



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ISIS GOMES DE BRITO SOUZA

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA NUCLEAR E MITOCONDRIAL DE ABELHAS

Melipona subnitida e Melipona fasciculata

TERESINA - PI

2016

ISIS GOMES DE BRITO SOUZA

Caracterização genética nuclear e mitocondrial de abelhas *Melipona subnitida* e *Melipona fasciculata*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia – Embrapa Meio-Norte – Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia em Agropecuária

Orientador: Dr. Fábio Mendonça Diniz

Teresina-PI

2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

S729g Souza, Isis Gomes de Brito.
Caracterização genética nuclear e mitocondrial de abelhas
Melipona subnitida e *Melipona fasciculata* / Isis Gomes de
Brito Souza. – 2016.
129 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal
do Piauí, 2016.
“Orientador: Prof. Dr. Fábio Mendonça Diniz”.

1. Microssatélites. 2. Mitogenoma.
3. Sequenciamento. I. Título.

CDD 595.799

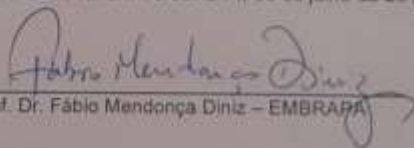


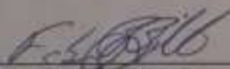
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
Campus Universitário "Almirante Petrólio Portella" – Bairro Socopo – Centro de Ciências Agrárias - CCA
Telefone: (86) 3217-3331 – e-mail: renorbio@ufpi.edu.br
CEP 64049-550 – Teresina-PI

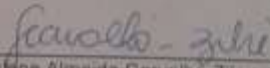
ATA DE DEFESA DE TESE

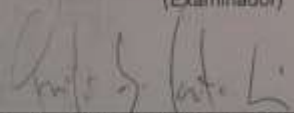
Ata de Defesa de Tese de Doutorado de Isis Gomes de Brito Souza. Ao oitavo dia do mês de julho do ano de dois mil e dezesseis, às oito horas, reuniu-se, no Auditório do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco (NUPCelt/CCA/UFPI), a Banca Examinadora de Defesa de Tese de Doutorado composta pelos Professores Fábio Mendonça Diniz – EMBRAPA, Presidente; Fábio Barros Brito – Universidade Federal do Piauí, Examinador; Gislene Almeida Carvalho-Zilse – INPA, Examinadora; Paulo Sarmanho da Costa Lima - EMBRAPA, Examinador e Vladimir Costa Silva – Universidade Federal do Piauí, Examinador; perante a qual ISIS GOMES DE BRITO SOUZA, aluna regularmente matriculada no Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Piauí, defendeu, para preenchimento do requisito de doutora, sua Tese intitulada "Caracterização genética nuclear e mitocondrial de abelhas *Melipona subnitida* e *Melipona fasciculata*." A defesa da referida tese ocorreu das 08:00 às 12:45, tendo a doutoranda sido submetida à sabetina, dispondo cada membro da banca do tempo determinado para tal. Finalmente, a Banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a doutoranda APROVADA (Aprovada / Reprovada), por sua tese e sua defesa terem, por unanimidade, recebido o conceito SATISFATORIO (Satisfatório / Insatisfatório).

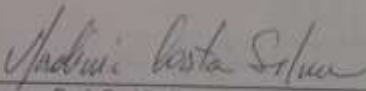
Eu, Fábio Mendonça Diniz, que presidi a Banca de Defesa da Tese, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Em Teresina-PI, 08 de julho de 2016.

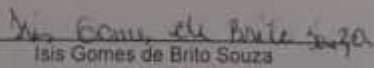

Prof. Dr. Fábio Mendonça Diniz – EMBRAPA


Prof. Dr. Fábio Barros Brito - UFPI
(Examinador)


Profa. Dra. Gislene Almeida Carvalho-Zilse - INPA
(Examinadora)


Prof. Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima - EMBRAPA
(Examinador)


Prof. Dr. Vladimir Costa Silva - UFPI
(Examinador)


Isis Gomes de Brito Souza

Dedico a toda minha família em especial ao meu filho

Matheus de Brito, minha Mãe Antonia Gomes

e a minha irmã Polyanne Gomes

AGRADECIMENTOS

- A Deus pela minha vida e por ter me dado forças durante o curso;
- À Universidade Federal do Piauí (UFPI) e ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), pela oportunidade de realização do curso;
- À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Meio-Norte) e ao Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização deste trabalho e aos pesquisadores e funcionários pelo apoio e amizade;
- Ao macroprograma 2 Embrapa (02.11.01.029.00.00) pelo financiamento da pesquisa;
- À CAPES pela concessão da bolsa de estudos no Brasil e pela bolsa de doutorado sanduíche no exterior (Ciência sem fronteiras - CsF);
- Ao pesquisador Dr. Fábio Mendonça Diniz (Embrapa Meio-Norte) por tê-lo como orientador e amigo, pelos incentivos, e ensinamentos;
- Ao pesquisador Bruno de Almeida (Embrapa Meio-Norte) pela oportunidade de desenvolvimento do projeto com abelhas sem ferrão;
- À Dalhousie University (Nova Scotia - Canadá), em especial ao pesquisador Paul Bentzen e ao técnico laboratorial Ian Paterson pela acolhida durante os sete meses do doutorado sanduíche e sequenciamento do genoma da abelha *Melipona subnitida* e de mais três organismos (*Melipona fasciculada*, *Panulirus echinatus* e *Cardisoma guanhumí*);
- Ao professor Francisco Prosdocimi (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Laboratório Multidisciplinar para Análise de Dados) pelo treinamento e montagem do genoma mitocondrial da abelha *Melipona subnitida* e de mais três organismos (*Melipona fasciculada*, *Panulirus echinatus* e *Cardisoma guanhumí*);
- Aos meliponicultores pelo fornecimento das amostras (abelhas) para o estudo e ao José Maria Vieira-Neto (Embrapa Meio-Norte) pela ajuda nas coletas de campo;
- Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte que juntos compartilharam experiências fundamentais no dia-a-dia de pesquisa em especial ao Geice Ribeiro pela ajuda de bancada e análises;
- À minha família e a todos meus amigos pelo incentivo em realizar mais esse desafio;

Finalmente, a todas as pessoas que de algum modo contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

SOUZA, I.G.B. Caracterização genética nuclear e mitocondrial de abelhas *Melipona subnitida* e *Melipona fasciculata*. 2016. 129f. Tese (Doutorado) – RENORBIO. Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI, 2016.

A abelha *Melipona subnitida* (conhecida por jandaíra) possui grande importância econômica e ecológica em sua área de ocorrência. No entanto, já apresenta problemas relacionados à sua população pois colônias silvestres vem sendo reduzidas consideravelmente afetando de forma direta sua estrutura genética populacional pela eliminação de genótipos. Ferramentas moleculares vem auxiliando trabalhos de conservação por acessar diretamente ao nível de DNA a variabilidade genética das espécies. Dessa forma, objetivamos o sequenciamento do genoma da *M. subnitida* para o descrição de marcadores microssatélites visando o estudo da diversidade genética e estrutura populacional da espécie, além da montagem e anotação do genoma mitocondrial para o futuro isolamento de marcadores e uso em estudos genéticos e investigações das relações filogenéticas entre as diferentes espécies do gênero *Melipona*. Uma biblioteca Illumina *paired-end* foi criada seguindo o protocolo padrão do Kit Illumina Nextera Preparação de Amostras de DNA e em seguida as amostras foram sequenciadas por meio de um MiSeq Benchtop. As sequências contíguas (*contigs*) foram montadas *de novo* a partir das sequências *paired-end* resultantes usando o software CLC Genomics Workbench 7.0.4. Os *contigs* no formato FASTA foram submetidos ao software Msatcommander para a busca de possíveis repetições. Optou-se por examinar apenas os locos trinucleotídeos e tetranucleotídeos. Cinquenta e dois locos foram adequados para o desenho de *primers*. Onze locos de microssatélite foram analisados em seis populações de *M. subnitida*. O genoma mitocondrial (mitogenoma) foi quase completamente montado por abordagens *in silico* usando corridas iterativas de software MIRA e MITObim. Como resultados, foram identificados 5.574 locos de microssatélites perfeitos, sendo os dinucleotídeos a classe mais abundante com 89,7% do total, seguido de trinucleotídeos (6,4%), tetranucleotídeos (2,7%), pentanucleotídeos (0,7%) e hexanucleotídeos (0,5%). Vinte e três locos de microssatélites foram isolados e caracterizados onde 17 apresentaram polimorfismos e seis foram monomórficos. Os onze locos de microssatélite no estudo populacional mostraram-se polimórficos. Sobre o mitogenoma parcial da *M. subnitida*, o mesmo contém 12.740 pares de bases de comprimento. Os genes encontrados conservam a estrutura esperada na maioria dos invertebrados. Estrutura do genoma, a ordem dos genes e orientação foi semelhante às mitocôndrias descritas anteriormente para as abelhas *Melipona*.

Palavras – chave: microssatélites, mitogenoma, sequenciamento

ABSTRACT

SOUZA, I.G.B. Characterization of nuclear and mitochondrial genetics *Melipona subnitida* e *Melipona fasciculata* bees. 2016. 129 f. Thesis (Doctor) – RENORBIO. Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

The *Melipona subnitida* bee (known as jandaira) has great economic and ecological importance in its range. However, already presents problems related to its population for their wild colonies has been reduced considerably affecting directly its population genetic structure by the elimination of genotypes. Molecular tools is helping conservation work by directly access the DNA level the genetic variability of the species. Thus, we sequenced the genome of *M. subnitida* for the isolation of microsatellite markers for the study of genetic diversity and population structure of the species, as well as assembly of the mitochondrial genome to the future development and application of markers in genetic studies and investigations of the phylogenetic relationships between different species of the genus *Melipona*. Illumina paired end library was generated following standard Nextera the Illumina DNA Preparation Kit samples and then the samples were sequenced using a Benchtop MiSeq protocol. The contiguous sequences (contigs) were assembled *de novo* from paired-end sequences resultant using the CLC Genomics Workbench 7.0.4 software. The contigs in FASTA format underwent Msatcommander software for searching for possible repeats sequence. We chose to examine only the loci trinucleotide and tetranucleotide. Fifty two loci were appropriate for the design of primers. Eleven microsatellite loci were analyzed in six populations of *M. subnitida*. The mitochondrial genome (mitogenome) was almost finished by approaches *in silico* using iterative software runs MIRA and MITObim. As a result, perfect 5.574 microsatellite loci were identified, the dinucleotide the most abundant class with 89.7% of the total, followed by trinucleotide (6.4%), tetranucleotide (2.7%), pentanucleotide (0.7%) and hexanucleotide (0.5%). Twenty three microsatellite loci were isolated and characterized where 17 showed polymorphisms and six were monomorphic. The eleven microsatellite loci in the population study were polymorphic. About *M. subnitida*' partial mitogenoma, it contains 12.740 base pairs in length. Genes retain the expected structure found in most invertebrates. Genomic structure, the order of genes and exposure was similar to that described above for mitochondria *Melipona* bees.

Key - words: microsatellite, mitogenome, sequencing

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 Abelha *Melipona subnitida*.....15

CAPÍTULO 2

Figura 1 Metodologia para a busca de microssatélites utilizando a tecnologia de sequenciamento de nova geração.....43

Figura 2 Proporção de diferentes tipos de motivos microssatélites.....46

Figura 3 Distribuição da frequência de motivos repetidos (A) di-, (B) tri-, (C) tetra-, (D) penta, e (E) hexanucleotídeos no genoma da *M. subnitida*.....48

CAPÍTULO 3

Figura 1 Metodologia para a busca e validação de microssatélites utilizando a tecnologia de sequenciamento de nova geração.....57

CAPÍTULO 4

Figura 1 Mapa de coletas das abelhas.....69

Figura 2 Dendrograma baseado na matriz de diversidade genética de Nei.....79

Figura 3 Valor de delta K igual a dois cluster, obtido a partir da análise no programa STRUCTURE, com aplicação do modelo de Evanno et al. (2005), em seis populações de *M. subnitida*.....80

Figura 4 Estrutura genética inferida usando uma análise Bayesiana no programa STRUCTURE, as linhas verticais indicam os indivíduos e as cores mostram as frequências alélicas.....81

Figura 5 Correlação entre as distância geográficas e as distâncias genéticas de Nei.....82

CAPÍTULO 5

Figura 1 Metodologia para a montagem e anotação do mitogenoma91

Figura 2 Mapa linearizado da organização parcial do mitogenoma da *M. subnitida*.....95

Figura 3 Alinhamento da região do gene citocromo c oxidase subunidade I (COX1) entre as espécies *M. subnitida* (query) e *M. scutellaris* (subject).....95

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 Resumo da busca <i>in silico</i> por sequências simples repetidas em abelhas sem ferrão <i>M. subnitida</i>	46
--	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1 Características dos 23 locos de microssatélites descritos para <i>M. subnitida</i> incluindo sequência do <i>primer</i> , tipo de motivo, temperatura de anelamento (Ta), número de alelos observados (Na), tamanho do alelo, número de indivíduos (N) e número de acesso GenBank.....	60
---	----

Tabela 2 Variabilidade dos 17 locos de microssatélites e estatísticas F em populações de <i>M. subnitida</i>	61
--	----

Tabela 3 Características de 18 marcadores microssatélite desenvolvidos para <i>M. fasciculata</i> , incluindo o loco, sequência do <i>primer</i> , tipo de motivo, temperatura de anelamento (Ta), número de alelos observados (Na), tamanho do alelo e número de acesso GenBank.....	62
---	----

Tabela 4 Variabilidade de 17 locos de microssatélites e estimativas de diversidade genética em <i>M. fasciculata</i>	63
--	----

CAPÍTULO 4

Tabela 1 Abreviatura, Município - Estado, Número de colônias e total de indivíduos de <i>Melipona subnitida</i> (N) em cada município amostrado.....	69
--	----

Tabela 2 Características dos onze locos de microssatélite utilizados nas análises de <i>M. subnitida</i>	72
--	----

Tabela 3 Estimativas de parâmetros genéticos de microssatélite em seis populações de <i>M. subnitida</i>	74
--	----

Tabela 4 Estimativas de parâmetros genéticos por loco microssatélite para as populações do Ceará de <i>M. subnitida</i> (continua).....	75
---	----

Tabela 4 Estimativas de parâmetros genéticos por loco microssatélite para as populações de Rio Grande do Norte de <i>M. subnitida</i> (continua).....	76
---	----

Tabela 4 Estimativas de parâmetros genéticos por loco microssatélite para as populações de Paraíba de <i>M. subnitida</i> (termina).....	77
--	----

Tabela 5 Número de alelos raros encontrados nas populações de <i>M. subnitida</i>	78
---	----

Tabela 6 Matriz de distância de Nei.....	79
--	----

CAPÍTULO 5

Tabela 1 Características do genoma mitocondrial parcial de <i>M. subnitida</i> comparado com os mitogenomas de duas outras abelhas <i>Melipona</i> e uma <i>Apis</i>	93
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AR	Riqueza alélica
AFLP	Polimorfismos de comprimento de fragmento amplificado
AMOVA	Análise de variancia molecular
ATP	Trifosfato de adenosina
COX1	Citocromo c oxidase subunidade I
cDNA	DNA complementar
CytB	Citocromo b
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DNAmt	DNA mitocondrial
dsDNA	DNA dupla fita
ISSR	Entre sequências simples repetidas
ITS	Espaçador interno transcrito
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
NAD	Subunidade NADH desidrogenase
NGS	Sequenciamento de nova geração
PCI	Conteúdo de informação polimórfica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SSCP	Polimorfismo de conformação de cadeia simples
RAPD	DNA polimórfico aleatoriamente amplificado
RFLP	Polimorfismo de fragmento de restrição
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SNPs	Polimorfismo de nucleotídeo único
SSR	Sequência simples repetida
tRNA	RNA transportador
rRNA	RNA ribossomal

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	12
INTRODUÇÃO GERAL	16
Referências	19
CAPÍTULO 1	20
O impacto de dados moleculares em estudos genéticos de abelhas do gênero <i>Melipona</i>	20
1.1 Resumo.....	21
1.2 Introdução	22
1.3 Tribo Meliponini	23
1.3.1 Gênero <i>Melipona</i>	24
1.4 Marcadores moleculares em estudos genéticos de Meliponas	24
CAPÍTULO 2	40
Sequências simples repetidas no genoma da abelha sem ferrão <i>Melipona subnitida</i> Ducke (Apidae: Meliponini): abundância, composição e variação do comprimento	40
2.1 Resumo.....	41
2.2 Introdução	42
2.3 Material e Métodos.....	43
2.4 Resultados e Discussão	45
2.5 Conclusões	49
2.5 Referências	50
CAPÍTULO 3	52
Isolamento e caracterização de locos de microssatélites em duas espécies de abelhas sem ferrão: <i>Melipona subnitida</i> e <i>Melipona fasciculata</i>	52
3.1 Resumo.....	53

	14
3.2 Introdução	54
3.3 Material e Métodos.....	56
3.4 Resultados e Discussão	59
3.5 Conclusões	64
3.6 Referências	65
CAPÍTULO 4.....	67
Estrutura genética e consequências do desmatamento na zona de ocorrência de <i>Melipona subnitida</i> : uma abelha comercial e ecologicamente importante no Nordeste do Brasil.....	67
4.1 Resumo.....	68
4.2 Introdução	69
4.3 Material e Métodos.....	70
4.4 Resultados e Discussão	73
4.5 Conclusões	84
4.6 Referências	85
CAPÍTULO 5.....	87
Organização e caracterização parcial do mitogenoma da abelha sem ferrão <i>Melipona subnitida</i> Ducke (Apidae: Meliponinae)	87
5.1 Resumo.....	88
5.2 Introdução	89
5.3 Material e Métodos.....	91
5.4 Resultados e Discussão	92
5.5 Conclusão.....	97
5.6 Referências	98
APÊNDICES.....	100
APÊNDICE A	101
Identification and abundance of microsatellite Motifs in the stingless bee <i>Melipona subnitida</i> (Apidae: Meliponini).....	101
APÊNDICE B	110

Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the stingless bee <i>Melipona subnitida</i> using next-generation sequencing.....	110
APÊNDICE C	117
Microsatellite markers developed in the stingless bee <i>Melipona fasciculata</i> by next-generation sequencing and an exploratory analysis of its geographic genetic variation.....	117

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um país rico em espécies de abelhas sociais nativas, conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão, os meliponíneos. Estas apresentam grande importância econômica e ecológica, pela produção de mel, venda de enxames e por trazerem grandes benefícios diretos à agricultura e recuperação de ecossistemas.

Os meliponíneos são encontrados naturalmente em troncos de árvores nativas, onde constroem seus ninhos. Alterações do seu ambiente natural causadas pelo desmatamento, intensificação da atividade agrícola, uso indiscriminado de agrotóxico e pela ação predatória de meleiros tem assim, colocado espécies deste grupo em séria ameaça de extinção (FREITAS et al., 2009). Uma alternativa para a conservação desses insetos é a sua criação técnica - chamada meliponicultura. Essa atividade já vem sendo realizada há algum tempo, com técnicas consagradas popularmente, objetivando evitar a redução populacional das abelhas e complementando a renda de pequenos produtores.

Uma espécie desse grupo, endêmica da região Nordeste brasileira, é a *Melipona subnitida*, conhecida por jandaíra (Figura 1), considerada uma das espécies mais indicadas para a criação técnica com fins lucrativos por sua boa adaptabilidade ao clima da região. A abelha jandaíra, contudo já apresenta problemas relacionados à sua população, suas colônias silvestres, as quais são encontradas naturalmente, vem sendo reduzidas consideravelmente afetando de forma direta sua estrutura genética populacional pela eliminação de genótipos e consequente alteração das frequências alélica e genotípica (SILVA et al., 2014).



Foto: Dennys Diógenes

Figura 1 Abelha *Melipona subnitida*

Além do sistema complementar de determinação do sexo em abelhas (CSD - Complementary Sex Determination) (BULL, 1983), a determinação da variabilidade genética presente nas populações ameaçadas, a qual identifica a variação alélica, é um pré-requisito para

o estabelecimento de programas de manejo e conservação eficientes. Ela pode ser determinada pelo uso de ferramentas biotecnológicas conhecidas por marcadores moleculares, tais como, microssatélites de DNA, ou SSR (*Short Sequence Repeats*) que são encontrados no genoma nuclear ou ainda utilizando marcadores encontrados no genoma mitocondrial.

Microssatélites são repetições curtas de bases de DNA, repetidas em sequência, abundantes na maioria dos genomas eucarióticos. São marcadores codominantes, de natureza multialélica, e altamente polimórficos, constituindo-se numa excelente ferramenta para análises genéticas de populações (DINIZ et al., 2007). Acredita-se que as populações de jandaíra apresentam alta estruturação genética, pois a baixa capacidade migratória dessas abelhas pode reduzir o tamanho efetivo da população, limitando o fluxo gênico.

Já o conjunto de genes e a região controle do DNA mitocondrial (DNAm_t / mitogenoma) de herança materna vem sendo utilizado em estudos taxonômicos e também em estudos genéticos populacionais (TSOI et al., 2005). A utilização destas regiões para estudo surge como uma alternativa no esclarecimento de relações filogenéticas difíceis quando abordada por outros métodos, como também uma forma de questionar visões filogenéticas propostas anteriormente (RUSSO;MIYAKI; PEREIRA, 2012). Vários trabalhos têm utilizado a análise de sequências de DNAm_t para estudos das relações genéticas e evolutivas, entretanto, espécies neotropicais - que vivem na região biogeográfica que compreende a América Central e a América do Sul - ainda possuem poucas informações a esse respeito (HILSDORF et al., 2002) por não possuir o genoma parcial ou completamente sequenciado.

