536				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
AB01				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
AB03				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
AB08				+	+	+	+	+	+	+	+		+									+
AB09				+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+							
AB11				+	+	+	+	+	+		+											
N12				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
N19				+	+	+	+	+		+		+	+	+	+							+

Tabela 7: Representação da presença ou ausência das regiões esterásicas (EST8 à EST14) nas colônias analisadas. α : coloração com α -naftil acetato; β : coloração com β -naftil acetato e $\alpha\beta$: coloração com α -naftil acetato e β -naftil acetato.

CAIXAS	EST 8			EST 9			EST 10			EST 11			EST 12			EST 13			EST 14		
	α	β	$\alpha\beta$	α	β	$\alpha\beta$	α	β	$\alpha\beta$	α	β	$\alpha\beta$	α	β	$\alpha\beta$	α	β	$\alpha\beta$	α	β	$\alpha\beta$
505				+		+				+	+	+			+	+	+				+
522										+		+			+	+	+				+
546							+		+	+		+	+		+	+	+	+	+	+	+
536										+		+	+		+	+	+				+
AB01							+		+	+		+	+		+	+	+				+
AB03					+	+				+		+			+	+	+				+
AB08							+	+	+	+		+			+	+	+				+
AB09										+	+	+			+	+	+				+
AB11							+		+	+		+			+	+	+				+
N12										+					+	+	+				+
N19	+		+				+		+	+	+	+		+	+	+	+				+

Tabela 8: Frequência das regiões com atividade esterásica nas colônias analisadas.

Caixas	Frequência de regiões com atividade esterásica nas amostras	(%)
505	8	57,14
522	6	42,86
546	9	64,29
536	9	64,29
AB01	10	71,43
AB03	9	64,29
AB08	9	64,29
AB09	7	50,00
AB11	7	50,00
N12	8	57,14
N19	11	78,57

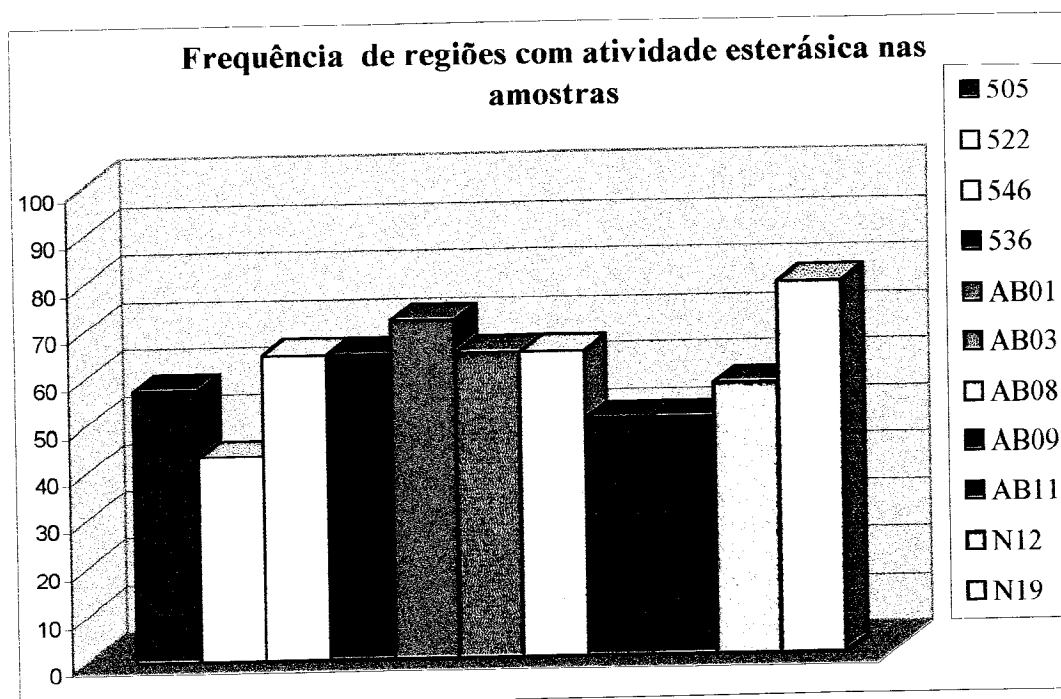


Figura 15: Representação da frequência das regiões com atividade esterásica nas colônias analisadas.

Tabela 9: Frequência das regiões esterásicas.