A abordagem da tecnologia de sequenciamento de nova geração para a descrição de marcadores moleculares têm sido muito eficiente pelo baixo custo por base sequenciada (GAGNON et al., 2016; WANG et al., 2016). Esta técnica é uma abordagem promissora para espécies com informação genômica limitada, como a abelha *M. subnitida*, onde os programas de conservação e melhoramento genético tendem a se beneficiar enormemente a partir do uso de ferramentas genômicas.

Na investigação da variabilidade genética da jandaíra é importante a descrição de ferramentas moleculares altamente polimórficas e mais específicas, como microssatélites de DNA isolados exclusivamente para a espécie. O conhecimento da taxonomia do gênero *Melipona* é crucial para o monitoramento das populações de *Melipona* naturais ou introduzidas. Estudos que visam elucidar as relações evolutivas dentro do gênero *Melipona* são necessários para ampliar o conhecimento do gênero e para contribuir na compreensão das suas relações de parentesco.

Desta forma, objetivamos o sequenciamento do genoma nuclear da *M. subnitida* e *M. fasciculata* para a descrição de marcadores microssatélites visando o estudo da diversidade genética e estrutura populacional da espécie no intuito de gerar informações fundamentais aos programas de melhoramento e conservação da jandaíra, além da montagem do genoma mitocondrial para a futura descrição de marcadores e uso em estudos genéticos e investigações das relações filogenéticas entre as diferentes espécies do gênero *Melipona* encontradas no Brasil.

Este estudo se insere na linha de pesquisa Biotecnologia em agropecuária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Nível Doutorado) da Rede Nordeste de Biotecnologia (PPGB/RENORBIO), pela Universidade Federal do Piauí – UFPI. Dessa forma, para compreender os pressupostos deste estudo serão apresentados em forma de artigos além da introdução geral.

No capítulo 1 está contida uma revisão de literatura que aborda o uso de marcadores moleculares em estudos genéticos em abelhas do gênero *Melipona*.

O capítulo 2 dispõe sobre o sequenciamento do genoma da abelha *Melipona subnitida* e sobre a busca por sequências simples repetidas, ou seja, os microssatélites distribuídos no genoma da espécie. O capítulo 3 trata da descrição de *primers* para amplificar as regiões de microssatélites identificadas no capítulo 2 e validação dos mesmos em uma população amostral de *M. subnitida* além da descrição de microssatélites para outra abelha sem ferrão, a *Melipona fasciculata*. O artigo “**Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the stingless bee *Melipona subnitida* using next-generation sequencing**” foi publicado no periódico “Conservation Genetics Resources”, v.7, p.239-241, 2015. ISSN 1877-7252. DOI: 10.1007/s12686-014-0347-9. E o artigo “**Microsatellite markers developed in the stingless bee *Melipona fasciculata* by next-generation sequencing and an exploratory analysis of its geographic genetic variation**” foi submetido e aceito com ajustes no periódico “Molecular Biology Reports”, ISSN: 0301-4851. MOLE-D-15-01132.

No capítulo 4 dispõe do estudo genético populacional utilizando os locos de microssatélite descritos no capítulo 3. E o capítulo 5 traz os resultados da montagem parcial do genoma mitocondrial da abelha *M. subnitida*.

Os autores dos artigos submetidos e a serem submetidos declaram não existir conflitos de interesse.

Referências

- DINIZ, F. M.; IYENGAR, A.; LIMA, P. S. C.; MACLEAN, N.; BENTZEN, P. Application of a double-enrichment procedure for microsatellite isolation and the use of tailed primers for high throughput genotyping. *Genetics and Molecular Biology*, v. 30, p. 380-384, 2007.
- FREITAS, B.M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; MEDINA, L.M.; KLEINERT A.M.P.; GALETTO, L.; NATES-PARRA, G.; QUEZADA-EUÁN, J.J.G. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie*, v.40, p.332-346, 2009.
- GAGNON, M.C.; VAN DER LEE, T.A.J.; BONANTS, P.J.M.; SMITH, D.S.; LI, X.; LÉVESQUE, C. A.; BILODEAU, G.J. Development of Polymorphic Microsatellite Loci for Potato Wart from Next-Generation Sequence Data, *Phytopathology*, Posted online on April 8, 2016. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-12-15-0317-R>.
- HILSDORF, A.W.S.; AZEREDO-ESPIN, A.M.L.; KRIEGER, M.H.; KRIEGER, J.E. Mitochondrial DNA diversity in wild and cultured populations of *Briccon opalinus* from the Paraíba do Sul basin, Brazil. *Aquaculture*, v.214, p.81-91, 2002.
- RUSSO, C.A.M.; MIYAKI, C.Y.; PEREIRA, S.L. Reconstrução filogenética: Métodos geométricos. In: Mاتيoli, SR (ed.) *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos, p.108-116, 2012.
- SILVA, G.R.; SOUZA, B.A.; PEREIRA, F.M.; LOPES, M.T.R.; VALENTE, S.E.; DINIZ, F.M. New molecular evidence for fragmentation between two distant populations of the threatened stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Journal of Hymenoptera Research*, v.38, p.1-9, 2014.
- TSOI, K. H.; WANG, Z.Y.; CHU, K.H. Genetic Divergence Between two Morphologically Similar Varieties of the Kuruma Shrimp. *Marine Biology*, v.147, p.367, 2005.
- WANG, Y. Z.; CAO, L.J.; ZHU, J.Y.; WEI, S.J. Development and Characterization of Novel Microsatellite Markers for the Peach Fruit Moth *Carposina sasakii* (Lepidoptera: Carposinidae) Using Next-Generation Sequencing. *International Journal of Molecular Sciences*, v.17, p. 362, 2016.

CAPÍTULO 1

Dados moleculares em estudos genéticos de abelhas do gênero *Melipona*

*Artigo de Revisão “**Molecular data for genetic studies of the genus *Melipona* bees**”, Isis G. B. Souza e Fábio M. Diniz a ser submetido.

1.1 Resumo

Um dos mais abundantes e diversos grupos de Apoidea encontrados na região Pantropical são as abelhas indígenas “sem ferrão” incluídas na tribo Meliponini. Apresentam grande importância econômica, pela produção de mel, e ecológica por trazer grandes benefícios diretos à fruticultura, agricultura e recuperação de matas ciliares. As abelhas são os agentes mais adaptados, mais eficientes e, portanto, os mais importantes no processo de polinização, havendo muitas vezes grande interdependência entre espécies de plantas e seus respectivos polinizadores, que podem ser únicos. Alterações de seus ambientes causados pelo desmatamento, queimadas, intensificação da atividade agrícola, uso indiscriminado de agrotóxico, ação predatória de meleiros e a introdução de abelhas exóticas vêm contribuindo com a redução das abelhas nativas sem ferrão. Espécies sob esse tipo de ação devem ser objetos de estudos para futuros programas de conservação e marcadores moleculares vêm solucionando diversos problemas dentro do gênero *Melipona*. Esse artigo de revisão visa fornecer um levantamento do uso de marcadores moleculares em estudos genéticos de abelhas sem ferrão do gênero *Melipona*. Por meio desse levantamento podemos concluir que estas espécies de abelhas sem ferrão apresentam-se com baixa variabilidade genética sendo sugerido aqui adotar estratégias ecológicas para repovoar essas espécies dentro do ambiente natural de ocorrência.

Palavras – chave: abelhas sem ferão, marcadores de DNA, programas de conservação

1.2 Introdução

Um dos mais abundantes e diversos grupos de Apoidea encontrados na região Pantropical são as abelhas indígenas “sem ferrão” incluídas na tribo Meliponini (MICHENER, 2007). As condições climáticas unidas a uma diversificação da flora; uma produção ambientalmente limpa; clima quente e maior período de luminosidade são os principais fatores que levaram a ampla distribuição desses indivíduos.

Os meliponíneos apresentam grande importância econômica, pela produção de mel, e ecológica por trazer grandes benefícios diretos à fruticultura, agricultura e recuperação de matas ciliares. As abelhas são os agentes mais adaptados, mais eficientes e, portanto, os mais importantes no processo de polinização, havendo muitas vezes grande interdependência entre espécies de plantas e seus respectivos polinizadores, que podem ser únicos.

Essas abelhas têm sido muito utilizadas na meliponicultura, criação de abelhas da tribo Meliponini, por serem dóceis e pela valorização do mel, mas as populações silvestres as quais controem seus ninhos em troncos de árvores e outros orifícios estão em declínio por alterações de seus ambientes causados pelo desmatamento, queimadas, intensificação da atividade agrícola, uso indiscriminado de agrotóxico e pela ação predatória de meleiros (KERR et al., 1996; FREITAS et al., 2009). Abelhas exóticas também vêm contribuindo com a redução das abelhas sem ferrão nativas principalmente em relação à disputa por alimentos, visto que não conseguem competir em número e agressividade com as abelhas africanizadas. Em muitos casos, a abelha africanizada não consegue fazer a polinização, mas carrega todo o pólen e impede a aproximação de outros polinizadores mais eficazes.

Mais recentemente, são as mudanças climáticas que tem despertado o interesse de pesquisadores para a conservação deste grupo de abelhas e consequente manutenção dos ecossistemas, reduzindo a perda da biodiversidade e o comprometimento das interações entre espécies (KREMEN et al., 2007). Um dos pré-requisitos importantes para o estabelecimento de programas de manejo e conservação eficientes é a determinação da diversidade genética presente nas populações e o entendimento de suas relações evolutivas.

O uso da variabilidade genética existente, oriunda de populações naturais ou introduzidas, está vinculado ao estudo da extensão desta variabilidade na população disponível utilizando-se principalmente de marcadores moleculares que podem ser à base de proteínas (marcadores bioquímicos) e os que usam o próprio DNA (marcadores de DNA). Os primeiros são os produtos diretos dos alelos e os marcadores de DNA são os próprios alelos. Uma desvantagem dos marcadores bioquímicos é a reduzida variabilidade em comparação com os

marcadores baseados no DNA (que identifica uma ampla variabilidade alélica entre indivíduos de uma espécie).

Marcadores moleculares vêm solucionando diversos problemas dentro do gênero *Melipona*, como: estrutura genética e processos evolucionários em *Melipona subnitida* (BONATTI et al., 2014), análises filogenéticas em *Melipona yucatanica* (RUIZ et al., 2014) ou mesmo para estimar a frequência de acasalamentos e a maternidade de machos em *Melipona mondury* (VIANA et al., 2015).

Esse artigo de revisão visa fornecer um levantamento do uso de marcadores moleculares em estudos genéticos de abelhas sem ferrão do gênero *Melipona*.

1.3 Tribo Meliponini

Abelhas da tribo Meliponini, os meliponíneos, também conhecidas como abelhas sem ferrão por possuir ferrão atrofiado, destacam-se dentre os mais abundantes e os principais insetos polinizadores (KERR et al., 2001). Seu tamanho varia desde aproximadamente 2 a até 15 mm. Pertencem à família Apidae e subfamília Apinae e são representadas por vários gêneros e centenas de espécies em todas as regiões tropicais do mundo, bem como na região Neotropical, onde foram descritas 397 espécies e há um grande número delas para descrever (CAMARGO; PEDRO, 2008).

A criação deste grupo de abelhas, chamada meliponicultura, é uma atividade desenvolvida em quase todas as regiões por pequenos e médios produtores (ALVES, 1996) como forma complementar de alimentação e de renda familiar pela venda de produtos destas abelhas (produção de mel, própolis, geoprópolis e cera).

Relativo aos serviços de polinização, avaliação recente demonstrou que das 350.000 espécies de angiospermas 87,5% delas (308.006 espécies) depende da polinização biótica para sua reprodução ou para a manutenção da variabilidade genética (OLLERTON; WINFREE; TARRANT, 2011). Em ecossistemas brasileiros, a estimativa é que os Meliponini sejam responsáveis por até 90% da polinização das espécies nativas (KERR et al., 1996) e muito importante na reintrodução em áreas degradadas ou na polinização dirigida de espécies vegetais de interesse econômico.

1.3.1 Gênero *Melipona*

Na tribo Meliponini é possível destacar o gênero *Melipona* Illiger, por reunir o maior número de espécies, ser restrito à região Neotropical (ROUBIK, 1992) e agrupar algumas das espécies mais criadas com fim comercial. O gênero *Melipona* é caracterizado por apresentar abelhas maiores e com aspecto mais robusto, de tamanho de médio a grande (variando entre 8 a 15 mm). Os ninhos da maioria das espécies Meliponas são construídos geralmente em cavidades de árvores nativas, com exceção da *M. quadrifasciata* Lepeletier que apresenta seus ninhos no solo (MICHENER, 2000). Uma vez ocorrendo o desmatamento de áreas nativas, essas abelhas ficam sem opção de onde construir seus ninhos.

Em regiões do semiárido do Nordeste brasileiro, caracterizado por vegetação xerófila, precipitação baixa e irregular com altas temperaturas, são quatro as espécies de Meliponas registradas: *M. mandacaia*, *M. marginata*, *M. asilvai* e *M. subnitida* (ZANELLA, 2000). Algumas espécies desse gênero assim como outras espécies de abelhas por conta de ação antrópica ou mudanças climáticas vêm sofrendo perdas de alelos, e conseqüentemente havendo uma redução de variabilidade genética o que é importante para a sobrevivência de uma espécie e de sua adaptabilidade ao meio ambiente. Essa redução pode ser verificada por meio de estudos baseados em marcadores moleculares o qual é entendido ser um fragmento de DNA que revela polimorfismos entre indivíduos geneticamente relacionados.

1.4 Marcadores moleculares em estudos genéticos de Meliponas

Abelhas do gênero *Melipona* tem sido objeto de estudos genéticos, uma vez que o conhecimento da estrutura genética e filogeográfica das populações é fundamental para a elaboração das políticas que garantam a conservação desse importante recurso genético.

a) *RAPD*, *ISSR* e *AFLP*

Dentre os marcadores de DNA existem os dominantes e os codominantes. Os primeiros são aqueles que não conseguem distinguir os indivíduos heterozigotos e os segundos são os que conseguem.

Dentre os dominantes a técnica *Randomly amplified polymorphic DNA* (*RAPD*) baseada em regiões aleatórias que são distribuídas ao longo de todo genoma e o *Inter simple sequence repeats* (*ISSR*) baseados em regiões repetitivas do DNA foram os mais utilizados.

O primeiro uso da técnica RAPD em abelhas do gênero *Melipona* foi realizada por Waldschmidt, Barros e Campos (2000) com o objetivo foi identificar marcadores que distinguíssem duas subespécies *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* e *Melipona quadrifasciata anthidioides* (abelhas encontradas ao longo da costa do Estado da Paraíba ao Rio Grande do Sul), importantes agentes polinizadores em muitas regiões brasileiras, e assim aplicá-los em estudos de zonas de hibridização. Somente o *primer* RAPD OPE-O7 foi capaz de distinguir as duas subespécies podendo ser utilizado em estudos da zona de hibridação entre as subespécies.

Em seguida os mesmos autores estimaram a variação genética intercolonial entre 69 colônias de *Melipona quadrifasciata* utilizando ainda a técnica RAPD. Os resultados indicaram uma alta similaridade genética entre as colônias analisadas. De acordo com a distância genética, dois grupos foram distinguidos, um pertencente à subespécie *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* e outro pertencente à subespécie *Melipona quadrifasciata anthidioides* (WALDSCHMIDT et al., 2002).

Outro estudo utilizando o RAPD foi realizado por Tavares et al. (2001) também com a espécie *Melipona quadrifasciata*. Os autores utilizaram 79 *primers* em progênies F1 e em progênies oriundas de retrocruzamentos (cruzamento do zangão filho com a rainha mãe). Foi encontrada um claro padrão de segregação entre as duas progênies mostrando que a técnica foi útil na discriminação desses indivíduos e que pode ser utilizada em análises genéticas para estabelecer um mapa de ligação.

Sobre o marcador dominante o ISSR, Dias (2008) estudou as relações genéticas entre *Melipona rufiventris*, *Melipona mondury* e uma outra espécie identificada como *Melipona* sp. (espécies geneticamente similares mais de diferentes ambientes) de 79 colônias do Estado de Minas Gerais utilizando nove *primers*. A análise de agrupamento resultou na formação de três grupos, distinguindo as três espécies com a presença de bandas exclusivas, o que pode ser justificado pelo baixo fluxo gênico e atuação de forças seletivas das populações.

A diversidade genética da *Melipona quadrifasciata* também foi analisada por meio da técnica ISSR. Nascimento et al. (2010) analisando 61 colônias oriundas do Estado de Minas Gerais obtiveram dois grandes grupos e observaram uma correlação positiva entre os índices de dissimilaridades e as distâncias geográficas implicando num possível isolamento geográfico o que pode ser devido a uma interrupção no fluxo gênico, provocada por barreiras entre localizações mutuamente perto.

Foi também avaliada a diversidade e estrutura genética da *Melipona mandacaia*, uma espécie endêmica da Caatinga, um bioma exclusivamente brasileiro, com a mesma técnica.

Foram estudadas 104 colônias (oriundas de 12 localidades) do Estado da Bahia utilizando 10 *primers* ISSR. Baixos valores de heterozigiosidade foram encontrados, o que pode ser justificado pelo processo de dispersão na origem de novo ninhos. A análise AMOVA revelou uma maior percentual de variação dentro das localidades (70,39%) e esta é geralmente associada à falta ou restrições ao fluxo gênico entre indivíduos de diferentes localidades, o que poderia potencialmente levar a um aumento de endogamia (MIRANDA et al., 2012).

Silva et al. (2014) também usaram ISSR em populações ameaçadas de abelhas *Melipona subnitida*. Foi um estudo pioneiro utilizando técnicas moleculares na espécie. Os autores usaram nove *primers* ISSR em abelhas oriundas de colônias naturais de duas populações de *Melipona subnitida* (amostras do Estado do Rio Grande do Norte e do Estado do Piauí) e observaram uma clara separação entre as duas populações sugerindo uma alta estruturação genética. Ficou evidente a partir deste estudo que as estratégias de conservação devem levar em conta a heterogeneidade dessas duas populações separadas, e abordar ações para a sua sustentabilidade através da integração de resultados com ferramentas ecológicas.

Um estudo realizado para reforçar a presença de duas “formas” da *M. rufiventris* encontradas no Estado de Minas Gerais foi realizado com a combinação dos marcadores microssatélites e da técnica utilizando RAPD e isoenzimas, as quais são marcadores bioquímicos que geralmente são limitados em relação a detecção de variabilidade em comparação com os marcadores baseados no DNA. Oitenta e sete colônias foram analisadas por meio de isoenzimas, 70 por meio do marcador RAPD e 57 de microssatélites. Os resultados indicaram que as populações do Cerrado constituem uma espécie diferente daquela presente na Mata Atlântica de Minas Gerais, sendo as populações do Cerrado *M. rufiventris* e *M. mondury* população encontrada na Mata Atlântica, como originalmente proposto por Melo (2003) (TAVARES et al., 2007).

Outro marcador dominante empregado também em abelhas do gênero *Melipona* é a técnica AFLP (*amplified fragment length polymorphism*). Assim como os RAPDs e ISSRs, é sensível, rápido, relativamente simples e revela vários locos dispersos pelo genoma sem exigir conhecimento prévio da sequência. Makert, Paxton e Hartfelder (2006) utilizaram 580 abelhas *Melipona quadrifasciata* Lepeletier oriundas de três colônias mantidas no apiário do Departamento de Genética no *campus* da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto para otimizar um protocolo para a geração de marcas AFLP em abelhas sem ferrão. Eles descreveram um protocolo otimizado e eficiente para AFLP. Este protocolo diferiu do original (VOS et al., 1995) em usar a digestão com enzimas de restrição em duas etapas utilizando as enzimas EcoRI e Tru1I. O grande número de marcas obtidas da abelha sem ferrão *M.*

quadrifasciata deixou claro o potencial deste protocolo AFLP otimizado em estudos genéticos avançados sobre abelhas sem ferrão, especialmente para análises de alta resolução como necessário para análises de ligação.

b) *Microsatélites*

O marcador molecular nuclear mais utilizado até o momento em estudos genéticos em abelhas sem ferrão são os microsatélites, marcadores codominantes que possuem a capacidade de identificar o indivíduo heterozigoto. São específicos para cada espécie e adicionalmente, possuem a capacidade de amplificação em organismos relacionados, denominada por Amplificação heteróloga. Até então há microsatélites específicos para seis espécies de abelhas sem ferrão do gênero *Melipona* (*M. bicolor* – PETERS et al., 1998; *M. seminigra merrillae* – FRANCINI et al., 2009; *M. rufiventris* – LOPES et al., 2009; *M. interrupta manaosensis* – FRANCINI et al., 2010, *M. mondury* – LOPES et al., 2010 e *M. subnitida* – SOUZA et al., 2015).

Sete locos microsatélites desenvolvidos para *M. bicolor* foram amplificados em 29 abelhas da espécie *M. scutellaris* oriundas de meliponários de 4 estados brasileiros (Alagoas Bahia, Pernambuco e Sergipe) para estudos genéticos. Todos os locos foram polimórficos e apresentaram variação em relação ao número e frequência dos alelos nos diferentes estados. A maioria dos locos não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, sugerindo uma variação diferencial de alelos de cada loco e também entre os locos analisados, como resultado de pequenas populações, além de ações antrópicas, como o desmatamento, seleção e comercialização de enxames entre produtores no país (CARVALHO-ZILSE; KERR, 2006).

Visando traçar planos de conservação e desenvolvimento sustentável, Pinto (2007) comparou a variabilidade genética entre colônias naturais e manejadas de duas espécies de abelhas (*M. compressipes* e *M. seminigra*) em diferentes localidades dos municípios do Estado do Amazonas. Foram utilizados 8 *primers* microsatélites descritos para *M. bicolor* e como resultado *M. compressipes* apresentou uma maior diversidade genética nas colônias manejadas que nas colônias naturais, o que pode ser reflexo de uma manipulação mais intensa das colônias por conta da troca de caixas e rainhas entre os meliponicultores no Estado do Amazonas. Já em *M. seminigra*, ambos os tipos de colônias apresentaram índices de diversidade genética similares, indicando que a meliponicultura ainda tem pouca influência na genética desta espécie no Amazonas.