Regiões	Frequência das regiões esterásicas	%
EST1	2	18,18
EST2	11	100,00
EST3	11	100,00
EST4	9	81,82
EST5	7	63,64
EST6	4	36,36
EST7	3	27,27
EST8	1	9,09
EST9	2	18,18
EST10	5	45,45
EST11	11	100,00
EST12	4	36,36
EST13	11	100,00
EST14	11	100,00

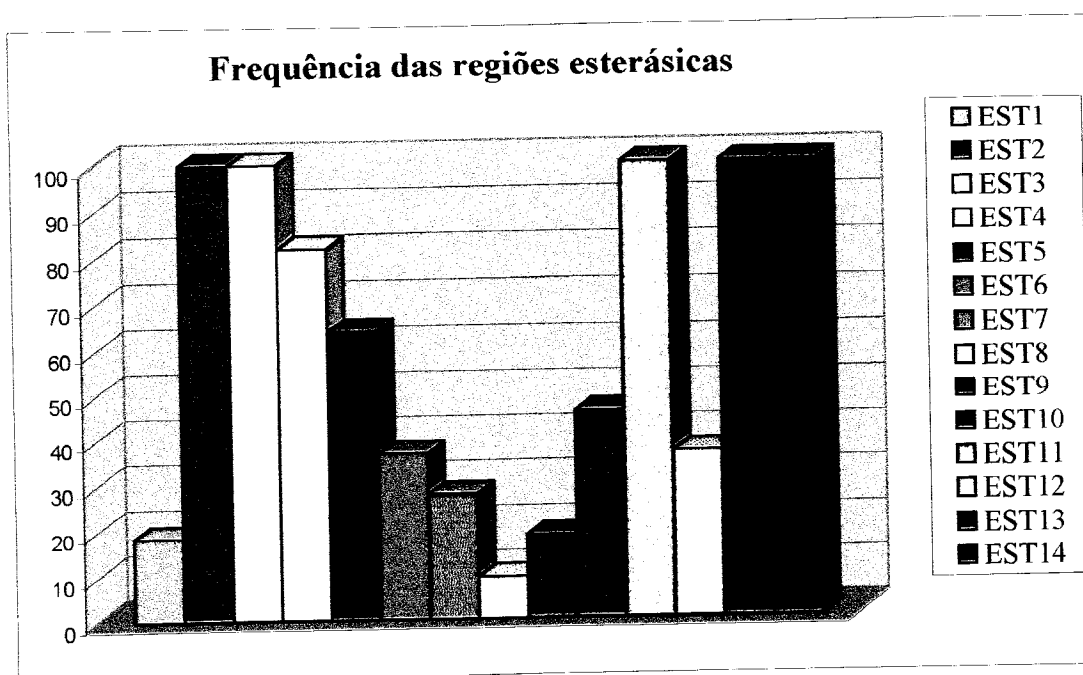
**Figura 16:** Representação da frequência das regiões esterásicas.

Tabela 10: Frequência das regiões esterásicas entre os grupos analisados. GRUPO K: colônias introduzidas no Meliponário em 1987; GRUPO AB E N: colônias introduzidas no Meliponário em 1999 e 2000, respectivamente.

Caixas	Gupos	Frequência das regiões esterásicas nos grupos (%)													
		EST1	EST2	EST3	EST4	EST5	EST6	EST7	EST8	EST9	EST10	EST11	EST12	EST13	EST14
505 522 546 536	K	50	100	100	50	50	25	25	0	25	25	100	50	100	100
AB01 AB03 AB08 AB09 AB11	AB	0	100	100	100	80	40	20	0	20	60	100	20	100	100
N12 N19	N	0	100	100	100	100	50	50	50	0	50	100	50	100	100

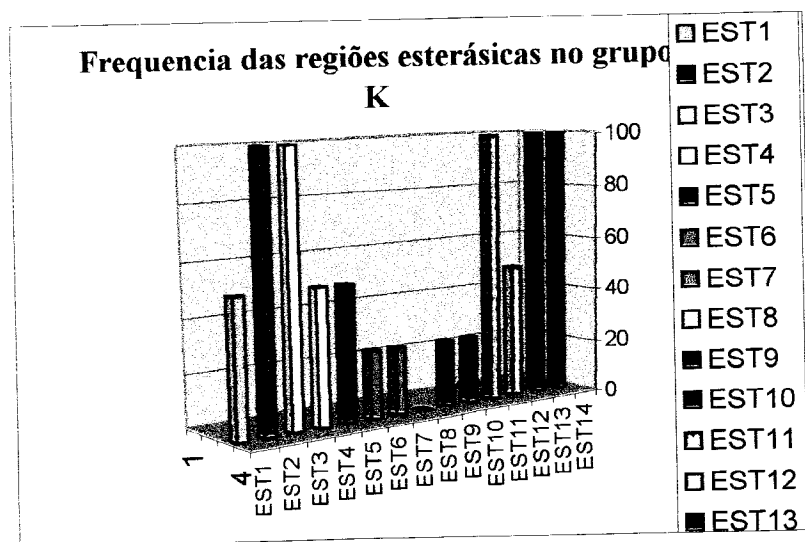


Figura 17: Frequência das regiões com atividade esterásica no grupo K (introduzidas no Meliponário em 1987).

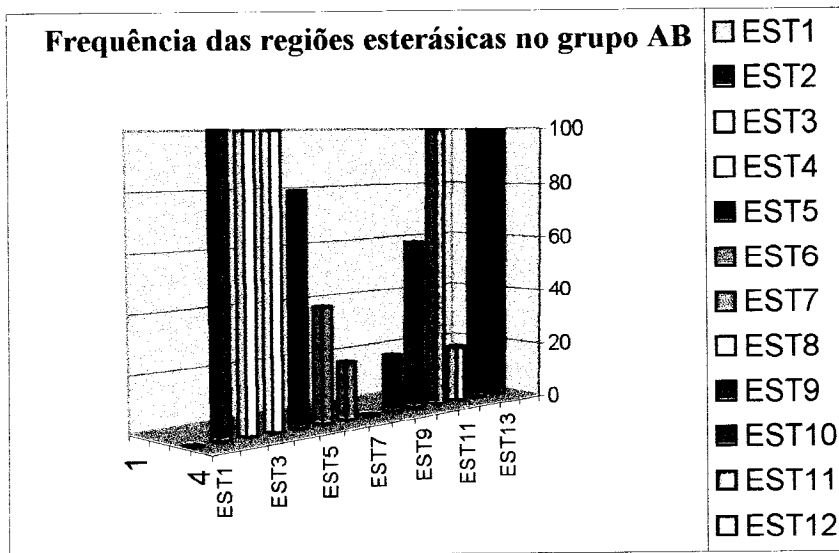


Figura 18: Frequência das regiões com atividade esterásica no grupo AB (introduzidas no Meliponário em 1999).

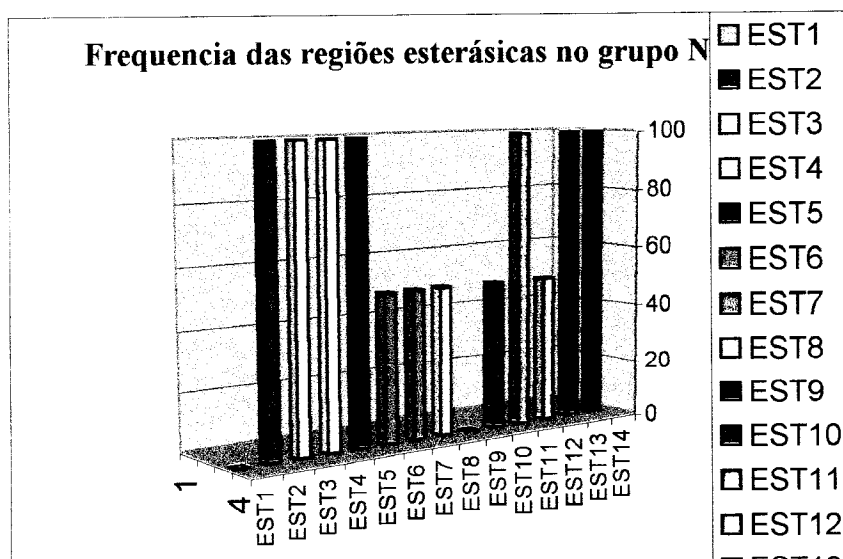


Figura 19: Frequência das regiões com atividade esterásica no grupo N (introduzidas no Meliponário em 2000).

5. CONCLUSÃO

- 1- Os resultados mostram que não houve polimorfismo no 16S mtDNA pela técnica de SSCP entre os grupos K, AB e N.
- 2- As diferenças morfológicas e de defensividade entre os grupos de abelhas analisados nesse estudo, devem estar associadas a outros genes que essa técnica não permitiu analisar.
- 3- Na análise do padrão de bandas esterásicas obtido, foram detectadas quatorze regiões com atividade esterásica, denominadas de EST1 à EST14, a partir da extremidade anódica do gel.
- 4- Do total de regiões analisadas, as EST1, EST8 e EST12 foram consideradas α esterases e as demais regiões foram consideradas α - β esterases, sendo que as regiões EST6, EST10, EST11 e EST14 foram consideradas α - β esterases com hidrólise preferencial para α -naftil acetato.