Werneck (2008) também por meio da amplificação heteróloga utilizou *primers* desenvolvidos para *M. bicolor* para realizar estudos genéticos em populações de *M. mandacaia*.

Sete *primers* foram usados em 105 abelhas do Estado da Bahia onde três foram monomórficos e quatro polimórficos. Nesse estudo foi encontrado um déficit de heterozigotos o que levou a suspeita de subestruturação pelo isolamento por distância. Algumas falhas na amplificação também levaram a presença de alelos nulos. Não se pode também deixar de levar em consideração a baixa quantidade de locos analisados.

Outras 40 abelhas da espécie *M. scutellaris* também foram analisadas com cinco microssatélites desenvolvidos para *M. bicolor* por meio de amplificação heteróloga. Foi encontrada uma variação maior dentro, em vez de entre as populações, indicando que não há estruturação genética nessas abelhas mantidas no Meliponário. Esta aparente homogeneização pode ser devido a intensa atividade meliponícola, incluindo a troca de material genético entre os meliponicultores (CARVALHO-ZILSE et al., 2009).

Silva (2012) caracterizando 5 populações de *M. subnitida* provenientes dos Estados do Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte por meio de *primer* heterólogos encontrou moderada estruturação genética o que confirmou o trabalho pioneiro utilizando ISSR (SILVA et al., 2011). Em conclusão os resultados obtidos apontaram preliminarmente a necessidade de conservação dessas populações em virtude de apresentarem potencial para futuros trabalhos de melhoramento genético.

A espécie *Melipona compressipes* também foi objeto de estudo por meio de marcadores microssatélites heterólogos já que não há até então *primers* específicos para a espécie. Quarenta amostras provenientes do meliponário da Embrapa Meio-Norte (Estado do Piauí) foram amplificadas utilizando oito *primers*. Foi encontrado um número médio de alelos de 4,9 mostrando que esses *primers* heterólogos podem ser utilizados em estudos genéticos na espécie (MACEDO, 2012).

Devido ao grande número de espécies de abelhas e o alto custo necessário para o isolamento de marcadores microssatélites, marcadores heterólogos são uma alternativa útil. No entanto, *primers* específicos possuem uma capacidade maior de obter o nível de diversidade genética real uma vez que são pouco passíveis a erros de genotipagem/amplificação. Lopes et al. (2010) realizaram um estudo comparativo entre amplificação por meio de microssatélites específicos e heterólogos. Foram analisadas abelhas *M. mondury* e *M. rufiventris* coletadas no Estado de Minas Gerais utilizando nove *primers* específicos para *M. mondury*, nove para *M. rufiventris* e nove descritos para *M. bicolor*. O uso de *primers* específicos apresentou uma maior frequência de locos polimórficos e alelos por loco, além de um aumento expressivo em heterozigosidade observada em *M. rufiventris* e *M. Mondury*, reforçando a ideia de que estudos

populacionais deve ser realizados por preferência usando *primers* microssatélites específicos para espécie.

Marcadores específicos foram empregados em estudos de estrutura social e relação genética entre abelhas. Quatro locos de microssatélites específicos foram amplificados em operárias da espécie *M. bicolor* oriundas de colônias monogâmicas (uma rainha) e poligâmicas (mais de uma rainha). Os marcadores foram capazes de evidenciar que a poligamia diminuiu acentuadamente o parentesco entre as operárias do ninho e que esta em *M. bicolor* pode surgir a partir da adoção de rainhas, relacionadas ou não relacionadas (REIS; CAMPOS; TAVARES, 2011).

Outro exemplo de estudo foi realizado por Tavares et al. (2013a), onde os autores utilizaram *primers* específicos para a espécie *M. quadrifasciata*. Abelhas de 127 colônias coletadas de oito estados brasileiros foram analisadas por meio de nove *primers* específicos para a espécie. Uma média de 7,2 alelos por locos foram encontrados e os resultados ainda mostraram um relativo alto nível de multialelismo dos locos estudados.

Os marcadores microssatélites também foram combinados com outras técnicas para avaliar a diversidade genética em abelhas do gênero *Melipona*. Tavares et al. (2013b) investigaram a diversidade e estrutura genética da abelha *M. scutellaris* utilizando cinco marcadores microssatélites específicos e dez *primers* ISSR. Ambos os marcadores produziram resultado similar de baixo nível de diversidade genética.

De acordo com o trabalho de Koser, Francisco e Moreto (2014) onde analisaram tanto *primers* específicos quanto heterólogos em abelhas *Melipona mondury* Smith e *Melipona quadrifasciata* Lepeletier obtiveram uma baixa diversidade genética principalmente na população que foi analisada por meios de *primers* não específicos. Uma primeira explicação para esta baixa variabilidade pode ser a presença de alelos nulos o qual é o resultado de erro na amplificação devido a mutações nas regiões flaqueadoras dos microssatélites.

c) Marcador baseado no mitogenoma

Até o momento foram citados estudos de diversidade genética utilizando técnicas e marcadores nucleares (RAPD, ISSR, AFLP e microssatélites), no entanto, outra classe de marcadores vem sendo bastante usada em abelhas do gênero *Melipona*, os marcadores mitocondriais. Estes, são baseados em regiões do genoma mitocondrial que podem ser analisadas por meio do sequenciamento ou corte com o uso de enzimas de restrição das regiões amplificadas. Em última análise a PCR-RFLP é uma técnica muito eficaz que consiste inicialmente na amplificação de regiões do DNA mitocondrial, no uso de enzimas de restrição

e em seguida na avaliação do polimorfismo dos fragmentos submetidos a eletroforese. É uma técnica menos onerosa em relação ao uso de regiões mitocondriais submetidas ao sequenciamento que demanda o uso de reagentes específicos de custo elevado.

Um dos primeiros estudos baseado em diferenças encontradas no genoma mitocondrial de abelhas do gênero *Melipona* foi realizado por Barni et al. (2007). Foram analisadas diferenças entre abelhas das espécies *M. rufiventris* e *M. mondury*, antes consideradas somente como *M. rufiventris*, de acordo com dados morfológicos. No estudo, o DNA das abelhas foram amplificados por meio de nove pares de *primers* previamente usados para amplificar regiões do DNA mitocondrial de outras abelhas Meliponini. Os dados moleculares confirmaram que se tratava de duas espécies diferentes.

A espécie *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* Lepeletier coletada em três regiões do Sul do Brasil (Blumenau e Mafra – Estado de Santa Catarina e Prudentópolis – Estado Paraná) foi objeto de análises de diversidade genética utilizando o polimorfismo do DNA mitocondrial (PCR-RFLP). Cinco haplótipos foram identificados: dois exclusivos das amostras de Prudentópolis e os outros três registrados nas amostras de Mafra e/ou de Blumenau. Os haplótipos compartilhados pela região Mafra e Blumenau podem ser explicados pelo fluxo gênico mediado por fêmeas entre essas duas regiões geográficas, as quais são conectadas por Mata Atlântica remanescente. Já a exclusividade de haplótipos encontrados em amostras de Prudentópolis indica um possível isolamento em relação as outras populações (TORRES; ARRIAS; MORRETO, 2009).

Outros estudos foram também realizados na diferenciação das subespécie *Melipona quadrifasciata* oriundas de diversas localidades brasileiras utilizando PCR-RFLP (MORETTO; ARIAS, 2005; SOUZA et al., 2008; BATALHA-FILHO et al., 2009).

Regiões do genoma mitocondrial como a que codifica a subunidade citocromo c oxidase I (COI) foram utilizadas para investigar inferências filogeográficas na espécie *Melipona quadrifasciata* a qual compreende duas subespécies: *M. quadrifasciata quadrifasciata* e *M. quadrifasciata anthioides*. A principal diferença entre essas subespécies são as listras amarelas metassomal, que são contínuas em *M. q. quadrifasciata* e descontínua em *M. q. anthioides*. Duas populações foram descritas com listras contínuas e habitando áreas claramente separadas em relação a *M. q. quadrifasciata*. Assim, foi sequenciado 852 pb do gene mitocondrial COI a partir de 145 colônias de 56 localidades brasileiras. As análises filogenéticas revelaram a existência de dois clados exibindo uma distribuição do sul para norte brasileiro: populações do sul compreendem a subespécie *M. q. quadrifasciata* e populações do norte são compostos de *M. q. anthioides* e duas populações disjuntas com listras contínuas. Pelas análises moleculares

foi comprovado que a característica morfológica quanto ao padrão de listras não é um diagnóstico preciso para as subespécies de *M. quadrifasciata* (BATALHA-FILHO et al., 2010).

Estudos filogeográficos utilizando também a região COI do DNA mitocondrial foram realizados com o objetivo de desvendar a sistemática molecular em insetos. Cristiano, Fernandes-Salomão e Yotoko (2012) sequenciaram a região COI de 74 indivíduos da espécie *M. capixaba* e buscaram a mesma sequência de outras espécies do gênero *Melipona* e de outros gêneros no GENBANK visando obter uma árvore filogenética. Todas as sequências do gênero *Melipona* foram agrupadas monofileticamente, indicando uma origem comum para as abelhas desse gênero.

A diversidade genética e a filogeografia foram estudadas em duas espécies de abelhas sem ferrão, *M. capixaba* e *M. scutellaris*, utilizando parte do gene COI e alguns genes nucleares. Como resultado foi obtido que essas duas espécies se comportam como irmãs na árvore filogenética o que confirmaram a hipótese de Moure e Camargo (1994) que além das semelhanças morfológicas as espécies também são próximas geneticamente. Assim, marcadores mitocondriais podem ser úteis em estudos de diversidade genética e em estudos filogenéticos, depende da região que será estudada e do nível taxonômico (RESENDE, 2012).

M. subnitida também foi objeto de estudo de diversidade utilizando a região COI. Essa região foi estudada para se obter um melhor entendimento da estrutura genética e dos processos evolucionários que envolve a atual variabilidade da espécie afim de auxiliar estratégias de conservação. Foram coletadas 95 operárias originárias de colônias naturais de seis estados nordestinos brasileiros. O método foi efetivo em captar a baixa variação gerada pela baixa dispersão uma característica encontrada em abelhas da espécie *M. subnitida* – atualmente habitante de áreas fragmentadas e de ambientes isolados geograficamente. Os resultados também indicaram que se trata de uma espécie jovem com grande diversidade haplotípica até quando estudado um tamanho amostral limitado (BONATTI et al., 2014).

Marcadores microssatélites e as técnicas PCR-RFLPs e ISSR foram combinados para estudar *M. capixaba*, uma abelha endêmica da Mata Atlântica do Estado do Espírito Santo e de pequeno tamanho populacional. As análises moleculares combinadas indicaram uma alta similaridade genética e uma baixa estruturação genética entre as populações estudadas podendo ser consideradas como uma única população para estratégias de conservação (NOGUEIRA et al., 2014). Microssatélites e PCR-RFLPs também foram usados em abelhas sem ferrão *M. marginata*, os resultados obtidos foram similares quanto a estruturação das populações, mas divergiram quanto a proximidade das mesmas (MORESCO, 2009). Outros estudos também combinaram marcadores moleculares microssatélite e marcadores baseados em regiões do

DNA mitocondrial para diferenciar populações do gênero *Melipona* (QUEZADA-EUÁN et al., 2007; RAMIRÉZ, 2008; MORESCO, 2009; MAY-ITZÁ et al., 2010).

Uma abordagem diferente utilizando regiões mitocondriais foi realizada por Souza e Carvalho-Zilse (2014) em abelhas sem ferrão amazônicas a fim de maximizar a implementação de técnicas para identificação taxonômicas. Os genes 16S do RNA ribossômico e a região que codifica a COI do DNA mitocondrial foram usadas para diferenciar nove espécies amazônicas (*Melipona eburnea*, *Melipona seminigra*, *Melipona interrupta*, *Melipona nebulosa*, *Melipona rufiventris*, *Melipona dubia*, *Scaptotrigona polysticta*, *Scaptotrigona* sp, e *Trigona williana*) baseado no polimorfismo de DNA, utilizando a técnica PCR-SSCP (*single-strand conformation polymorphism*). É uma técnica sensível em identificar diferenças nas sequências de DNA, permitindo um rápido processamento de um largo número de amostras na pesquisa de marcadores específicos. Foi registrado diferentes e exclusivos haplótipos SSCP para ambos os genes em todas as espécies analisadas. Os resultados demonstram que a técnica SSCP é simples e de baixo custo efetivo podendo ser usada na identificação molecular de espécies sem ferrão.

d) *ITS 1 e ITS 2*

Além de marcadores nucleares dominantes, codominantes e de marcadores mitocondriais outro tipo de marcador nuclear também é apropriado para análises genéticas da variação molecular em abelhas do gênero *Melipona*. É o marcador baseado na região ribossomal *internal transcriber spacer* (ITS 1 e ITS 2) que é uma região não codificante e de evolução rápida (DOVER, 1982). A variação encontrada em sequências na região ITS1 foi eficiente para inferir relações entre oito espécies do gênero *Melipona* (FERNANDES-SALOMÃO et al., 2005), para avaliar a variação intraespecífica em populações de *M. subnitida* do Nordeste brasileiro (CRUZ et al., 2006), para ajudar a determinar se as abelhas *M. quinquefasciatus* encontradas recentemente no Nordeste do Brasil são, de fato, uma população de uma espécie descontínuos, uma sub-espécie ou até mesmo uma nova espécie (PEREIRA et al., 2009) e para avaliar a variabilidade intra-específica dentro da espécie *Melipona beecheii* (MAY-ITZÁ et al., 2009).

A sequência ITS 2 foi utilizada para caracterizar duas espécies (*Melipona beecheii* e *Melipona yucatanica*) e ecótipos putativos, por determinação da sua sequência completa e, por meio de ensaios de RFLP realizadas nesta região. Ambos os tipos de dados foram, portanto, útil para avaliar a variabilidade genética intra e interespecífica, e para o desenvolvimento de estratégias de conservação adequadas para as duas espécies (DE LA RÚA et al., 2007).

Mais recentemente ferramentas morfométricas e moleculares (ITS 1) foram usadas em *Melipona beecheii*, com o objetivo de investigar os padrões da variação fenotípica e molecular das populações em toda a Mesoamérica. Os resultados combinados confirmaram a presença de duas unidades taxonômicas: uma distribuída no sul do México e uma unidade da América. Estas unidades devem ser consideradas separadamente no âmbito de programas de conservação e de por conseguinte, troca de colônia entre elas deveria ser evitada (MAY-ITZÁ et al., 2012).

Foi caracterizada também a região ITS 1 completa em duas populações do México e Guatemala da abelha sobre ameaça *M. yucatanica* Camargo, Moure e Roubik. As análises filogenéticas mostraram baixa variação genética entre as populações, mas definiu uma estrutura geográfica com amostras mexicanas e guatemaltecas formando dois clados bem suportados. A baixa variação genética encontrada entre as populações pela ITS 1 contrasta com alta variação genética encontrada com os marcadores COX1 e microssatélites (MAY-ITZÁ et al., 2010). No entanto, os resultados destacam a utilidade do ITS 1 para a caracterização de populações de abelhas sem ferrão (RUIZ et al., 2014).

A presente revisão objetivou concentrar os mais relevantes estudos genéticos que utilizaram ferramentas moleculares envolvidas na conservação de abelhas do gênero *Melipona* a fim de auxiliar trabalhos voltados à genética populacional da espécie. A partir dos resultados é possível elaborar estratégias para a conservação e também para programas de melhoramento. Para espécies de baixa variabilidade, como as encontradas nesta revisão, é possível adotar, por exemplo, a modelagem de nicho ecológico. A qual trata-se de um levantamento de todas as características ambientais, tais como, temperatura, precipitação, topografia dentre outras, da ocorrência da espécie e em seguida sugerir possíveis localidades para a reintrodução ou introdução dessas espécies para um possível repovoamento. No caso das abelhas do gênero *Melipona* que tem preferência por plantas nativas para a construção de seus ninhos, faz-se necessário a união da técnica de modelagem com o plantio dessas plantas nativas em áreas em que já foram devastadas.

1.5 Referências

- ALVES, R.M.O. Meliponicultura: aspectos práticos. In: Anais do XI Congresso Brasileiro de Apicultura (Teresina, CBA), p. 95-98. 1996.
- BARNI, G.S.; STRAPAZZON, R.; GERRA, J.V.C.; MORETTO, G. Mitochondrial genome differences between the stingless bees *Melipona rufiventris* and *Melipona mondury* (Apidae: Meliponini). *Genetics and Molecular Research*, v.6, p.8–14, 2007.
- BATALHA-FILHO, H.; MELO, G.A.R.; WALDSCHMIDT, A.M.; CAMPOS, L.A.O.; FERNANDES-SALOMÃO, T.M. Geographic distribution and spatial differentiation in the color pattern of abdominal stripes of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). *Zoologia*, v.26, p.213–219, 2009.
- BATALHA-FILHO, H.; WALDSCHMIDT, A.M.; CAMPOS, L.A.O.; TAVARES, M.G.; FERNANDES-SALOMÃO, T.M. Phylogeography and historical demography of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie*, v.41, p.534-547, 2010.
- BONATTI, V.; SIMÕES, Z.L.P.; FRANCO, F.F.; FRANCOY, T.M. Evidence of at least two evolutionary lineages in *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) suggested by mtDNA variability and geometric morphometrics of forewings. *Naturwissenschaften*, v.101, p.17-24, 2014.
- CAMARGO, J.M.F.; PEDRO, S.R.M. Revisão das espécies de *Melipona* do grupo fuliginosa (Hymenoptera, Apoidea, Apidae, Meliponini). *Rev. Bras. Ent.* v.52, p.411-427, 2008.
- CARVALHO-ZILSE, G.A.; COSTA-PINTO, M.F.F.; NUNES-SILVA, C.G.; KERR, W.E. Does beekeeping reduce genetic variability in *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini)? *Genetics and Molecular Research*, v.8, p.758-765, 2009.
- CARVALHO-ZILSE, G.A.; KERR, W.E. Utilização de marcadores microssatélites para estudos populacionais em *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). *Magistra*, v.18, p.213-220, 2006.
- CRISTIANO, M.P.; FERNANDES-SALOMÃO, T.M.; YOTOKO, K.S.C. Nuclear mitochondrial DNA: an Achilles' heel of molecular systematics, phylogenetics, and phylogeographic studies of stingless bees. *Apidologie*, v.43, p.527-538, 2012.
- CRUZ, D.O.; JORGE, D.M.M.; PEREIRA, J.O.P.; TORRES, D.C.; SOARES, C.E.A.; FREITAS, B.M.; GRANGEIRO, T.B. Intraspecific variation in the first internal transcribed spacer (ITS1) of the nuclear ribosomal DNA in *Melipona subnitida* (Hymenoptera, Apidae), an endemic stingless bee from northeastern Brazil. *Apidologie*, v.37, p.376–386, 2006.
- DE LA RÚA, P.; MAY-ITZÁ, W.J.; SERRANO, J.; QUEZADA-EUÁN, J.J.G. Sequence and RFLP analysis of the ITS2 ribosomal DNA in two Neotropical social bees, *Melipona beecheii* and *Melipona yucatanica* (Apidae: Meliponini). *Insectes Sociaux*, v.54, p.418–423, 2007.
- DIAS, F.G. Diferenciação genética entre *Melipona mondury*, Smith, 1863, *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836 e *Melipona* sp. (Hymenoptera, Apidae) no Estado de Minas

Gerais, Brasil, utilizando marcadores ISSR. 2008. Dissertação (Mestrado em entomologia). Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais.

DOVER, G. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature*, v.299, p.111–117, 1982.

FERNANDES-SALOMÃO, T.M.; ROCHA, R.B.; CAMPOS, L.A.O.; ARAFFLJO, E.F. The first internal transcribed spacer (ITS-1) of *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): characterization and phylogenetic analysis. *Insectes Sociaux*, v.52, p.11–18, 2005.

FRANCINI, I.B.; SFORÇA, D.A.; SOUSA, A.C.B.; CAMPOS, T.; CIDADE, F.W.; ZUCCHI, M.I.; SOUZA, A.P.; NUNES-SILVA, C.G.; CARVALHO-ZILSE, G.A. Microsatellite loci for an endemic stingless bee *Melipona seminigra merrillae* (Apidae, Meliponini) from Amazon. *Conservation Genetics Resources*, v.1, p.487-490, 2009.

FRANCINI, I.B.; SOUSA, A.C.B.; SFORÇA, D.A.; COSTA-PINTO, M.F.F.; CAMPOS, T.; NUNES-SILVA, C.G.; ZUCCHI, M.I.; SOUZA, A.P.; CARVALHO-ZILSE, G.A. Isolation and characterization of microsatellite loci in the stingless bee *Melipona interrupta manaosensis* (Apidae: Meliponini). *Conservation Genetics Resources*, v.2, p.27-30, 2010.

FREITAS, B.M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; MEDINA, L.M.; KLEINERT A.M.P.; GALETTO, L.; NATES-PARRA, G.; QUEZADA-EUÁN, J.J.G. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie*, v.40, p.332-346, 2009.

GREEN, C.L., FRANCK, P., OLDROYD, P. Characterization of microsatellite loci for *Trigona carbonaria*, a stingless bee endemic to Australia. *Mol Ecol*. v.1, p.89-92, 2001.

KERR, W.E. Biologia e manejo da tíúba: a abelha do Maranhão. Dissertação de mestrado. EDUFMA. São Luis, MA. 156pp, 1996.

KERR, W.E.; CARVALHO, G.A.; SILVA, A.C.; ASSIS, M.G.P. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parcerias Estratégicas*, v.12, p.20-41, 2001.

KOSER, J.R.; FRANCISCO, F.O.; MORETTO, G. Genetic Variability of Stingless Bees *Melipona mondury* Smith and *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae) from a Meliponary. *Sociobiology*, v.61, p.313-317, 2014.