- 5- Os resultados obtidos por esterases mostram que houve variações com relação à presença e à frequência das regiões esterásicas entre os grupos estudados (K, AB e N).
- 6- Foram observadas variações dentro de cada um dos grupos analisados (K, AB e N), o que sugere a ocorrência de fluxo gênico entre os grupos introduzidos em diferentes períodos de tempo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE F. M. **Análise da ocorrência de hibridação em uma população de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) por meio de Isoenzimas.** 2000. 26f. Monografia – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2000.
- ARGENTINE, J. A. & JAMES, A. A. Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochemic Molecular Biologic.** v. 25, p. 621-630, 1995.
- ARIAS, M. C; FRANCISCO, F. O.; SILVESTRE, D. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de Meliponíneos. **Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure.** Criciúma: UNESC. 2003. p. 305-309.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BAL, R.M.; BERMINGHAM; LAMB T.; NEIGEL; REEB, A.; SAUNDERS N. C., Intraespecif phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between populatios genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics.** v. 18, p. 489-522, 1987.
- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution.** New York, Chapman & Hall. v. 11, 511p. 1994.
- BASAN, B. J.; CAETANO-ANOLES, G.; GRESSHOFF, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytic Biochemical,** v. 196, p. 80-83, 1991.

BLUM, H.; BEIR, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gel. **Electrophoresis**, p. 93-99, 1987.

BONETTI, A. M. **Ação do Hormônio Juvenil sobre a Expressão Gênica em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. 1982. 141f. Dissertação de Mestrado-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Ribeirão Preto, 1982.

BONETTI, A. M. **Genética de determinação de casta em *Melipona*. Ação do Hormônio Juvenil sobre esterases e *corpora allata* e durante o desenvolvimento pós-embrionário**. 1990. 165f. Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto-SP, 1990.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1976.

CARVALHO, G. A. **Monitoramento dos alelos Sexuais XO em uma população Finita de *Melipona scutellaris* (APIDADE, MELIPONINI)**. 1996. 51f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Uberlândia, 1996.

CARVALHO, G. A. **Contribuição à reprodução da *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) e suas conseqüências**. 2000. 109f. Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto-SP, 2000.

CERON, C. R. **Padrão de Esterases no Desenvolvimento de *Drosophila mulleri*, *D. arizonensi* e seus híbridos**. 1988. 142f. Tese de Doutorado-Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, 1988.

COBO, J. A.; MUNIZ, C. F.; OLIVEIRA, R. C.; KERR, W. E. LIS-SSCP da região 16S RNAr mitocondrial de *Friseomelitta varia* (Apidae, Meliponinae). **Genetics and Molecular Biology**. v 22, n 3, p. 379, 1999.

CONTEL, E. P. B.; & MESTRINER, M. A. Esterase polymorphisms at two loci in the social bee. **J. Hered**, v. 65, p. 349-352, 1974.

COSMIDES, L.; TOOBY, J.; KURZBAN, R. Perceptions of race. **Trends in Cognitive Sciences**. v. 7, n. 4, p. 173-179, 2003.

CROZIER, R. H. & CROZIER Y. C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and the genome organization. **Genetics**, v 133. p. 97-117, 1993.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília – DF: Embrapa, 1996. 220p.

GRAY, M. W.; BURGER, G.; LANG, B. F. The origin and evolution of mitochondria. **Genome Biology**. v. 2, reviews: 1018.1-1018.5, 2001.

HAMRICK, J.L. Plant population genetics and evolution. **Amer. J. Bot**, v. 69, n. 10, p. 1695-1693, 1982.

HIDAYAT, P. & GOODMAN, W. G. Juvenile hormone and hemolymph juvenile hormone binding protein titers and their interaction in the hemolymph of fourth stadium *Manduca sexta*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** v. 24, n. 7, p. 709-715, 1994.

KERR, W. E. Estudos Sobre o Gênero *Melipona*. In: ESALQ-USP, 1948, Piracicaba-SP. **Anais da ESALQ-USP**, Piracicaba, 1948. p. 182-276.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação**. Belo Horizonte: Fundação Acangaú, 1996. 144p.

LABATE, B., GAME, Y., COOKE, H., OAKSHOTT, J. G. The number and distribution of esterase 6 alleles in populations of *Drosophila melanogaster*. **Heredity**. v. 63, p. 203-208, 1990.