KREMEN C.; WILLIAMS N.M.; AIZEN M.A.; GEMMILL-HERREN B.; LEBUHN G., MINCKLEY R.; PACKER L.; POTTS S.G.; ROULSON T.; STEFFAN-DEWENTER I., VÁZQUEZ, D.P.; WINFREE, R.; ADAMS, L.; CRONE, E.E.; GREENLEAF, S.S.; KEITT, T.H., KLEIN, A.M.; REGETZ, J.; RICKETTS, T.H. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. *Ecology Letters*, v.10, p.299-314, 2007.

LOPES, D.M.; SILVA, F.O.D.; SALOMAO, T.M.F.; CAMPOS, L.A.D.O.; TAVARES, M.G. Microsatellite loci for the stingless bee *Melipona rufiventris* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Ecology Resource*, v.9, p.923-925, 2009.

LOPES, D.M.; CAMPOS, L.A.O.; SALOMÃO, T.M.F.; TAVARES, M.G. Comparative study on the use of specific and heterologous microsatellites primers in the stingless bees *Melipona rufiventris* and *M. mondury* (Hymenoptera, Apidae). *Genetics and Molecular Biology*, v.33, p.390-393, 2010.

MACEDO, I.S. Amplificação heteróloga de microssatélites de DNA e diversidade genética em túbua, *Melipona Compressipes* (Fabricius, 1804). Dissertação (Mestrado em em Ciência Animal), Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2012.

MAKERT, G.R.; PAXTON, R.J.; HARTFELDER, K. An optimized method for the generation of AFLP markers in a stingless bee (*Melipona quadrifasciata*) reveals a high degree of intracolony genetic polymorphism. *Apidologie*, v.37, p.687–698, 2006.

MAY-ITZÁ, W.J.; QUEZADA-EUÁN, J.J.G.; DE LA RÚA, P. Intraspecific variation in the stingless bee *Melipona beecheii* assessed with PCR-RFLP of the ITS1 ribosomal DNA. *Apidologie*, v.40, p.549–555, 2009.

MAY-ITZÁ, W.J.; QUEZADA-EUÁN, J.J.G.; MEDINA MEDINA, L.; ENRÍQUEZ, E.; DE LA RÚA, P. Morphometric and genetic differentiation in isolated populations of the endangered Mesoamerican stingless bee *Melipona yucatanica* (Hymenoptera: Apoidea) suggest the existence of a two species complex. *Conservation Genetics*, v.11, p.2079-2084, 2010.

MAY-ITZÁ, W.J.; QUEZADA-EUÁN, J.J.G.; AYALA, R.; DE LA RÚA, P. Morphometric and genetic analyses differentiate Mesoamerican populations of the endangered stingless bee *Melipona beecheii* (Hymenoptera: Meliponidae) and support their conservation as two separate units. *Journal of Insect Conservation*, v.16, p.723-731, 2012.

MELO, G.A.R. Notas sobre meliponíneos neotropicais (Hymenoptera, Apidae), com a descrição de três novas espécies. In: Melo GAR and Santos IA (eds) Apoidea Neotropical. Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure. UNESCO, Santa Catarina, pp 85-92, 2003.

MICHENER, C.D. The Bees of the World. London: The Johns Hopkins University Press, 2000, 913 p.

MICHENER, C.D.. The bees of the World. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 2007, 953 p

MIRANDA, E.A.; BATALHA-FILHO, H.; OLIVEIRA, P.S.; ALVES, R.M.O.; CAMPOS, L. A. O.; WALDSCHMIDT, A.M. Genetic diversity of *Melipona mandacaia* Smith 1863 (Hymenoptera, Apidae), an endemic bee species from Brazilian Caatinga, using ISSR. *Psyche*, p.1-6, 2012.

MORESCO, A.R.C. Análise populacional de *Melipona marginata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de RFLP do DNA mitocondrial e microssatélites. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MORETTO, G.; ARIAS, M.C. Detection of mitochondrial DNA restriction site differences between the subspecies of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Neotropical Entomology*, v.34, p.381–385, 2005.

- MOURE, J.S.; J.M.F. CAMARGO. *Melipona* (Michmelia) *capixaba*, uma nova espécie de meliponinae (Hymenoptera, Apidae) do sudeste do Brasil. *Revta Bras. Zool.* v.11, p.289-296, 1994.
- NASCIMENTO, M.A.; BATALHA-FILHO, H., WALDSCHMIDT, A.M., TAVARES, M.G.; CAMPOS, A.O.; SALOMÃO, T.M.F. Variation and genetic structure of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) populations based on ISSR pattern. *Genetics and Molecular Biology*, v.33, p.394–397, 2010.
- NOGUEIRA, J.; RAMOS, J.C.; BENEVENUTO, J.; FERNANDES-SALOMÃO, T.M.; RESENDE, H.C.; CAMPOS, L.A.O.; TAVARES, M.G. Conservation study of an endangered stingless bee (*Melipona capixaba* - Hymenoptera: Apidae) with restricted distribution in Brazil. *Journal of Insect Conservation*, v.18, p.317–326, 2014.
- OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, v. 120, n. 3, p. 321–326, 2011.
- PEREIRA, J.O.P.; FREITAS, B.M.; JORGE, D.M.M.; TORRES, D.C.; SOARES, C.E.A.; GRANGEIRO, T.B. Genetic variability in *Melipona quinquefasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) from northeastern Brazil determined using the first internal transcribed spacer (ITS1). *Genetics and Molecular Research*, v.8, p.641–648, 2009.
- PETERS, J.M.; QUELLER, D.C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; STRASSMANN, J.E.; Microsatellite loci for stingless bees. *Molecular Ecology*, v.7, p.783–792, 1998.
- PINTO, C. M. F. F. Caracterização dos locos microssatélites em duas espécies de abelhas da região Amazônica: *Melipona compressipes* e *Melipona seminigra* (Hymenoptera; Apidae; Meliponini). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas com ênfase em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva), Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2007.
- QUEZADA-EUÁN, J.J.G.; PAXTON, R.J.; PALMER, K.A.; ITZA, W.D.M.; TAY, W.T.; OLDROYD, B.P. Morphological and molecular characters reveal differentiation in a Neotropical social bee, *Melipona beecheii* (Apidae: Meliponini). *Apidologie*, v.38, p.247–258, 2007.
- RAMÍREZ, S.A. Detecção de sítios de restrição no DNA mitocondrial e estudo da variabilidade genética do genoma nuclear em abelhas *Melipona mondury* da região do Vale do Itajaí, Estado de Santa Catarina. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade Regional de Blumenau, Santa Catarina, 2008.
- REIS, E. P.; CAMPOS, L. A. P.; TAVARES, M. G. Prediction social structure and genetic relatedness in colonies of the facultative polygynous stingless bees *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae). *Genetic Molecular Biology*, v.34, p.338-344, 2011.
- RESENDE, R.C. Filogeografia e conservação de *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994 e *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, e biogeografia do gênero *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera: Apidae). Tese (Doutorado em Genética e melhoramento), Viçosa, Minas Gerais, 2012.

ROUBIK, D. W. Ecology and natural history of tropical bees. 1. ed. 1992, 514p.

RUIZ, C.; MAY-ITZÁ, W.J.; QUEZADA-EUÁN, J.J.G.; DE LA RÚA, P. Utility of the ITS1 Region for Phylogenetic Analysis in Stingless Bees: a Case Study of the Endangered *Melipona yucatanica* Camargo, Moure and Roubik (Hymenoptera: Meliponini). *Sociobiology*, v.61, p.470-477, 2014.

SILVA, G.R. Caracterização genética de populações da abelha sem ferrão *Melipona subnitida* Ducke, 1910 no Nordeste do Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2012.

SILVA, G.R. Diversidade genética e estrutura populacional de abelhas *Melipona subnitida* (Jandaíra) por meio do marcador molecular ISSR. Monografia (Ciências Biológicas), Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2011.

SOUZA, I.G.B.; PATERSON, I.; MCBRIDE, M.C.; SOUZA, B.A.; PEREIRA, F.M.; LOPES, M.T.R.; PAUL BENTZEN, DINIZ, F.M. Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the stingless bee *Melipona subnitida* using next-generation sequencing. *Conservation Genetics Resources*, v.7, p.239-241, 2015.

SOUZA, R.O.; MORETTO, G.; ARIAS, M.C.; DEL LAMA, M.A. Differentiation of *Melipona quadrifasciata* L. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) subspecies using cytochrome b PCR-RFLP patterns. *Genetics and Molecular Biology*, v.30, p.445-450, 2008.

SOUZA, M.T.; CARVALHO-ZILSE, G.A. Molecular identification of Amazonian stingless bees using polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. *Genetics and Molecular Research*, v.13, p.5507-5513, 2014.

TAVARES, M.G.; RIBEIRO, E.H.; CAMPOS, L.A.O.; BARROS, E.G.; OLIVEIRA, M. T.V.A. Inheritance pattern of RAPD markers in *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Journal of Heredity*, v.92, p.279-282, 2001.

TAVARES, M.G.; DIAS, L.A.S.; BORGES, A.A.; LOPES, D.M.; BUSSE, A.H.P.; COSTA, R.G.; FERNANDES-SALOMÃO, T.M.; CAMPOS, L.A.O. Genetic divergence between population of the stingless bee urucu amarela (*Melipona rufiventris* group, Hymenoptera, Meliponini): Is there a new *Melipona* species in the Brazilian state of Minas Gerais. *Genetic Molecular Biology*, v.30, p.667-675, 2007.

TAVARES, M.G.; ALMEIDA, B.S.; PASSAMANI, P.Z.; PAIVA, S.R.; RESENDE, H.C.; CAMPOS, L.A.O.; ALVES, R.M.O.; WALDSCHMIDT, A.M. Genetic variability and population structure in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae) from Bahia, Brazil, based on molecular markers. *Apidologie (Celle)*, v.44, p.720-728, 2013a.

TAVARES, M. G.; PIETRANI, N.T.; DURVALE, M.C.; RESENDE, H. C.; CAMPOS, L. A. O. Genetic divergence between populations of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae). *Genetics and Molecular Biology (Impresso)*, v.36, p.111-117, 2013b.

TORRES, R.T.; ARIAS, M.C.; MORETTO, G. Mitochondrial DNA polymorphism among populations of *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* Lepeletier (Apidae: Meliponini) from southern Brazil. *Neotropical Entomology*, v.38, p. 208-212, 2009.

VIANA, M.V.C.; MIRANDA, E.A.; FRANCISCO, A.K.; CARVALHO, C.A.L.; WALDSCHMIDT, A.M. Transferability of microsatellite primers developed for stingless bees to four other species of genus *Melipona*, *Genetics and Molecular Research*, v.10, p.3942-3947, 2011.

VIANA, M.V.C.; CARVALHO, C. A. L.; SOUSA, H. A. C.; FRANCISCO, A. K.; WALDSCHMIDT, A. M. Mating frequency and maternity of males in *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae), *Insectes Sociaux*, v.62, p. 491-495, 2015.

VOS, P.; ROGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRITJERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPE, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Res.* v.23, p.4414, 1995.

ZANELLA, F.C.V. The bees of the Caatinga (Hymenoptera, Apoidea, Apiformes): A species list and comparative notes regarding their distribution. *Apidologie*. v. 31, p. 579-592, 2000.

WALDSCHMIDT, A.M.; BARROS, E.G.; CAMPOS, L.A.O. A molecular marker distinguishes the subspecies *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genetics and Molecular Biology*, v.23, p.609–611, 2000.

WALDSCHMIDT, A.M.; MARCO-JÚNIOR, P.; BARROS, E.G.; CAMPOS, L.A.O. Genetic analysis of *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) with RAPD markers. *Brazilian Journal of Biology*, v.62, p.923–928, 2002.

WERNECK, M.V. Uso de marcadores microssatélites para análise genética de populações de *Melipona mandacaia* SMITH, 1863 (Hymenoptera, Apoidea) no Estado da Bahia. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.

CAPÍTULO 2

Sequências simples repetidas no genoma da abelha sem ferrão *Melipona subnitida* Ducke (Apidae: Meliponini): abundância, composição e variação do comprimento

*Estudo realizado em parceria com a Dalhousie University (Canadá), Department of Biology, Marine Gene Probe Laboratory.

Artigo: “Identification and abundance of microsatellite Motifs in the stingless bee *Melipona subnitida* (Apidae: Meliponini). Isis Gomes de Brito Souza, Paul Bentzen, Bruno de Almeida Souza, Fábio Mendonça Diniz a ser submetido

2.1 Resumo

Várias sequências do genoma de diversos organismos estão disponíveis em bancos genéticos de busca. Contudo, o conhecimento disponível sobre distribuição de microssatélites em abelhas é limitado. Neste estudo, nós relatamos a caracterização de microssatélites no genoma eucariota da abelha *Melipona subnitida*. Foram realizadas buscas de locos microssatélites no genoma sequenciado da abelha *M. subnitida* e identificados 5.574 locos de microssatélites perfeitos, sendo os dinucleotídeos a classe mais abundante com 89,7% do total, seguido de trinucleotídeos (6,4%), tetranucleotídeos (2,7%), pentanucleotídeos (0,7%) e hexanucleotídeos (0,5%). Seis, 16, 29, 20 e 18 tipos de dinucleotídeos, trinucleotídeos, tetranucleotídeo, pentanucleotídeos e hexanucleotídeos foram encontrados, respectivamente. O maior número de repetição encontrado foi 41 e o motivo mais frequente foi o do dinucleotídeo CT. Este foi o primeiro estudo de busca de locos microssatélites para *M. subnitida* e será utilizado para a descrição de marcadores moleculares que serão utilizados em análises genéticas de distintas populações de abelhas.

Palavras - chave: abelha nativa, marcador molecular, variabilidade genética.

2.2 Introdução

A Jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke), uma abelha com ferrão atrofiado nativa do Brasil, não é somente associada com a produção de mel e de frutos, mas também com a manutenção do meio ambiente (SILVA et al., 2006). Entretanto, com a degradação ambiental, o tamanho natural dessas populações de abelhas vem declinando rapidamente e, o uso de marcadores moleculares tem sido uma estratégia eficiente para avaliar a variabilidade genética desses organismos gerando informações de grande importância para um manejo sustentável.

Os microssatélites são uma classe de marcadores amplamente utilizados devido às suas características únicas quando comparados com outros marcadores (McBRIDE et al., 2014). Eles consistem em pequenas sequências de 2-6 nucleotídeos que estão espalhadas por todo o genoma de organismos eucarióticos. São considerados os marcadores mais utilizados para estudos de população devido à sua natureza multialélica, alto nível de polimorfismo e herança codominante (DINIZ et al., 2007).

Os métodos tradicionais para a identificação de marcadores microssatélites geralmente exigem a construção de bibliotecas de pequena inserção genômica, seleção de colônia usando microssatélites para hibridização da sonda, sequenciamento dos clones selecionados, desenho de *primers* para regiões de flanqueamento adequada e avaliações do polimorfismo do marcador via PCR (*Polymerase chain reaction*) em amostras da população (BRITTO et al., 2009). Mais recentemente, grupos de investigação têm aplicado tecnologias de sequenciamento de nova geração para gerar dados de sequências para a identificação de regiões microssatélites e desenho de *primers* (LI et al., 2014; RICO et al., 2014). Para esta finalidade, tanto o DNA genômico quanto as regiões gênicas (usando bibliotecas de cDNA) são utilizados como moldes para o sequenciamento.

Nos últimos anos, várias sequências do genoma de diversos organismos estão disponíveis em bancos genéticos de busca (LOPEZ et al., 2015; WANG et al., 2015), fornecendo dados importantes para estudos populacionais genéticos. Contudo, o conhecimento disponível sobre distribuição de microssatélites em abelhas é limitado. Neste estudo, nós relatamos a busca e caracterização de microssatélites no genoma eucariota da abelha *Melipona subnitida*.

2.3 Material e Métodos

Abelhas operárias da espécie *M. subnitida* foram coletadas em colmeias no Estado do Piauí, Brasil. No Laboratório de Biologia molecular e Biotecnologia da Embrapa Meio-Norte (Teresina-PI-Brasil) o DNA genômico total foi extraído a partir do tórax de cinco indivíduos, seguindo recomendações de Sambrook e Russell (2001).

No laboratório Marine Gene Probe do departamento de Biologia na Dalhousie University (Halifax-Canadá) um único indivíduo com o maior rendimento e qualidade de DNA foi selecionado para o sequenciamento, sendo quantificado pelo ensaio de Pico Green dsDNA (Thermo Fisher Scientific - Waltham, MA, EUA) em um quantificador de DNA Perkin Elmer (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts).

Uma biblioteca Illumina *paired-end* foi criada seguindo o protocolo padrão da Illumina Nextera DNA Kit Preparação de Amostras (Illumina Inc., San Diego, Califórnia) e em seguida as amostras foram sequenciadas por meio de um MiSeq Benchtop (Illumina Inc., San Diego, Califórnia). As sequências contíguas (*contigs*) foram montadas *de novo* a partir das sequências *paired-end* resultantes usando o software CLC Genomics Workbench 7.0.4 (bio CLC, Aarhus, Dinamarca).

Os *contigs* no formato FASTA foram submetidos ao software Msatcommander 0.8.2 (FAIRCLOTH, 2008) para a busca de possíveis repetições (marcadores microssatélites). Foram feitas busca combinada para motivos de dinucleotídeos, trinucleotídeos, tetranucleotídeo, pentanucleotídeos e hexanucleotídeos com 10, 9, 8, 7 e seis repetições ou mais, respectivamente. Foram calculadas: a porcentagem de tipos de motivo, comprimentos e variação da frequência.

Um resumo da metodologia é encontrado no fluxograma a seguir (Figura 1).

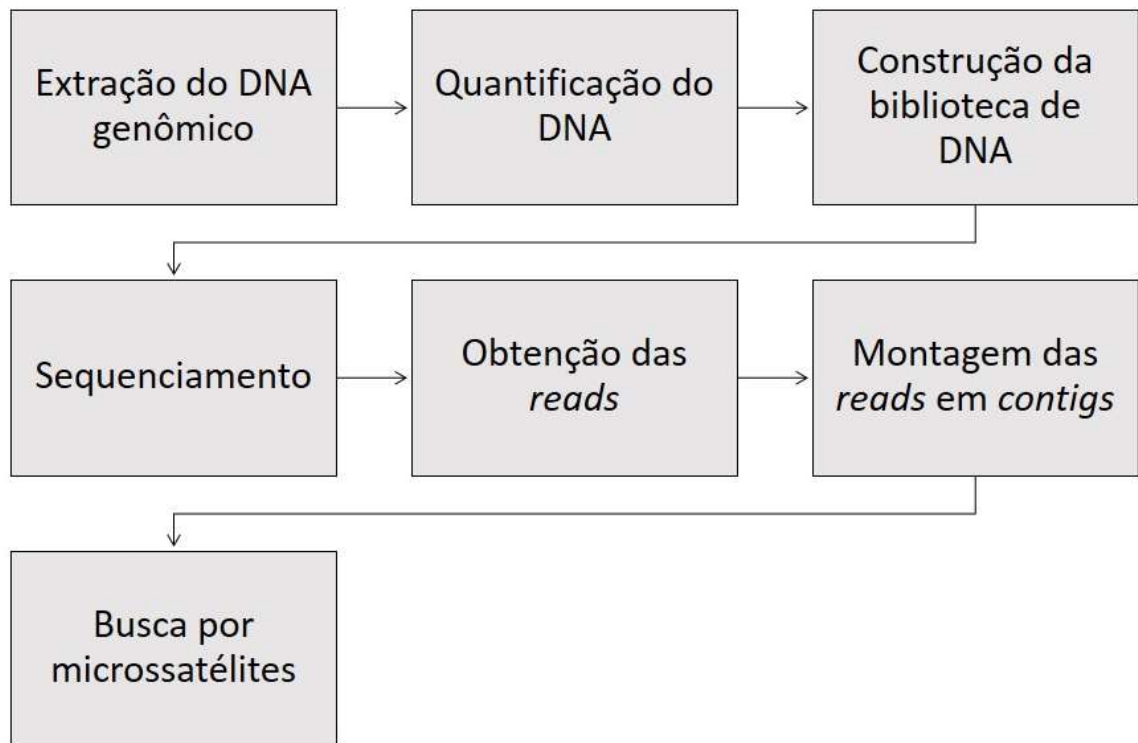


Figura 1 Metodologia para a busca de microsatélites utilizando a tecnologia de sequenciamento de nova geração

2.4 Resultados e Discussão

Tecnologias de sequenciamento de nova geração têm sido utilizadas em muitos organismos devido, principalmente, ao resultado rápido e por ser de baixo custo por par de bases. Em *M. subnitida* a corrida de sequenciamento produziu 2.533.648 *reads* com 633.411.884 bases totais e o teor de GC (guanina e citosina) de 266.685.755 (42%). As *reads* montadas totalizaram 141.412 *contigs* e o Msatcommander identificou 5.574 locos de microssatélites perfeitos. Usando a mesma tecnologia Illumina de sequenciamento de duas espécies de inseto, Andersen e Mills (2014) obtiveram 65.535 *contigs* para a espécie *Trioxys pallidus* (uma vespa) e 474.388 *contigs* para a espécie *Chromaphis juglandicola* (um pulgão).

Entre os microssatélites totais identificados, a quantidade de repetições dinucleotídicas foi a mais abundante com 89,7% do total, seguido de trinucleotídeos (6,4%), tetranucleotídeos (2,7%), pentanucleotídeos (0,7%) e hexanucleotídeos (0,5%). Como marcadores moleculares, as repetições dinucleotídicas são mais importantes do que os outros microssatélites por apresentarem taxas de mutação mais elevadas (KARAOGLU; LEE; MEYER, 2005). No entanto, as outras repetições, como as tetranucleotídicas por ter facilidade de imagem e *scoring* têm sido preferidas em estudos populacionais. A ocorrência de repetições pentanucleotídicas e hexanucleotídicas foi bem menor do que a dos outros motivos.

Andersen e Mills (2014) avaliaram três programas (MSATCOMMANDER, Phobos e iMSAT) para busca *in silico* de sequências simples repetidas em duas espécies de insetos (*Trioxys pallidus* e *Chromaphis juglandicola*). Para *T. pallidus* os dinucleotídeos foram o tipo mais abundante identificados por todos os três programas entre 55 e 65%, os trinucleotídeos representaram entre 31 e 38% e tetranucleotídeos combinados com pentanucleotídeos entre 4% e 6%. Para *C. juglandicola*, os dinucleotídeos foram novamente a maioria de tipo abundante identificado por todos os três programas (82 - 93%). No entanto, para esta espécie, os trinucleotídeos foram raros (4,6 - 17%), enquanto tetra e pentanucleotídeos foram extremamente raro (0 - 3%) assim como em nosso estudo. Pela comparação, o programa MSATCOMMANDER conseguiu identificar mais sequências simples repetidas.

Seis, 16, 29, 20 e 18 tipos de dinucleotídeos, trinucleotídeos, tetranucleotídeo, pentanucleotídeos e hexanucleotídeos foram encontrados, respectivamente. O maior número de repetição encontrado foi 41 (Tabela 1) e o motivo mais frequente foi o do dinucleotídeo CT (4.040 repetições) (Figura 2). Entre os seis motivos de repetição dinucleotídica, o motivo CT demonstrou elevada dominância, seguido de GT. Os motivos (CT)_n e (GT)_n foram caracterizados anteriormente em *Apis mellifera* e *Bombus terrestris*, outras espécies de abelhas,

onde a repetição (CT)_n foi mais comum do que (GT)_n no genoma de ambas as espécies. Estes motivos são similares aos de (CT)_n e (GT)_n no genoma de mamíferos que resultou no conceito de conservação evolutiva para características quantitativa e qualitativa destes microssatélites em insetos (ESTOUP et al., 1993).

Tabela 1 Resumo da busca *in silico* por sequências simples repetidas em abelhas sem ferrão *M. subnitida*.

	Nucleotídeos				
	Di-	Tri-	Tetra-	Penta-	Hexa-
Número de motivos	5000	359	152	39	24
Comprimento (pb)	146.476	13.209	6.292	1.695	1.164
Comprimento médio (pb)	29,3	36,8	41,4	11,2	48,5
Intervalos de motivos repetidos	10 - 39	9 - 41	8 - 31	7 - 13	6 - 31
Densidade (pb/Mb)	2.172,66	195,93	93,33	25,14	17,27
Abundância Relativa (SSRs/Mb)	74,16	5,33	2,25	0,58	0,36
Porcentagem de cada repetição (%)	89,70	6,44	2,73	0,70	0,43

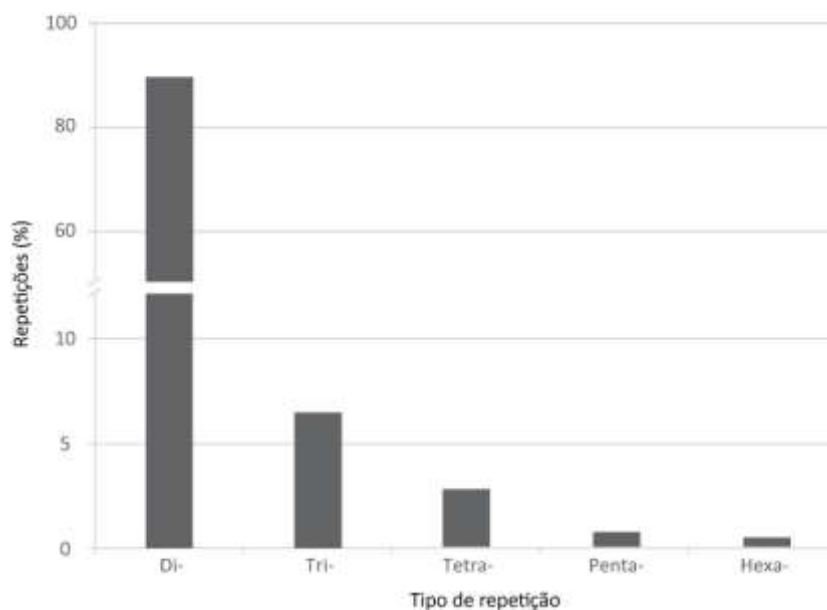


Figura 2 Proporção de diferentes tipos de motivos microssatélites.

Dos motivos trinucleotídeos, o motivo AAG foi predominante no genoma de *M. subnitida* seguido por dois motivos abundantes em ordem decrescente, AAT e AGC. Estes três tipos de motivos foram responsáveis por 79% de todos os motivos de trinucleotídeos. Dos 29

motivos tetranucleotídicos, o CTTT foi dominante, perfazendo 13,15% (20 vezes encontrado), seguido de AACG (16 com 10,52%). Há outros 26 tipos de motivo respondendo por 76,33%. Entre os motivos pentanucleotídeos, o mais abundante foi AAAAG 17,94% e 18 de outros motivos raramente foram encontrados em todas as sequências. Dos 18 motivos hexanucleotídeos, o motivo CCTCTT foi predominante e 17 outros motivos foram raramente encontrados em todas as sequências assim como em pentanucleotídeos.

Entre as características de um microssatélite, não só a frequência da repetição é importante como um marcador, mas também a variação no comprimento. Assim, foi considerado 20, 27, 32, 35 e 36 pares de bases (pb) como um comprimento mínimo para dinucleotídeo, trinucleotídeo, tetranucleotídeo, pentanucleotídeo e hexanucleotídeo, respectivamente (Figura 3). O comprimento dominante dos microssatélites em *M. subnitida*, foi 20 pb, respondendo por 14%, aproximadamente. O número dos motivos com comprimento maiores que 51 pb foi de 4%. De acordo com a literatura, longos comprimentos de repetição em microssatélites são de origem recente e apresentam um desvio para um aumento no comprimento de repetição (HARR; SCHLOTTERER, 2000; KATTI, RANJEKAR; GUPTA, 2001).

A relevância de sequências de microssatélites obtidas por meio da busca *in silico* é uma alta abundância dessas repetições encontrada em diferentes tipos de sequência. Além disso, através da exploração de buscas de microssatélites de todo o genoma é possível analisar vários aspectos relacionados às genômicas estruturais, funcionais e evolutivas (SHARMA; GROVER; KAHL, 2007).

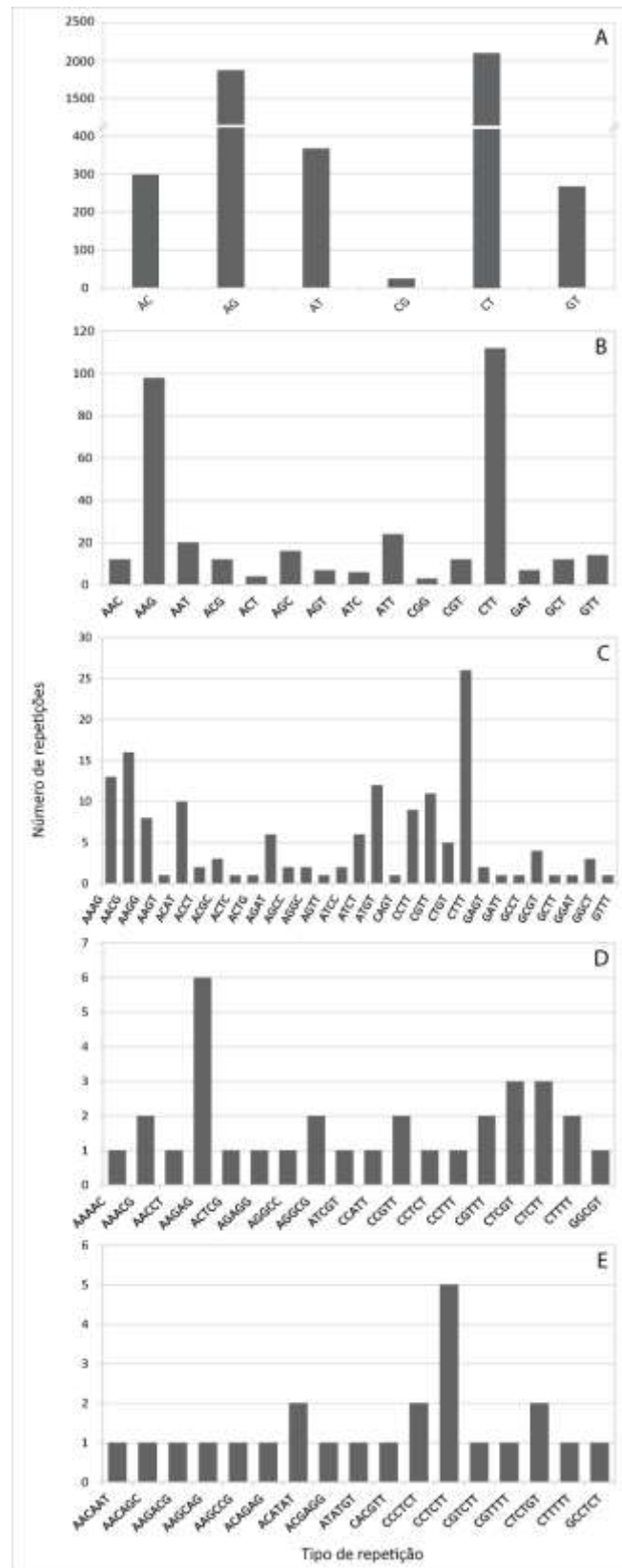


Figura 3 Distribuição da frequência de motivos repetidos (A) di-, (B) tri-, (C) tetra-, (D) penta, e (E) hexanucleotídeos no genoma da *M. subnitida*.

2.5 Conclusões

Este foi o primeiro estudo de busca de locos microssatélites para *M. subnitida*.

O programa MSATCOMMANDER foi eficiente na identificação de muitas sequencias simples repetidas.

Os microssatélites identificados poderão ser utilizados para a síntese de *primers* e uso em análises genéticas de distintas populações de abelhas.

2.5 Referências

- BRITTO, F.B.; DINIZ, F.M.; PATERSON, I.; BENTZEN, P. Polymorphic microsatellite DNA markers in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura: Ocypodidae). *Molecular Ecology Resources* (Print), v.9, p.1249-1252, 2009.
- DINIZ, F.M.; IYENGAR, A.; LIMA, P.S.C.; MACLEAN, N.; BENTZEN, P. Application of a double-enrichment procedure for microsatellite isolation and the use of tailed primers for high throughput genotyping. *Genetics and Molecular Biology*, v.30, p.380-384, 2007.
- ANDERSEN, J. C.; MILLS, N.J. iMSAT: a novel approach to the development of microsatellite loci using barcoded Illumina libraries. *BMC Genomics*, v.15, p.858, 2014
- ESTOUP, A.; SOLIGNAC, M.; HARRY, M.; CORNUET, J.M. Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Research*, v.21, p.1427-1431, 1993.
- FAIRCLOTH, B. Msatcommander: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Molecular Ecology Resources*, v.8, p.92-94, 2008.
- HARR, B.; C. SCHLÖTTERER. Long microsatellite alleles in *Drosophila melanogaster* have a downward mutation bias and short persistence times, which cause their genome-wide underrepresentation. *Genetics*, v.155, p.1213-1220, 2000.
- KARAOGLU, H.; LEE, C.M.Y.; MEYER, W. Survey of Simple Sequence Repeats in Completed Fungal Genomes. *Molecular Biology and Evolution*, v.22, p.639-649, 2005.
- KATTI, M.V.; RANJEKAR, P.K.; GUPTA, V.S. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Molecular Biology and Evolution*, v.18, p.1161-1167, 2001.
- LI, S.; QIAN, Z.; FU, Y.; ZHENG, W.; LI, H. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in the Tibetan cypress *Cupressus gigantea* using paired-end Illumina shotgun sequencing. *Conservation Genetics Resources*, v.6, p.795-797, 2014.
- LOPEZ, L.; BARREIRO, R.; FISCHER, M.; KOCH, M.A. Mining microsatellite markers from public expressed sequence tags databases for the study of threatened plants. *BMC Genomics*, v.16, p.781, 2015.
- MCBRIDE, M.C.; WILLIS, T.V.; BRADFORD, R.G.; BENTZEN, P. Genetic diversity and structure of two hybridizing anadromous fishes (*Alosa pseudoharengus*, *Alosa aestivalis*) across the northern portion of their ranges. *Conservation Genetics*, v.5, p.1281-1298, 2014.
- RICO, Y.; PAETKAU, D.; HARRIS, L.R.; SAYERS, J.; ETHIER, D.; KYLE, C. J. Development of nuclear microsatellite markers for American badger subspecies (*Taxidea taxus* spp.) using next generation sequencing. *Conservation Genetics Resources*, v.6, p.715-717, 2014.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001.

SHARMA, P.C.; GROVER, A.; KAHL, G. Mining microsatellites in eukaryotic genomes. *Trends in Biotechnology*, v.25, p.490-498, 2007.

SILVA, T.M.S.; CAMARA, C.A.; LINS, A.C.S.; BARBOSA, J.M.; SILVA, E.M.S.; FREITAS, B.M.; SANTOS, F.A.R. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.19, p.507–511, 2006.

WANG, Q.; LEI FANG, L.; CHEN, J.; HU, Y.; SI, Z.; WANG, S.; CHANG, L.; GUO, W.; ZHANG, T. Genome-Wide Mining, Characterization, and Development of Microsatellite Markers in *Gossypium* Species. *Scientific Reports*, v.5, p.10638, 2015.

CAPÍTULO 3

Isolamento e caracterização de locos de microssatélites em duas espécies de abelhas sem ferrão: *Melipona subnitida* e *Melipona fasciculata*

Artigos gerados a partir deste capítulo:

1. Isis G. B. Souza, Ian Paterson, Meghan C. McBride, Bruno A. Souza, Fabia M. Pereira, Maria T. R. Lopes, Paul Bentzen, Fabio M. Diniz. Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the stingless bee *Melipona subnitida* using next-generation sequencing. Conservation Genetics Resources, v.7, p.239-241, 2015. ISSN: 1877-7252. DOI: 10.1007/s12686-014-0347-9*
2. Geice Ribeiro da Silva, Isis Gomes de Brito Souza, Ian Paterson, Meghan McBride, Bruno de Almeida Souza, Fabia de Mello Pereira, Maria Teresa do Rego Lopes, Paul Bentzen, Fabio Mendonça Diniz. Microsatellite markers developed in the stingless bee *Melipona fasciculata* by next-generation sequencing and an exploratory analysis of its geographic genetic variation. Molecular Biology Reports, ISSN: 0301-4851. Submetido e aceito com ajustes. MOLE-D-15-01132. ***

* Estudo realizado em parceria com a Dalhousie University (Canadá), Department of Biology, Marine Gene Probe Laboratory.

** Os autores Geice Ribeiro da Silva e Isis Gomes de Brito Souza contribuíram igualmente neste artigo e por esta razão devem ser ambos considerados primeiros autores. Esta observação é feita no artigo que foi aceito com ajustes.

3.1 Resumo

Melipona subnitida e *Melipona fasciculata* são abelhas sem ferrão com grande importância ecológica como polinizadores da flora nativa e cultivada. São atualmente ameaçadas pela crescente destruição da vegetação nativa do semiárido e a avaliação da diversidade genética presente nessas populações de abelhas é um pré-requisito para o estabelecimento de práticas de manejo e conservação eficientes. Assim, foi descrito o isolamento e caracterização de locos de microssatélites para essas duas espécies de abelhas para uso na avaliação de variabilidade genética. Dezesete pares de *primers* microssatélites apresentaram polimorfismos e seis foram monomórficos para a espécie *Melipona subnitida*. Adicionalmente, análises de variabilidade genética foram realizadas em 56 indivíduos dessa abelha distribuídas em três populações. O número de alelos por loco variou entre 2 e 22 entre as populações, com média de 8,29. Valores para heterozigosidades esperadas e observadas variaram de 0,125 a 1,000 e 0,121 a 0,923, respectivamente. Já para a espécie *Melipona fasciculata* foram caracterizados 18 locos de microssatélites sendo um loco monomórfico. Análises de variabilidade genética foram realizadas em 50 indivíduos (duas populações). O número de alelos por loco variou entre 2 e 10 entre as populações, com média de 3,90. Heterozigosidade média observada e esperada foi estimada como sendo de 0,508 e 0,450, respectivamente. Estes são os primeiros marcadores microssatélites caracterizados para *Melipona subnitida* e *Melipona fasciculata* que demonstraram ser úteis para a obtenção de estimativas referente à diversidade genética a nível populacional.

Palavras - chave: diversidade genética, marcador molecular, meliponíneos

3.2 Introdução

As abelhas são agentes importantes no processo de polinização. Dentre esse importante grupo de insetos existem as abelhas brasileiras nativas, que possuem ferrão atrofiado (meliponíneos) e portanto consideradas espécies dóceis. *Melipona subnitida* Ducke é uma abelha endêmica da região semiárida do Nordeste do Brasil. A espécie tem grande importância ecológica como um polinizador da flora nativa e cultivada, assim como também outra abelha sem ferrão, a *Melipona* (*Melikerria*) *fasciculata* Smith, que pode ser encontrada nos Estados do Pará, Tocantins, Maranhão, Piauí e Mato Grosso. Além da importância ecológica, sua produção de mel e geoprópolis com potencial antioxidante (DUTRA et al., 2014) e efeito anti-inflamatório (LIBÉRIO et al., 2011) tem sido evidente.

As abelhas da espécie *Melipona subnitida* são atualmente ameaçadas pela crescente destruição da vegetação nativa do semiárido. Da mesma forma abelhas da espécie *Melipona fasciculata* vem sendo ameaçada. Em resposta, as populações de abelha sem ferrão estão em declínio, resultando em extinção local (SILVA et al., 2014).

A avaliação da diversidade genética presente em populações de abelhas é um pré-requisito para o estabelecimento de práticas de manejo e conservação eficientes. Apesar da existência de poucos estudos genéticos relacionados com meliponíneos, tem sido demonstrado que os marcadores moleculares, tais como, os marcadores microssatélites de DNA podem ser úteis para a análise de populações de abelhas nativas, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias de gestão destes importantes recursos genéticos. Até então existem microssatélites específicos desenvolvidos para o gênero *Melipona* em somente cinco espécies (*M. bicolor* – PETERS et al., 1998; *M. seminigra merrillae* – FRANCINI et al., 2009; *M. rufiventris* – LOPES et al., 2009; *M. interrupta manaosensis* – FRANCINI et al., 2010 e *M. mondury* – LOPES et al., 2010).

A abordagem da tecnologia de sequenciamento de nova geração para a descrição de marcadores microssatélites têm sido muito eficiente. O impacto desta abordagem é evidente: pesquisas genômicas parciais utilizando até mesmo frações da capacidade das máquinas de sequenciamento de nova geração permitem a descoberta de milhares de regiões microssatélites potencialmente amplificáveis que podem ser selecionados para o desenho de *primer*.

Esta é uma abordagem promissora para espécies com informação genômica limitada, como as abelhas *M. subnitida* e *M. fasciculata*. Os programas de melhoramento genético poderão se beneficiar enormemente a partir do uso de ferramentas genômicas, tais como marcadores moleculares microssatélites, pois os mesmos, ainda não estão disponíveis no

momento para estas espécies. Neste estudo tivemos como objetivo descrever marcadores moleculares microssatélites a partir do genoma eucariota das abelhas sem ferrão *M. subnitida* e *M. fasciculata* usando a tecnologia atual *Next-Generation Sequencing* (NGS).

3.3 Material e Métodos

Abelhas *M. subnitida* e *M. fasciculata* foram coletadas de colmeias originárias da região Nordeste do Brasil (Estado do Piauí). No Laboratório de Biologia molecular e Biotecnologia da Embrapa Meio-Norte (Teresina-PI-Brasil) o DNA genômico total foi extraído a partir do tórax de operárias adultas usando SDS, com o tecido digerido por meio de proteinase-K, e fenol - clorofórmio - álcool isoamílico (25: 24: 1; v: v: v) seguido por precipitação com etanol (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). As amostras de DNA extraídas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8% a fim de verificar a quantidade e a qualidade gerada do extraído. Um único indivíduo de cada espécie com o maior rendimento e qualidade de DNA foi selecionado para o sequenciamento.

As amostras foram levadas para o laboratório Marine Gene Probe do departamento de Biologia na Dalhousie University (Halifax-Canadá) onde o DNA foi quantificado utilizando um ensaio de Pico Green dsDNA (Thermo Fisher Scientific - Waltham, MA, EUA) utilizando o quantificador de DNA Perkin Elmer fusion (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts).

Uma biblioteca Illumina *paired-end* foi criada para cada espécie utilizando 1ng de DNA genômico, seguindo o protocolo padrão do Illumina Nextera DNA Sample Preparation Kit (Illumina Inc., San Diego, Califórnia). O sequenciamento de DNA foi realizado utilizando o MiSeq Benchtop Sequencer (Illumina Inc., San Diego, Califórnia). A biblioteca foi carregada com 16% do MiSeq Reagente Kit v2 com 300 ciclos de execução de sequenciamento.

As sequências contíguas (*contigs*) foram criadas a partir dos dados da sequência *paired-end* resultantes usando o programa CLC Genomics Workbench 7.0.4 (CLC bio, Aarhus, Dinamarca). Estes *contigs* foram posteriormente analisados usando software MSATCOMMANDER 0.8.2 (FAIRCLOTH, 2008) a fim de detectar os possíveis locos de microssatélites e conjuntos de *primers* para amplificação.

Para facilidade de imagem e de *scoring*, optou-se por examinar apenas os locos trinucleotídeos e tetranucleotídeo. Para a espécie *M. subnitida* 52 locos foram adequados para o desenho de *primers* e para a espécie *M. fasciculata* 37 locos. Os locos foram selecionados baseados em alguns critérios: inexistência de mononucleotídeos igual ou maior de que 6 repetições entre a região flanqueadora e a região a ser amplificada e possível formação de self-dimer, hetero-dimer e hairpin. Um iniciador de cada par foi encomendado com uma cauda de CAG para facilitar a marcação fluorescente dos produtos de PCR (HAUSWALDT; GLENN, 2003).