LAPENTA, A. S. **Padrões de esterases na superespécie *Drosophila serido* e *D. buzzatii***. 1992. 123f. Dissertação de Mestrado-UNESP, São José do Rio Preto, 1992.

MARUYA, E. SAJI, H., YOKOYAMA, S. PCR-LIS-SSCP (Low Ionic Strength Single-stranded Conformation Polymorphism) - A Simple Method for High-resolution Allele Typing of HLA- DRB1, -DQB1, and -DPB1. **Genome Research**. v. 6, p. 51-57, 1996.

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

MOURE, J.S. 1970. **Classificação das abelhas brasileiras**. Disponível em <<http://eco.ib.usp.br/beelab@ib.usp.br>>. Acesso em: 21 maio 2001.

NANYA, O. S. **Estudo de cromossomos politênicos e de síntese protéica sob efeito de choques de temperatura em *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* e híbridos.** 1993. 130f. Tese de Doutorado-UNESP, São José do Rio Preto, 1993

NASCIMENTO, V. A.; VASCONCELOS, S. M.; KERR, W. E. Variação mitocondrial em espécies de *Melipona* (Hymenoptera, Apidae) por SSCP. **Genetics and Molecular Biology.** v 22, n 3, p. 377, 1999.

NCBI. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NC004529>>
Acesso em: 21 junho 2004.

OAKESHOTT, J. G., VAN PAPERRECHT, E. A., BOYCE, T. M., HEALY, M. J., RUSSEL, R. J. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. **Genetics.** v. 90, p. 239-268, 1993.

OLIVEIRA, R. C; VASCONCELOS, S. M.; BRANDÃO, V. S.; GOULART, L. R. KERR, W. E. LIS-SSCP do 16S RNAr mitocondrial em *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Apidae, Meliponinae). **Genetics and Molecular Biology.** v. 21, n. 3, p. 367, 1999.

ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKEYA, T. **Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms,** 1988.

RITZ, F. R. C. **Padrão de esterases em *Megaselia scalaris*.** 1997. 126f. Tese de Doutorado-UNESP, São José do Rio Preto, 1997.

RUIZ, L. C. **Estudo do Padrão de Esterases em quatro populações de *Haematobia irritans* (mosca-do-chifre).** 1995. 107f. Dissertação de mestrado-UNESP, São José do Rio Preto, 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F e MANIARIS, T. **Molecular cloning: A Laboratory Manual.** 2. ed. New York: Cold Sping Harbor Laboratory Press, 1989. 3:B.23,E.6.

SHEPPARD, W. S.; STECK, G. J.; MCPHERON, B. A. **Experiment,** v. 48, p. 1010-1013, 1992.

STEINER, W. W. M. & JOHNSON, W. E. Techniques for electrophoreses of Hawaiian *Drosophila*. *Us International Biological Program. Island Ecosystems IRP. Tech. Report,* v. 30, p. 1-21, 1973.

TANNÚS-NETO, J. **Mofologia comparada de operárias, machos e rainhas de abelha urucu *Melipona scutellaris* Latreille 1811.** 2001. 156f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia–UFU, Uberlândia, 2001.

VASCONCELOS, S. M.; OLIVEIRA, R.C.; CAMPOS, A. P. S.; NASCIMENTO, V. A.; CARVALHO, G. A.; KERR, W. E.; GOULART, L. R. Caracterização de divergência mitocondrial em populações de *Melipona rufiventris* por SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism). **Genetics and Molecular Biology.** v 21, n 3, p. 367, 1998.

VASCONCELOS, S. M.; NASCIMENTO, V. A.; KERR, W. E. determinação de polimorfismo no gene mitocondrial 16S RNAr em *Melipona quadrifasciata* Lep., por SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism). **Genetics and Molecular Biology.** v 22, n 3, p. 378, 1999.

WILSON, A. C.; CANN, R. L. GEORGE, M.; GYLLESTEN, U. B.; HELMBYCHOWSKI, K. M.; HIGUSHI, R. G.; PALUMBRI, E. M.; SAGE, R. D.; STONEKING M. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biological Journal of Linnean Society.** v. 26, p. 375-400, 1985.

WRIGHT, T. R. F. & McINTYRE, R. A. A homologous gene-enzyme system. Esterase-6 in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. **Genetics.** v. 48, p. 1717-1726, 1963.

YOKOYAMA, S. & NEI, M. Population dynamics of sex determining alleles in honey bees and sel-incompatibility alleles in plants. **Genetics.** v. 91, p. 609-626, 1979.