Os microssatélites foram amplificados individualmente em 5 μ L consistindo em 2,15 μ L de dd.H₂O, 0,5 μ L de tampão de reação 10 \times (Thermo Fisher Scientific Inc.), 2,5 mM de MgCl₂ (Fisher Scientific Inc. Thermo), 0,1 μ M de uma cauda CAG marcada por fluorescência, 0,1 μ M de *primer* sem a cauda CAG (*forward* ou *reverse*), 0,01 μ M de *primer* com cauda CAG marcada (*forward* ou *reverse*), 200 mM dNTPs (New England BioLabs Inc.), 0,25 unidades de Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific Inc.), e aproximadamente 15 ng de DNA genômico.

Quatro indivíduos de duas colmeias (N = 4) foram escolhidos para determinar a temperatura de anelamento ideal e detectar amplificação em cada microssatélite. Estes indivíduos foram amplificados utilizando as condições de termociclagem que consistiu de uma desnaturação inicial de 5 min a 95° C, seguido de 30 ciclos de 95° C durante 40 s, temperatura de anelamento específico de iniciadores de PCR usando gradiente de (50 a 65° C) durante 30 s, 72° C durante 40 s, e uma extensão final de 72° C durante 7 min. A eletroforese dos produtos de PCR foi realizada utilizando analisadores de DNA LI-COR 4200/4300 (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska). Para os marcadores que amplificaram, um conjunto de 56 indivíduos de três populações brasileiras de *M. subnitida* (Ceará - CE, Piauí - PI e Rio Grande do Norte - RN) e 50 indivíduos de duas populações de *M. fasciculata* (Maranhão - MA e Piauí - PI) foram submetidos para mais testes, a fim de obter estimativas de estatísticas básicas a nível populacional.

Genótipos individuais foram determinados por comparação direta com *ladder* de fragmentos de tamanho conhecido construídos de PCR utilizando DNA pUC19 que é um plasmídeo cortado com enzima de restrições com tamanho determinado. Os dados genotipados foram analisados utilizando Micro-checker 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004) para testar a presença de alelos nulos ou outras possíveis inconsistências de *scoring*. Os testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), Heterozigosidade esperada e observada e o índice de fixação Fst foram realizados utilizando Arlequin 3.5.1.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Os valores P - Bonferroni corrigidos foram usados para avaliar a significância ($p < 0,05$).

Um resumo da metodologia encontra-se no fluxograma a seguir (Figura 1)

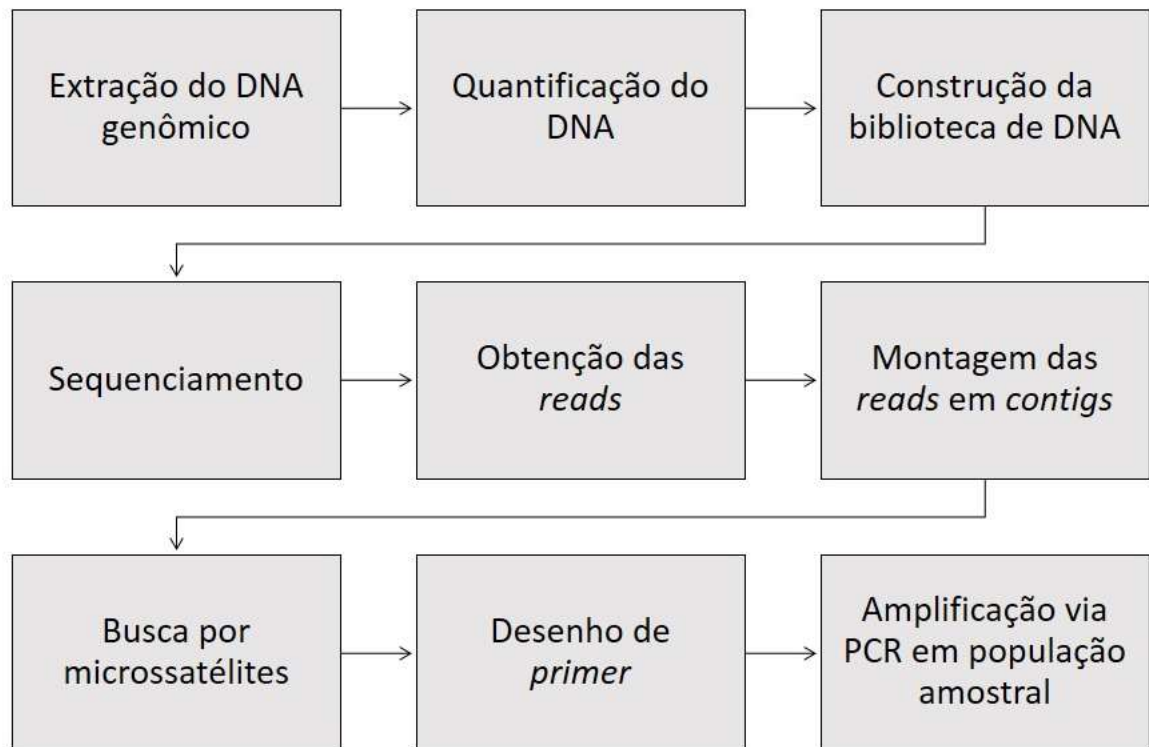


Figura 1 Metodologia para a busca e validação de microssatélites utilizando a tecnologia de sequenciamento de nova geração

3.4 Resultados e Discussão

Melipona subnitida

Foram produzidos 2.533.648 *reads*, os quais foram reunidos em 141.412 *contigs*. A maioria dos microssatélites identificados foi de repetições dinucleotídicas (5.998), sendo o CT os motivos mais comuns.

Dos 52 marcadores testados, 17 foram identificados como polimórficos com números que variam entre dois (Msub48) e 22 (Msub41) alelos, média de 8,29, com tamanhos estimados entre 134 e 232 pares de base (Tabela 1). Seis marcadores foram identificados como monomórficos e outros marcadores exibiram padrão alélico não claro e/ou produtos não específicos. Silva (2012), encontrou valor menor em relação a média de alelos por loco (4,1 alelos), num estudo pioneiro na espécie *M. subnitida* utilizando 10 microssatélites heterólogos descritos inicialmente para outras duas espécies de abelhas (9 para *Melipona bicolor* e um para *Scaptotrigona postica*) testados em 59 indivíduos. Isso demonstra que apesar de ser uma alternativa para estudos populacionais genéticos, podem ocorrer erros durante a amplificação o que prejudica ou mascara a quantidade de alelos presente.

Lopes et al. (2010) na descrição de locos de microssatélites para a *M. mondury* encontraram uma variação de alelos menor que a nossa de 1 a 6 alelos. Francini et al. (2010) também obtiveram uma baixa variação de alelos, de 2 a 5 quando descreveram microssatélites para a abelha *M. interrupta*.

As heterozigosidades esperada e observada variaram de 0,125 a 1,000 e 0,121 a 0,923, respectivamente (Tabela 2). As médias das heterozigosidades observada (0,652) foram semelhante e a heterozigosidades esperada (0,635) foi superior a encontrada por Silva (2012). Evidência de alelos nulos não foi detectada usando o programa Micro-checker. Um desvio de HWE foi detectado para loco Msub41 (p -valor ajustado $<0,0029$), o que poderia ser um artefato causado pelo tamanho limitado da amostra em cada população ou uma consequência de endogamia e amostragem irregular das populações (LESSIOS, 1992).

O índice de fixação F_{st} no valor de 0,083 indica uma moderada estruturação genética o que pode ser justificado pelo baixo fluxo de alelos entre as populações. No entanto, não podemos deixar de levar em consideração a quantidade de amostra utilizada nesse estudo de validação de *primers*.

Tabela 1 Características dos 23 locos de microssatélites descritos para *M. subnitida*, incluindo sequência do *primer*, tipo de motivo, temperatura de anelamento (Ta), número de alelos observados (Na), tamanho do alelo, número de indivíduos (N) e número de acesso GenBank.

Loco	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Tipo de motivo	Ta (°C)	Na	Tamanho (bp)	N	Nº do acesso GenBank
Msub02	F: GCCCAAAGATGGTATGCCG R: ACGAGGCGGATTCAACGAG	(ACG) ₁₄	60	6	146-173	56	KM494946
Msub03	F: CTCGGCGCACAAATTCGAG R: GGTTATTCGCCGCAAGC	(CGTT) ₁₁	60	6	171-191	56	KM494947
Msub04	F: AAACCTGGTTCAGGTGCC R: CAGGGCGGGTTCAATACC	(CTT) ₁₅	60	7	146-173	56	KM494948
Msub07	F: ACACCAACCCTAATGCTCATCGC R: CTCGCTTGTAAGCTGCC	(ACTG) ₁₃	60	4	160-180	56	KM494949
Msub08	F: GGAAGAAGTCTCTCGAGTAAAG R: TATCTCTGGCAGGTTCCGCC	(AAG) ₁₄	60	7	146-185	56	KM494950
Msub09	F: TGGTCTTCTTTATGGCAGCG R: GCATCCGACAAGTTGGCTC	(CTT) ₁₇	60	8	155-188	56	KM494951
Msub11	F: TCTCGGCATACCTAAC R: GCTGACTCGGAACAATGGC	(CTT) ₁₃	60	3	175-181	56	KM494952
Msub18	F: TCCCGATTTCCACCGATCC R: GCCGACCTCTTCGACGG	(ACG) ₁₈	62	17	154-232	56	KM494953
Msub26	F: CAACACCTCCTGCTTTATCGT R: CACTCACTTTGTTTCCCTTT	(ATGT) ₁₂	60	8	171-203	56	KM494954
Msub30	F: CCTGTTATTTGCTCCTCGAAAT R: AACTCAAGGTTTCCCCGAAC	(CCTT) ₁₂	60	5	142-170	56	KM494955
Msub31	F: TTACCGTCTGTGCTACTGATCC R: TGTCTGTCTGTCTGTCTATCTTTCTG	(AGAT) ₁₄	60	12	162-210	56	KM494956
Msub37	F: AAATGCAGGCAGAAATGG R: TTGGACGAAAGTCAAATGC	(ACGC) ₁₄	60	17	150-226	56	KM494957
Msub38	F: AATACTCTGTTTCTTCCAGGGG R: CTGAAATTGCTTTCCGTGCC	(AAAG) ₁₅	60	7	134-184	56	KM494958
Msub41	F: ATCTCCTTCCCTTGCACTCACTC R: GTGGACAGAGGTTGGAAAAGAC	(ACTC) ₁₅ (TC) ₁₁	60	22	146-218	56	KM494959
Msub46	F: CACTGTTTCTCCAGTTGCTGTC R: GTTTCGTTCCGCGTGATTTC	(AAAG) ₁₂	60	6	118-146	56	KM494960
Msub48	F: AAAGAGCGTAGGACTTCCACAG R: CATCCATCTATCCGTACATCCA	(GGAT) ₁₀	60	2	181-185	56	KM494961
Msub51	F: GGCGTTACAAAGGGGAGAA R: AGTTGACAGCGTTTCTACCTC	(AGAA) ₉	62	4	147-159	56	KM494962
Msub01	F: GGGCGTGGACTAAGTAGC R: GTGAGGAGAAACGTCGCAG	(CTT) ₁₁	60	1	161	56	KM494963
Msub20	F: GCAGAGTTGACAGCGTTTCC R: TGTATAAGAGACAGGCTCGGC	(CTTT) ₉	60	1	100	56	KM494964
Msub32	F: AAAACTCGAAGAAAACGAGGG R: GCTTGTCGTAAGGCACCG	(AACG) ₁₄	60	1	158	56	KM494965
Msub35	F: GGCTTAGATACAGATCGGGTGT R: GGGTGGGGTGATGGG	(ACGC) ₁₆	60	1	134	56	KM494966
Msub49	F: AAACACCGTTCGAGAGCCAT R: CTGACAAGCAAAGAAGCAAAGA	(CCTT) ₁₃	60	1	120	56	KM494967
Msub52	F: ATCAGGCATCAGACACAATCC R: ACTACTGAAATATGGCGTCGTG	(CCTT) ₉	60	1	110	56	KM494968

Tabela 2 Variabilidade de 17 locos de microssatélites e estimativas de diversidade genética em *M. subnitida*.

Loco	Ceará (n = 21)			Piauí (n = 15)			Rio Grande do Norte (n = 20)			F _{ST}
	H _o	H _e	P _{HWE}	H _o	H _e	P _{HWE}	H _o	H _e	P _{HWE}	
Msub02	0,563	0,688	0,022	0,909	0,558	0,025	0,789	0,679	0,500	0,144
Msub03	0,882	0,804	0,940	0,467	0,370	0,527	0,947	0,721	0,034	0,156
Msub04	0,722	0,717	0,855	0,643	0,627	0,074	0,727	0,675	0,051	0,037
Msub07	0,316	0,474	0,144	0,667	0,515	0,414	0,600	0,483	0,562	-0,009
Msub08	0,611	0,675	0,355	0,933	0,828	0,004	0,474	0,568	0,292	0,100
Msub09	0,800	0,650	0,040	0,500	0,632	0,063	0,600	0,687	0,295	0,104
Msub11	0,750	0,578	0,460	0,600	0,683	0,010	0,650	0,606	0,030	0,060
Msub18	1,000	0,863	0,052	1,000	0,869	0,003	0,867	0,862	0,060	0,069
Msub26	1,000	0,656	0,006	0,571	0,794	0,001	0,842	0,819	0,000	0,089
Msub30	0,611	0,570	1,000	0,667	0,653	0,005	0,450	0,383	1,000	0,063
Msub31	0,947	0,868	0,021	0,929	0,828	0,050	0,889	0,852	0,003	0,040
Msub37	0,842	0,898	0,035	0,769	0,886	0,002	0,750	0,798	0,098	0,096
Msub38	0,789	0,757	0,190	0,786	0,767	0,036	0,471	0,526	0,092	0,142
Msub41	0,842	0,923	0,001*	0,643	0,810	0,000*	0,737	0,865	0,000*	0,094
Msub46	0,368	0,367	0,457	0,333	0,287	1,000	0,625	0,597	0,455	0,083
Msub48	0,143	0,136	1,000	0,200	0,480	0,034	0,200	0,185	1,000	0,142
Msub51	0,125	0,121	1,000	0,308	0,280	1,000	0,417	0,467	0,117	0,069
Média	0,665	0,632	-	0,643	0,639	-	0,649	0,634	-	0,083

*Loco que se desviou significativamente de HWE após a correção de Bonferroni (p -valor ajustado $<0,0029$). H_o, heterozigiosidade observada; H_e, heterozigiosidade esperada; P_{HWE}, probabilidades de equilíbrio de Hardy-Weinberg; n, número de indivíduos.

Melipona fasciculata

Foram produzidos 2.669.884 *reads*, os quais foram reunidos em 47.081 *contigs* em CLC Workbench. A maioria dos microssatélites identificados foi de repetições dinucleotídicas (3.225).

Dos 37 marcadores testados, 17 foram identificados como polimórficos e um como monomórfico. No entanto, alguns revelaram um padrão de ligação monomórfico a uma análise ao nível da população (Mfsc24 e Mfsc30 no Piauí e Mfsc3, Mfsc7, Mfsc13, Mfsc31 e Mfsc32 no Maranhão) (Tabela 3). A genotipagem de todo o conjunto de dados revelou 70 alelos, que varia de 2, para os locos Mfsc3, Mfsc7, Mfsc10, Mfsc13, Mfsc14, Mfsc22, Mfsc31, Mfsc32 e Mfsc34, a 10, para o loco de Mfsc 17, com uma média de 3,9 alelos por loco.

Em geral a heterozigiosidade média observada e esperada foi estimada como sendo de 0,508 e 0,450, respectivamente. Estas estimativas foram superiores quando comparados com a maioria das heterozigiosidades encontradas para espécies do gênero *Melipona*, exceção feita para *M. subnitida* (SOUZA et al., 2015). A análise do Micro-checker de todo o conjunto de dados revelou alelos nulos para os locos Msfc3 e Msfc11, com frequências inferiores a 0,2 (Tabela 4). Frequências alélicas nulas abaixo de 0,2 são aceitáveis na maioria dos conjuntos de dados de microssatélites (DAKIN; AVISE, 2004). Quando o conjunto de dados foi dividida em

2 populações (Piauí e Maranhão) somente o loco Mfsc3 indicou a presença de valores nulos, o que pode ser uma possível causa de seu desvio da HWE na população Piauí, mesmo após a correção de Bonferroni para comparações múltiplas ao nível de significância de 5% (valor crítico para $p > 0,0031$). Nenhum loco mostrou significativo desequilíbrio de ligação após a correção de Bonferroni.

O índice de fixação F_{st} no valor de 0,194 indica uma moderada estruturação genética. Mais estruturada que a população amostral da *M. subnitida* analisadas nesse estudo, o que também pode ser justificado pelo baixo fluxo de alelos entre as populações.

Tabela 3 Características de 18 marcadores microssatélite descritos para *M. fasciculata*, incluindo sequência do primer, tipo de motivo, temperatura de anelamento (Ta), número de alelos observados (Na), tamanho do alelo, número de indivíduos (N) e número de acesso GenBank

Loco	Sequência dos primers (5'-3')	Tipo de motivo	Ta (°C)	Na	Tamanho (pb)	N	Nº do acesso GenBank
Mfsc3	F: GAGCGAGAGGGAGCAAGATA R: TAGTAACGTAATTCTGCGCGAT	(AGAT) ₁₄	50	2	090-094	50	KT730150
Mfsc7	F: TCTACCCATCTCTGTTCTCTCC R: TCGCAGTTTCGTTGATTTTG	(ATCT) ₁₀	50	2	232-236	50	KT730151
Mfsc10	F: AGTAGAACGATTTTCGAGAAC R: ACGAAGCCGTATGCTAA	(CTTT) ₁₀	43	2	148-160	50	KT730152
Mfsc11	F: GGAAGGACGAGAGAATTCAAGA R: ATAGTCGTTTGTCGCGAGTGTA	(CTTT) ₁₀	50	5	170-186	50	KT730153
Mfsc13	F: GCAGTAACGGTAGCAGTGGTG R: ACTCCTTCTCCTTCTCGGTCT	(ACG) ₁₆	52	2	189-207	50	KT730154
Mfsc14	F: AGTTGCAGCGTTTGTGAAATC R: GTGGGTTTCGAGATGTGTATAAG	(AGT) ₁₇	47-57	2	116-122	50	KT730155
Mfsc17	F: ATTTTCTCAGTAAGCGAGTCCG R: CGACCTTGTTTCGTATAATAGCA	(ATT) ₁₇	50	10	142-187	50	KT730156
Mfsc22	F: GTGACAATAATAGGAGGAAATCG R: GAAGCTGGTACAGGTATCGGAG	(GAT) ₁₄	58-48	2	231-234	50	KT730157
Mfsc23	F: ATTCGGCATCGGCGTTAT R: TTAGAGAAAGTTGTTGGACCCG	(CGT) ₁₄	48	3	243-261	50	KT730158
Mfsc24	F: GTAGAGGAGTAGTAACAGCAA R: CGAGTCCCGTTAGC	(AGC) ₁₄	48	4	165-189	50	KT730159
Mfsc27	F: CGTCTCCACCGTCTTCTATTTC R: GCGTGTCTCTCTTCTCTCTC	(AGC) ₁₃	50	6	205-227	50	KT730160
Mfsc28	F: ATGATTCTCGCTTTCGTCTGT R: GTGAGGAGACGCTGGATTTC	(AGC) ₁₃	52-62	5	160-184	50	KT730161
Mfsc30	F: TCTATAAGCGCCAGAGAGGAAG R: TTTCAGGGATGCGCC	(ACG) ₁₂	50	3	186-192	50	KT730162
Mfsc31	F: TGTGGTTCGCGGTTGC R: TCGCCGCTCGGAACT	(AAG) ₁₂	50	2	260-263	50	KT730163
Mfsc32	F: GTTATCGTTATCGTCATCGTCGT R: CCGTGAGCGAACTCGAAC	(CGT) ₁₂	47-57	2	105-108	50	KT730164
Mfsc34	F: AACTTTGAGGACGCACGAG R: CACTTCTTGTTCTGACTTGGTTG	(ACGA) ₁₂	53	1	109	50	KT730165
Mfsc36	F: CGCCTACACCTAGAACCAAAA R: ACGTACACCGATGGCGTT	(AAAG) ₁₃	55	9	097-109	50	KT730166
Mfsc37	F: GAAGGAAGGAAAGAGGCCG R: CCATTGCTACCCGTACCTCC	(AAAG) ₁₀	55	8	103-119	50	KT730167

Tabela 4 Variabilidade de 17 locos de microssatélites e estimativas de diversidade genética em *M. fasciculata*.

Loco	Piauí (n = 25)			Maranhão (n = 25)			F _{ST}
	H _O	H _E	pHWE	H _O	H _E	pHWE	
Mfsc3	0,000	0,423	0,000*	0,000	0,000	Mono	0,321
Mfsc7	0,522	0,394	0,267	0,000	0,000	Mono	0,189
Mfsc10	0,500	0,384	0,272	0,720	0,470	0,008	0,016
Mfsc11	0,381	0,316	1,000	0,280	0,409	0,012	0,601
Mfsc13	0,625	0,439	0,055	0,000	0,000	Mono	0,309
Mfsc14	0,357	0,516	0,318	0,391	0,507	0,404	-0,038
Mfsc17	0,611	0,571	0,038	0,826	0,642	0,056	0,003
Mfsc22	1,000	0,512	0,000*	1,000	0,510	0,000*	0,000
Mfsc23	0,762	0,547	0,056	0,957	0,510	0,000*	0,161
Mfsc24	0,000	0,000	Mono	0,680	0,528	0,276	0,253
Mfsc27	1,000	0,532	0,000*	0,960	0,731	0,014	0,290
Mfsc28	0,375	0,315	1,000	0,960	0,626	0,000*	0,182
Mfsc30	0,000	0,000	Mono	0,292	0,324	0,033	0,125
Mfsc31	0,188	0,272	0,305	0,000	0,000	Mono	0,164
Mfsc32	0,773	0,538	0,000*	0,000	0,000	Mono	0,400
Mfsc36	1,000	0,613	0,000*	1,000	0,817	0,000*	0,051
Mfsc37	0,727	0,474	0,017	1,000	0,783	0,000*	0,082
Média	0,519	0,403	-	0,533	0,403	-	0,194

*Loco que se desviou significativamente de HWE após a correção de Bonferroni (p -valor ajustado $<0,0029$). H_O, heterozigiosidade observada; H_E, heterozigiosidade esperada; P_{HWE}, probabilidades de equilíbrio de Hardy-Weinberg; n, número de indivíduos

3.5 Conclusões

Foram descritos locos de microssatélites informativos para duas espécies de abelhas sem ferrão.

Os primeiros locos de microssatélites aqui desenvolvidos para *Melipona subnitida* e *Melipona fasciculata* serão utilizados para análises genéticas de populações distintas na região de ocorrência do Brasil, e para revelar como a degradação ambiental afeta estas espécies ameaçadas.

Alternativamente, os locos podem também ser usados em outras espécies relacionadas como *primers* heterólogos.

3.6 Referências

- DAKIN, E.E.; AVISE, J.C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, v.93, p.504–509, 2004.
- DUTRA, R.P.; ABREU, B.V.B.; CUNHA, M.S.; BATISTA, M.C.A.; TORRES, L.M.B.; NASCIMENTO, F.R.F.; RIBEIRO, M.N.S.; GUERRA, R.N.M. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.62, p.2549-2557, 2014.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite v3.5: a new series of programs to perform population genetic analysis under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, v.10, p.564-567, 2010.
- FAIRCLOTH, B. Msatcommander: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Molecular Ecology Resources*, v.8, p.92-94, 2008.
- FRANCINI, I.B.; SFORÇA, D.A.; SOUSA, A.C.B.; CAMPOS, T.; CIDADE, F.W.; ZUCCHI, M.I.; SOUZA, A.P.; NUNES-SILVA, C.G.; CARVALHO-ZILSE, G.A. Microsatellite loci for an endemic stingless bee *Melipona seminigra merrillae* (Apidae, Meliponini) from Amazon. *Conservation Genetics Resources*, v.1, p.487-490, 2009.
- FRANCINI, I.B.; SOUSA, A.C.B.; SFORÇA, D.A.; COSTA-PINTO, M.F.F.; CAMPOS, T.; NUNES-SILVA, C.G.; ZUCCHI, M.I.; SOUZA, A.P.; CARVALHO-ZILSE, G.A. Isolation and characterization of microsatellite loci in the stingless bee *Melipona interrupta manaosensis* (Apidae: Meliponini). *Conservation Genetics Resources*, v.2, p.27-30, 2010.
- HAUSWALDT, J.S.; GLENN, T.C. Microsatellite DNA loci from Diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*). *Molecular Ecology Notes*, v.3, p.174-176, 2003.
- LESSIOS, H.A. Testing electrophoretic data for agreement with Hardy–Weinberg expectations. *Marine Biology*, v.112, p.517-523, 1992.
- LIBÉRIO, S.A.; PEREIRA, A.L.A.; DUTRA, R.P.; REIS, A.S.; ARAÚJO, M.J.A.M.; MATTAR, N.S.; SILVA, L.A.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F.; GUERRA, R.N.M.; MONTEIRO-NETO, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. v.11, p.108, 2011.
- LOPES, D.M.; SILVA, F.O.D.; SALOMAO, T.M.F.; CAMPOS, L.A.D.O.; TAVARES, M.G. Microsatellite loci for the stingless bee *Melipona rufiventris* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Ecology Resource*, v.9, p.923-925, 2009.
- LOPES, D.M.; DA SILVA, F.O.; FERNANDES-SALOMÃO, T.M.; DE OLIVEIRA CAMPOS, L.A.; TAVARES, M.G. A scientific note on the characterization of microsatellite loci for (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* (Celle), v.41, p.138-140, 2010.

PETERS, J.M.; QUELLER, D.C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; STRASSMANN, J.E.;
Microsatellite loci for stingless bees. *Molecular Ecology*, v.7, p.783–792, 1998.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SILVA, G.R. Caracterização genética de populações da abelha sem ferrão *Melipona subnitida* Ducke, 1910 no nordeste do Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), 2012. 114f. Universidade Federal do Piauí, Teresina.

SILVA, G.R.; SOUZA, B.A.; PEREIRA, F.M.; LOPES, M. T. R. ; VALENTE, S. E. ; DINIZ, F. M New molecular evidence for fragmentation between two distant populations of the threatened stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Journal of Hymenoptera Research*, v.38, p.1-9, 2014.

SOUZA, I.G.B.; PATERSON, I.; MCBRIDE, M.C.; SOUZA, B.A.; PEREIRA, F.M.; LOPES, M.T.R.; PAUL BENTZEN, DINIZ. F.M. Isolation and characterization of 23 microsatellite *loci* in the stingless bee *Melipona subnitida* using next-generation sequencing. *Conservation Genetics Resources*, v.7, p.239-241, 2015.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, v.4, p.535-538, 2004.

CAPÍTULO 4

Estrutura genética e consequências do desmatamento na zona de ocorrência de *Melipona subnitida*: uma abelha comercial e ecologicamente importante no Nordeste do Brasil

Artigo: “Genetic structure and deforestation consequences occurrence zone in *Melipona subnitida*: a commercial and ecologically important bee in the Northeast of Brazil”. Isis Gomes de Brito Souza, Geice Ribeiro da Silva, Bruno de Almeida Souza, Fabia de Mello Pereira, Maria Teresa do Rego Lopes, Paul Bentzen, Fabio Mendonça Diniz a ser submetido.*

* Os autores Geice Ribeiro da Silva e Isis Gomes de Brito Souza contribuíram igualmente neste artigo e por esta razão devem ser ambos considerados primeiros autores.

4.1 Resumo

Na investigação da variabilidade genética da jandaíra é importante o uso de ferramentas moleculares polimórficas e mais específicas, como microssatélites de DNA isolados exclusivamente para a espécie. Assim, objetivamos usar pioneiramente microssatélites específicos em populações de abelhas sem ferrão *M. subnitida* oriundas de meliponários. Abelhas operárias adultas da espécie *Melipona subnitida* (N=288) foram coletadas em seis áreas da distribuição da espécie no Nordeste brasileiro: Estado do Rio Grande do Norte (municípios de Mossoró - MO e São Paulo do Potengi - SPP), Estado do Ceará (Granja - GR e Apuiarés - AP) e Estado da Paraíba (João Pessoa - JP e Várzea -VA). O DNA genômico das amostras foi amplificado utilizando 11 iniciadores microssatélites descritos especificamente para *M. subnitida*. A frequência de alelos, número de alelos por loco, heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o), avaliação de conteúdo de informação polimórfica (PIC) dentre outras análises de diversidade genética foram aplicadas na espécie. A genotipagem de todos os dados revelou 174 alelos, variando de 6 para o loco Msub11 a 38 para o loco Msub18. Em geral a média da heterozigosidade esperada (H_e) e heterozogicidade observada (H_o) nas seis populações de *M. subnitida* foram 0,796 e 0,740, respectivamente. O valor de AR variou de 4,8 (Msub11) a 22,7 (Msub18), com média de 10,9, enquanto que o valor de PIC variou de 0,539 (Msub7) a 0,942 (Msub37) com média de 0,771 (Tabela 3). No geral os onze marcadores apresentaram-se altamente polimórficos demonstrando serem muito informativos. Os valores de F_{st} (0,101), R_{st} (0,042) e D_{est} (0,377) estimados para a *M. subnitida* sugerem a existência de moderada estruturação genética. Entre as seis populações de abelhas observamos que as populações de João Pessoa (PB) e de Granja (CE) são as mais distantes geneticamente (0,662). Em compensação as populações da cidade de Granja (CE) e Apuiarés (CE) são as mais próximas (0,180). Geneticamente as populações de *M. subnitida* se reuniram em dois grupos ($k=2$). Concluimos que as populações de abelha *M. subnitida* apresentam uma moderada estruturação genética.

Palavras – chave: abelha sem ferrão, diversidade genética, microssatélites,

4.2 Introdução

A espécie *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae), conhecida popularmente como jandaíra, é um meliponíneo típico do sertão brasileiro. Ocorre naturalmente em áreas secas e introduzidas em áreas mais úmidas de outras regiões. Abelha antes encontrada em toda a região Nordeste, ela apresenta-se hoje bem menos frequente e com populações desequilibradas. É considerada espécie rara nos Estados do Maranhão e Piauí, apesar de vários levantamentos já realizados em diferentes ecossistemas dos estados.

Importante por seu papel natural de polinização, principalmente na vegetação nativa, e tendo como principais produtos de interesse comercial pelo produtor o seu mel e os enxames (CÁMARA et al., 2004), é uma das espécies mais indicadas para a criação racional com fins lucrativos. No entanto, o extrativismo predatório e o desmatamento têm levado à redução no número de colônias silvestres dessa espécie (CRUZ et al., 2004). Em resposta a essa pressão, populações de abelhas sem ferrão vem sofrendo declínio gradual, resultando em sua extinção local. Desta forma, a determinação da diversidade genética presente nessas populações é um pré-requisito para o estabelecimento de programas de manejo e conservação eficientes.

O uso da variabilidade genética existente, oriunda de populações naturais ou introduzidas, está vinculado ao estudo da extensão desta variabilidade na população disponível utilizando-se marcadores moleculares tais como microssatélites de DNA - SSR (*Short Sequence Repeats*). Acredita-se que as populações de jandaíra apresentam alta estruturação genética, pois a baixa capacidade migratória dessas abelhas pode reduzir o tamanho efetivo da população, limitando o fluxo gênico. Em estudos anteriores utilizando a técnica ISSR e microssatélites transferidos, as populações de *M. subnitida* se mostraram estruturadas com baixa diversidade genética (SILVA, 2012; SILVA et al., 2014).

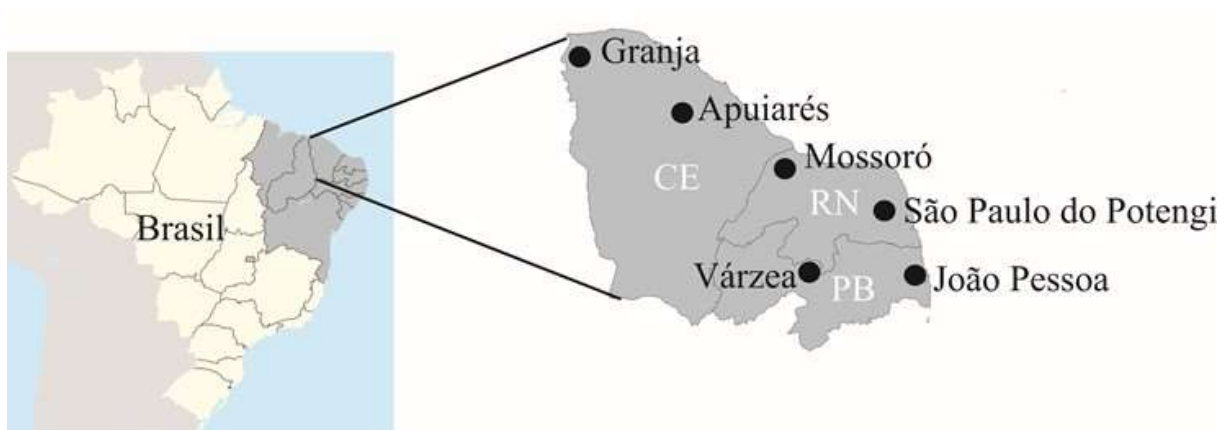
Na investigação da variabilidade genética da jandaíra é importante o uso de ferramentas moleculares polimórficas e mais específicas, como microssatélites de DNA isolados exclusivamente para a espécie. Assim, objetivamos usar pioneiramente microssatélites específicos em populações de abelhas sem ferrão *M. subnitida* oriundas de meliponários.

4.3 Material e Métodos

O estudo foi desenvolvido no laboratório de Biologia molecular e Biotecnologia na Embrapa Meio-Norte (Teresina-PI). Abelhas operárias adultas da espécie *Melipona subnitida* (N=288) foram coletadas em seis áreas da distribuição da espécie no Nordeste brasileiro: Estado do Rio Grande do Norte (municípios de Mossoró - MO e São Paulo do Potengi - SPP), Estado do Ceará (Granja - GR e Apuiarés - AP) e Estado da Paraíba (João Pessoa - JP e Várzea - VA). Sendo uma localidade por município. Foram amostradas 10 colônias, aproximadamente cinco abelhas por colônia, por local.

Tabela 1 Abreviatura, Município - Estado, Número de colônias e total de indivíduos de *Melipona subnitida* (N) em cada município amostrado.

Abreviatura	Município - Estado	N de colônias	N total de indivíduos
SPP	São Paulo do Potengi - RN	10	50
MO	Mossoró - RN	10	46
AP	Apuiarés - CE	10	50
GR	Granja - CE	10	46
VA	Várzea - PB	10	50
JP	João Pessoa - PB	10	46



Fonte: free SVG maps: <https://www.amcharts.com/svg-maps/>

Figura 1 Mapa de coletas das abelhas

As amostras foram fornecidas por meliponicultores que mantem colônias em suas propriedades e foram armazenado em etanol absoluto à temperatura ambiente até a extração do DNA.

O DNA genômico total foi extraído a partir do tórax dos indivíduos conforme recomendações do Kit Ultra Clean® Tissue & Cells DNA Isolation, MOBIO laboratories, Inc. As amostras de DNA extraídas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8% a fim de verificar a quantidade e a qualidade gerada do extraído.

O DNA genômico foi amplificado utilizando 11 iniciadores microssatélites descritos especificamente para *M. subnitida* (SOUZA et al., 2015) (Tabela 2) utilizando o termociclador modelo *Veriti® 96-well thermalcycler* (Applied Biosystems Inc.). Os locos foram amplificados individualmente em 5 µL consistindo em 2,15 µL de dd.H₂O, 0,5 µL de tampão de reação 10× (Thermo Fisher Scientific Inc.), 2,5 mM de MgCl₂ (Fisher Scientific Inc. Thermo), 0,1 µM de cada *primer forward* e *reverse*, 200 mM dNTPs (New England BioLabs Inc.), 0,25 unidades de Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific Inc.), e aproximadamente 15 ng de DNA genômico.

A condição de termociclagem consistiu de uma desnaturação inicial de 5 min a 95° C, seguido de 30 ciclos de 95° C durante 40 s, temperatura de anelamento específica dos iniciadores de PCR durante 30 s, 72° C durante 40 s, e uma extensão final de 72° C durante 7 min. Os produtos das reações de PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida desnaturante a 6% corado com nitrato de prata. Genótipos individuais foram determinados por comparação direta com *ladder* de 10 pares de base (Invitrogen).

Análises

Os testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foram realizados utilizando o programa Arlequin 3.5.1.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). A fim de verificar os resultados erroneamente significativos, a correção de Bonferroni (RICE, 1989) foi realizada, por meio do programa Mac Bonferroni.

A frequência de alelos, número de alelos por loco, heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho) e avaliação de conteúdo de informação polimórfica (PIC) foram estimados pelo programa CERVUS v.3.0.3 com nível global de significância de 0,05 (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007). O índice de fixação F_{st} (WEIR; COCKERHAM, 1984) foi calculado no programa Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). A riqueza alélica (AR) foi avaliada usando o programa v.2.9.3 FSTAT (GOULDET,

2009) e a presença de alelos privados foi estimada pelo programa GENAIEx v.6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

Para avaliar o nível de variação genética entre as populações foi realizado o teste exato de diferenciação populacional e calculadas as estimativas *pair-wise* de F_{st} (modelo IAM) (WEIR; COCKERHAM, 1984) no programa Arlequin. O R_{st} (modelo SSM) e D_{est} (JOST, 2008) foram estimados empregando o programa GENEALEX v.6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012) com 999 permutações.

Para inferir relações entre as população de *M. subnitida*, a matriz de distância de Nei (1987) foi gerada pelo programa GENAIEx v.6.5. e utilizada para a construção do dendrograma que adota por aglomeração o algoritmo *Neighbour-Joining* fornecida pelo programa PAST v.1.9.0 com 1.000 permutações (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

O programa STRUCTURE v.2.3.2 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) foi usado para gerar análise de agrupamento Bayesiano, com o modelo de mistura, implementado pelo algoritmo baseado nos métodos de cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) para avaliar os níveis de correlação entre as populações e a ocorrência de fluxo gênico entre elas. O modelo testado usou 5×10^5 etapas *burn-in period* com 1×10^6 repetições MCMC com cinco replicações de execução para cada K. Os valores simulados de K variaram de um a dez. Para estimar o valor de K que melhor se ajusta aos dados foi empregado o Δk de Evanno et al. (2005), usando o aplicativo da web HAVESTER STRUCTURE v.0.6.1 (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>). O programa CLUMMP v.1.1.2 (JAKOBSSON; ROSENBERG, 2007) foi usado a fim de calcular a média das cinco replicas do melhor K. Em frente a esse resultado o programa DISTRUCT v.1.1 (NOAH, 2004) foi empregado de forma a fornecer um gráfico em barras que ilustre de forma mais clara o arranjo entre os genótipos.

A fim de testar as variações pelo isolamento geográfico, foi gerado a correlação entre as distância genéticas e geográficas calculada pelo Teste Mantel no programa Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010).

4.4 Resultados e Discussão

A genotipagem de todos os dados revelou 174 alelos, variando de 6 para o loco Msub11 a 38 para o loco Msub18 (Tabela 2). Valores bem superior aos encontrados por Silva (2012) estudando cinco populações de abelhas *M. subnitida* oriundas de colônias silvestres por meio de microssatélites heterólogos, 76 alelos. Nogueira et al. (2014) usando quatro microssatélites descritos especificamente para a espécie de abelha sem ferrão *M. capixaba* também encontraram valores menores variando de 2 a 10, média de 4,75 alelos por loco. Esse estudo também demonstrou um excesso de homocigotos o que pode ser atribuído ao pequeno tamanho amostral das populações da *M. capixaba* (N=88). Já no estudo de genética populacional de *M. scutellaris* realizado por Viana (2013) do Estado da Bahia foi encontrada uma ampla quantidade de alelos (20 a 38 alelos).

Tabela 2 Características dos onze locos de microssatélite utilizados nas análises de *M. subnitida*

Loco	Seqüência dos <i>primers</i> (5'-3')	Tipo de repetição	Na	Nº do acesso GenBank
Msub31	F: TTACCGTCTGTGCTACTGATCC R: TGTCTGTCTGTCTGTCTATCTTTCTG	(AGAT) ₁₄	12	KM494956
Msub7	F: ACACCAACCCTAATGCTCATCGC R: CTCGCTTGTAAGCTGCCC	(ACTG) ₁₃	8	KM494949
Msub3	F: CTCGGCGCACAATTTCGAG R: GGTTATTTTCGCCGCAAGC	(CGTT) ₁₁	10	KM494947
Msub9	F: TGGTCTTCTTTATGGCAGCG R: GCATCCGACAAGTTGGCTC	(CTT) ₁₇	16	KM494951
Msub11	F: TCTCGCGCATAACCTAAC R: GCTGACTCGGAACAATGGC	(CTT) ₁₃	6	KM494952
Msub30	F: CCTGTTATTTGCTCCTCGAAAT R: AACTCAAGGTTTCCCCGAAC	(CCTT) ₁₂	9	KM494955
Msub38	F: AATACTCTGTTTCTTCCAGGGG R: CTGAAATTGCTTTCGTGCC	(AAAG) ₁₅	14	KM494958
Msub8	F: GGAAGAAGTCTCTCGAGTAAAG R: TATCTCTGGCAGGTTTCGCC	(AAG) ₁₄	11	KM494950
Msub4	F: AAAGTTGGTTCAGGTGCCC R: CAGGGCGGGTTCAATACC	(CTT) ₁₅	17	KM494948
Msub18	F: TCCCGATTTCCACCGATCC R: GCCGACCTCTTCGACGG	(ACG) ₁₈	38	KM494953
Msub37	F: AAATGCAGGCAGAAATGG R: TTGGACGAAAGTCAAATGC	(ACGC) ₁₄	33	KM494957

Em geral a média da heterozigosidade esperada (H_e) e heterozigosidade observada (H_o) nas seis populações de *M. subnitida* foram 0,796 e 0,740, respectivamente (Tabela 3). A média de alelos por população foi 15,8. Silva (2012) verificou valores menores em comparação ao nosso estudo ($H_e=0,488$; $H_o=0,604$). No entanto, apresentou um excesso de indivíduos heterozigotos, contrário as populações aqui amostradas a qual a heterozigosidade observada foi sutilmente menor que a esperada demonstrando um *deficit* de heterozigotos. Tavares et al. (2013) usando marcadores específicos para *M. scutellaris* também encontrou valores menores para os dois parâmetros ($H_e=0,500$; $H_o=0,470$).

O nível de polimorfismo de cada loco foi avaliado pela Riqueza alélica (AR) que é o número de alelos segregando em determinada população e pelo conteúdo de informação polimórfica (PIC) um indicador de qualidade do marcador em estudos genéticos. O valor de AR variou de 4,8 (M_{sub11}) a 22,7 (M_{sub18}), com média de 10,9, enquanto que o valor de PIC variou de 0,539 (M_{sub7}) a 0,942 (M_{sub37}) com média de 0,771 (Tabela 3). No geral os onze marcadores apresentaram-se altamente polimórficos demonstrando serem muito informativos. No estudo de Silva (2012), o autor encontrou o valor do AR de 4,92 e PIC de 0,406, portanto, locos menos informativos, como esperado, para estudos envolvendo *primer* de amplificação heteróloga. Já Francini (2009) analisando nove microssatélites, numa população amostral de 44 indivíduos, descritos para a espécie *M. seminigra merrillae* encontraram locos informativos (PIC=0,50), mesmo usando poucos indivíduos.

Os onze locos de microssatélite demonstraram ser altamente significativos para desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p<0,05$) (Tabela 3). Os valores médios de H_e , PIC e A variaram de 0,702, 0,644 e 6,1 (população de João Pessoa - PB) a 0,754, 0,712 e 9 (População de Apuiarés - CE), respectivamente (Tabela 4).

Considerando as população individuais, o Fis foi negativo para a maioria dos locos, indicando uma tendência ao excesso de heterozigotos, com exceção para as populações de Mossoró – RN e Apuiarés – CE (Tabela 4).

Os valores de F_{st} (0,101), R_{st} (0,042) e D_{est} (0,377) estimados para a *M. subnitida* sugerem a existência de moderada estruturação genética (Tabela 3). Silva (2012) observou valor de $F_{st}= 0,14$ para cinco populações dos estados do Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte. Portanto, populações estas mais estruturadas que as populações de nosso estudo, mesmo com a proximidade geográfica com exceção da amostras do Piauí. Uma justificativa pra isso é o desmatamento de regiões vizinhas o que pode isolar as populações levando a uma estruturação.

Tabela 3 Estimativas de parâmetros genéticos de microssatélite em seis populações de *M. subnitida*

Todos os indivíduos (N=288)											
Loco	pHWE										
	AR	Ho	He	PIC	Padrão	Défice	Excesso	Nulo	Fst	Rst	Dest
Msub31	10,9	0,795	0,878	0,864	0,000	0,000*	1,000	0,050	0,127	0,026	0,527
Msub7	5,8	0,544	0,600	0,559	0,000	0,043	0,957	0,047	0,082	0,000	0,115
Msub3	7,5	0,621	0,801	0,773	0,000	0,000*	1,000	0,126	0,124	0,010	0,357
Msub9	11,3	0,833	0,832	0,812	0,000	0,082	0,919	-0,003	0,059	0,060	0,244
Msub11	4,8	0,688	0,721	0,670	0,000	0,248	0,752	0,022	0,098	0,022	0,216
Msub30	6,0	0,553	0,573	0,539	0,000	0,094	0,906	0,006	0,054	-0,005	0,071
Msub38	11,3	0,964	0,865	0,848	0,000	0,998	0,002*	-0,058	0,109	0,067	0,434
Msub8	6,6	0,934	0,749	0,712	0,000	1,000	0,000*	-0,134	0,101	0,054	0,236
Msub4	11,2	0,747	0,843	0,823	0,000	0,000*	1,000	0,056	0,109	0,035	0,396
Msub18	22,7	0,765	0,942	0,937	0,000	0,000*	1,000	0,104	0,133	0,095	0,785
Msub37	21,9	0,661	0,947	0,942	0,000	0,000*	1,000	0,177	0,116	0,098	0,766
Média	10,9	0,740	0,796	0,771				0,035	0,101	0,042	0,377

Tabela 4 Estimativas de parâmetros genéticos por loco microssatélite para as populações do Ceará de *M. subnitida* (continua)

Loco	Granja - CE (n=50)							Apuiarés - CE (n=46)						
	A	Ho	He	PIC	Fis	pHWE	Nulo	A	Ho	He	PIC	Fis	pHWE	Nulo
Msub31	7	0,659	0,727	0,686	0,001	0,0476	0,020	8	0,826	0,827	0,794	0,095	0,0899	-0,003
Msub7	5	0,500	0,539	0,492	-0,053	0,3128	0,011	6	0,551	0,523	0,461	0,073	0,0315	-0,025
Msub3	6	0,486	0,747	0,698	0,231	0,0049*	0,043	6	0,565	0,733	0,679	0,353	0,0002*	0,129
Msub9	10	0,907	0,836	0,805	-0,065	0,0000*	0,010	10	0,894	0,840	0,810	-0,085	0,0010*	-0,038
Msub11	5	0,821	0,680	0,623	0,034	0,0098*	0,021	4	0,689	0,713	0,651	-0,211	0,7422	0,006
Msub30	6	0,756	0,734	0,683	-0,101	0,8105	0,042	4	0,609	0,554	0,502	-0,031	0,0008*	-0,072
Msub38	8	1,000	0,807	0,768	-0,228	0,0157	0,043	8	0,978	0,798	0,762	-0,243	0,0007*	-0,116
Msub8	5	1,000	0,650	0,582	-0,327	0,0000*	0,092	8	0,979	0,740	0,691	-0,550	0,0000*	-0,160
Msub4	9	0,658	0,796	0,753	0,158	0,0043*	0,010	10	0,638	0,756	0,716	0,175	0,0014*	0,084
Msub18	8	0,633	0,733	0,692	0,106	0,0000*	0,064	14	0,796	0,889	0,869	0,138	0,0496	0,050
Msub37	9	0,531	0,843	0,808	0,073	0,0000*	0,032	21	0,851	0,917	0,902	0,373	0,0000*	0,030
Média	7,1	0,723	0,736	0,690	-0,016		0,035	9	0,761	0,754	0,712	0,008		-0,010

Tabela 4 Estimativas de parâmetros genéticos por loco microssatélite para as populações de Rio Grande do Norte de *M. subnitida* (continua)

Loco	São Paulo do Potengi - RN (n=50)							Mossoró - RN (n=46)						
	A	Ho	He	PIC	Fis	pHWE	Nulo	A	Ho	He	PIC	Fis	pHWE	Nulo
Msub31	9	0,851	0,802	0,767	0,039	0,0480	-0,043	6	0,761	0,799	0,763	-0,233	0,0020*	0,022
Msub7	5	0,653	0,707	0,660	0,069	0,0000*	0,044	3	0,391	0,494	0,436	-0,208	0,0312*	0,091
Msub3	7	0,854	0,750	0,716	0,229	0,0000*	-0,109	6	0,561	0,727	0,668	-0,075	0,0007*	0,125
Msub9	7	0,972	0,728	0,674	0,122	0,0000*	-0,167	8	1,000	0,787	0,753	0,337	0,0000*	-0,147
Msub11	4	0,813	0,619	0,533	0,331	0,0000*	-0,153	3	0,486	0,583	0,507	-0,190	0,0143*	0,076
Msub30	5	0,348	0,370	0,339	-0,256	0,4805	0,042	6	0,659	0,657	0,617	0,374	0,0189*	-0,047
Msub38	10	0,925	0,862	0,836	-0,427	0,0020*	-0,046	8	0,927	0,841	0,811	-0,321	0,0000*	-0,057
Msub8	6	0,894	0,693	0,639	-0,266	0,0000*	-0,154	4	0,977	0,569	0,465	-0,167	0,0000*	-0,282
Msub4	9	0,804	0,780	0,741	-0,038	0,0000*	-0,027	8	0,800	0,789	0,750	-0,095	0,0000*	-0,007
Msub18	12	0,780	0,859	0,833	-0,046	0,0000*	0,053	12	0,619	0,865	0,839	-0,093	0,0000*	0,170
Msub37	9	0,645	0,785	0,745	0,106	0,0000*	0,107	12	0,476	0,883	0,860	0,181	0,0000*	0,294
Média	7,5	0,776	0,723	0,680	-0,012		-0,041	6,9	0,696	0,727	0,679	-0,044		0,022

Tabela 4 Estimativas de parâmetros genéticos por loco microssatélite para as populações de Paraíba de *M. subnitida* (termina)

Loco	Várzea - PB (n=50)							João Pessoa - PB (n=46)						
	A	Ho	He	PIC	Fis	pHWE	Nulo	A	Ho	He	PIC	Fis	pHWE	Nulo
Msub31	9	0,783	0,814	0,784	-0,062	0,0881	0,013	5	0,881	0,716	0,664	0,048	0,1186	-0,114
Msub7	3	0,458	0,492	0,435	0,077	0,1488	0,055	3	0,711	0,590	0,494	0,210	0,0612	-0,100
Msub3	4	0,475	0,614	0,562	-0,140	0,0195	0,099	7	0,775	0,722	0,670	0,231	0,6610	-0,049
Msub9	9	0,705	0,801	0,772	-0,341	0,0000*	0,055	6	0,486	0,730	0,681	-0,274	0,0000*	0,197
Msub11	4	0,413	0,615	0,531	-0,317	0,0010*	0,195	5	0,900	0,758	0,704	0,170	0,0000*	-0,095
Msub30	4	0,698	0,557	0,506	0,059	0,3013	-0,141	3	0,273	0,434	0,354	-0,003	0,0027*	0,242
Msub38	5	0,979	0,689	0,629	-0,074	0,0000*	-0,203	4	0,976	0,742	0,684	-0,103	0,0000*	-0,146
Msub8	5	1,000	0,792	0,749	-0,293	0,0000*	-0,124	3	0,761	0,653	0,570	-0,732	0,0000*	-0,088
Msub4	8	0,708	0,683	0,640	-0,031	0,0303	-0,024	7	0,867	0,792	0,753	-0,014	0,0000*	-0,056
Msub18	13	0,884	0,846	0,818	0,093	0,0000*	-0,031	13	0,842	0,772	0,734	0,286	0,0000*	-0,058
Msub37	13	0,744	0,830	0,800	0,181	0,0000*	0,041	11	0,667	0,812	0,776	0,464	0,0000*	0,070
Média	7	0,713	0,703	0,657	-0,077		-0,006	6,1	0,740	0,702	0,644	0,026		-0,018

Segundo Wright (1978), valores de F_{st} no intervalo entre 0 e 0,05 é considerado baixo, entre 0,05 e 0,15 é considerado moderado, entre 0,15 e 0,25 alto e acima de 0,25 muito alto. A estruturação detectada aqui, corrobora com o efeito Wahlund, de redução da heterozigosidade, uma vez que ao estimar de forma geral o equilíbrio de Hardy-Weinberg, considerando o *deficit* de heterozigotos, maior parte dos locos apresentaram p-valor significativo ($p < 0,05$). Segundo (LESSIOS, 1992), vários fatores contribuem para esse efeito, destacando-se a barreira geográfica, pois com o baixo fluxo genético, a frequência de alguns alelos tendem a se alterar. Estruturação genética encontrada em muitas espécies de abelhas sem ferrão vem sendo comprovada por valores altos do índice de fixação F_{st} , $F_{st} = 0,492$ para *M. yucatanica* (MAY-ITZÁ, 2009); $F_{st} = 0,14$ para *M. subnitida* (SILVA, 2012); $F_{st} = 0,22$ para *M. scutellaris* (TAVARES, 2013).

Do total de 174 alelos observados em geral, nas populações, considerando alelos raros todos aqueles com frequência abaixo de 0,05 (RAPOSO et al., 2007), 35 foram detectados (Tabela 5) se destacando a localidade Apuiarés do Estado do Ceará com 10 alelos raros. A presença de alelos raros pode ser explicada pela fixação de alguns alelos nas populações, em detrimento da oscilação e baixa frequência de outros, podendo causar possível perda, fenômeno esse denominado de deriva genética. Provavelmente a população de Apuiarés possa estar sofrendo uma recente perturbação na sua dinâmica populacional. De acordo com dados do Ministério do Meio Ambiente (MMA) o Estado do Ceará é o segundo estado que mais vem perdendo o Bioma caatinga, devido sobretudo ao consumo de lenha nativa, explorada de forma ilegal e insustentável, ao sobrepastoreio e a conversão para pastagens e agricultura. A cidade de Apuiarés pode está incluída nessas áreas em devastação.

Tabela 5 Número de alelos raros encontrados nas populações de *M. subnitida*

População	Número de alelos raros (<0,05)
Apuiarés (CE)	10
Granja (CE)	6
Várzea (PB)	5
João Pessoa (PB)	6
São Paulo do Potengi (RN)	4
Mossoró (RN)	4

Ao analisar a matriz de distância genética de Nei (Tabela 6) entre as seis populações de abelhas observamos que as populações de João Pessoa (PB) e de Granja (CE) são as mais distantes geneticamente (0,662). Em compensação as populações da cidade de Granja (CE) e Apuiarés (CE) são as mais próximas (0,180). Ao fazer a correlação com a distância geográfica,

foi possível observar um valor positivo de 0,58, com o gráfico de dispersão ilustrado na figura 5. Provavelmente isso dá indício de que o isolamento geográfico provocado pela distância tenha alguma influência no processo, uma vez que o curto voo de dispersão, característico da espécie, possa ter um papel preponderante no fluxo genético entre populações vizinhas.

Tabela 6 Matriz de distância de Nei

	Apuiarés (CE)	Granja (CE)	Várzea (PB)	João Pessoa (PB)	São Paulo do Potengi (RN)
Granja (CE)	0,180	0,000			
Várzea (PB)	0,444	0,601	0,000		
João Pessoa (PB)	0,521	0,662	0,264	0,000	
São Paulo do Potengi (RN)	0,342	0,446	0,447	0,432	0,000
Mossoró (RN)	0,221	0,285	0,387	0,529	0,307

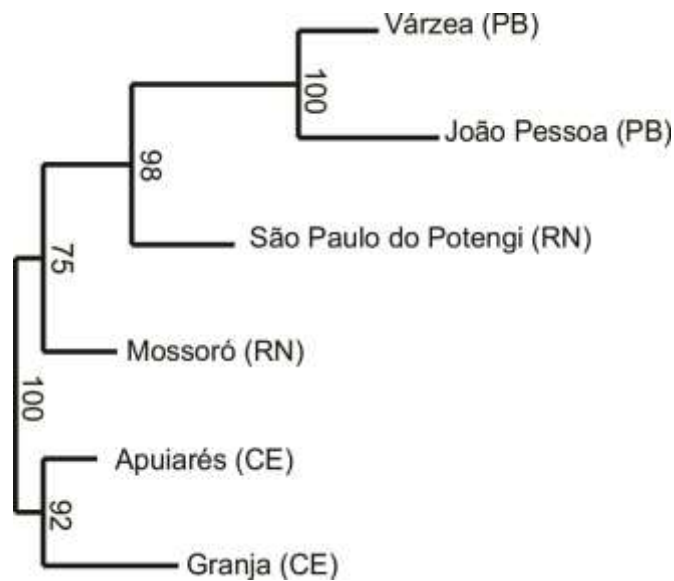


Figura 2 Dendrograma baseado na matriz de diversidade genética de Nei

Ao analisar o método de agrupamento bayesiano empregando os dados de microssatélite no programa STRUCTURE, geneticamente as populações de *M. subnitida* se reuniram em dois grupos ($k=2$) (Figura 3 e Figura 4). Um foi formado pelas populações do Estado do Ceará e Rio Grande do Norte (*cluster* azul escuro) e o outro formado pelas duas populações do Estado da Paraíba (*cluster* azul claro). Os resultados corroboram com a ilustração do dendrograma usando a distância genética de Nei empregando o método de agrupamento *Neighbor-Joining*.

Provavelmente a semelhança genética observadas das localidades de cada estado possa estar ligada ao comércio de colmeias entre os meliponicultores das cidades amostradas aqui, uma vez, que antes, as populações da espécie só se concentravam em uma pequena faixa do semiárido nordestino. Hoje com o comércio de colmeias (meliponicultura), a espécie está distribuída de forma mais ampla, algumas vezes por *hobby*. O fator impulsionante é a facilidade de criação, além da possibilidade de agregação de renda ao pequeno criador (SILVA et al., 2014; CAMARA et al., 2004). Outra possibilidade pode estar relacionada à ancestralidade comum, pois mesmo que o isolamento geográfico provoque o distanciamento genético entre as populações, uma ampla quantidade de alelos em comum podem se manter nas populações.

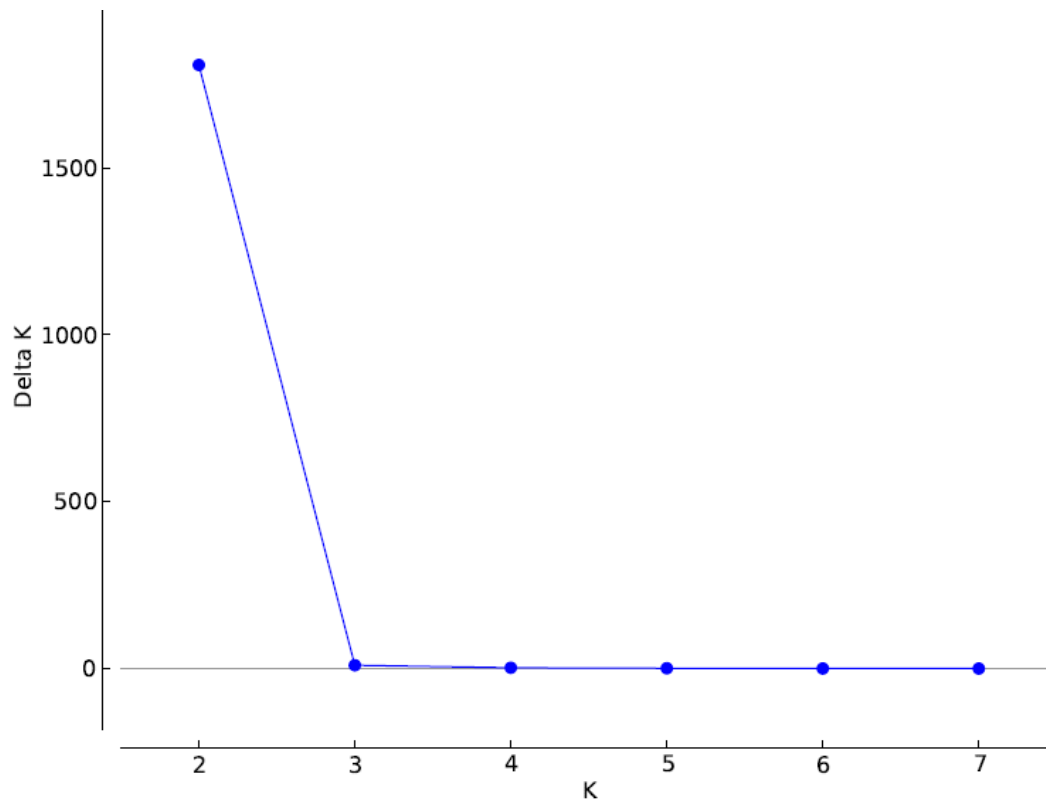


Figura 3 Valor de delta K igual a dois cluster, obtido a partir da análise no programa STRUTURE, com aplicação do modelo de Evanno et al. (2005), em seis populações de *M. subnitida*.

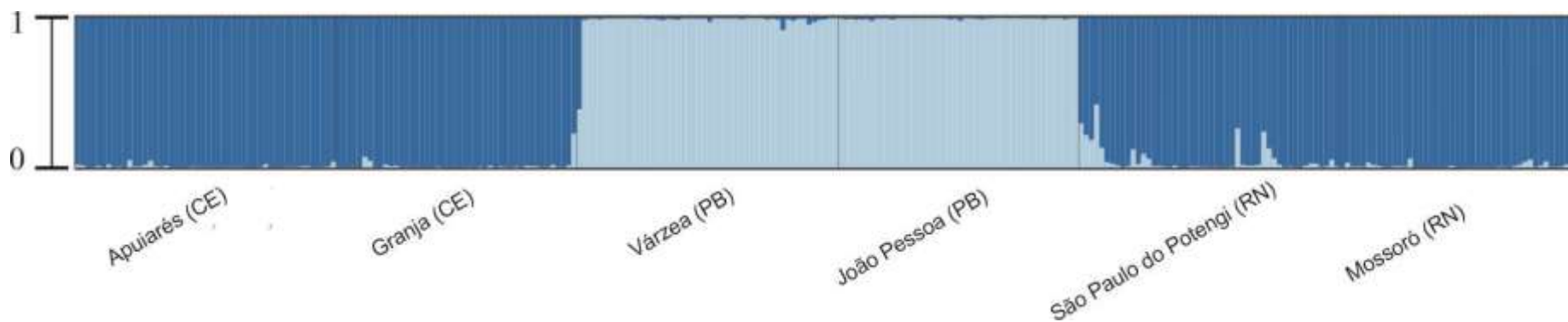


Figura 4 Estrutura genética inferida usando uma análise Bayesiana no programa STRUCTURE, as linhas verticais indicam os indivíduos e as cores mostram as frequências alélicas.

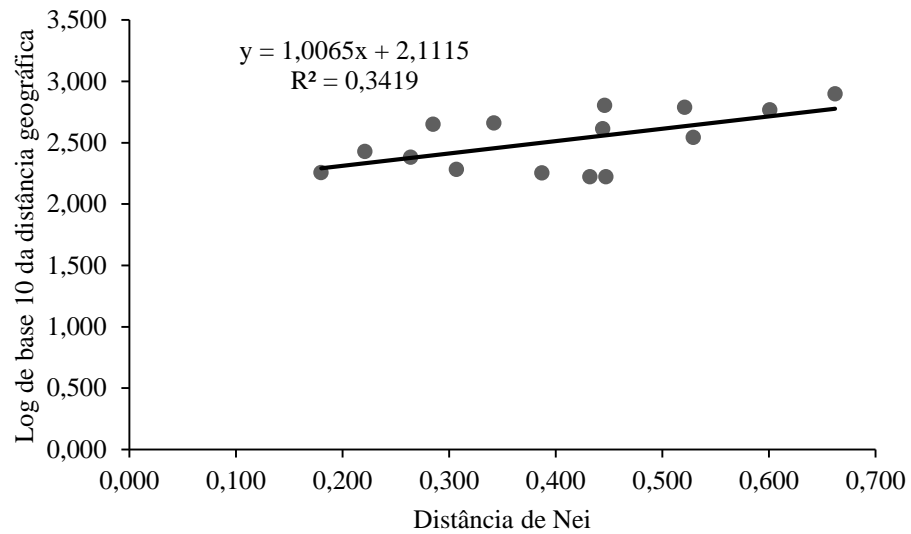


Figura 5 Correlação entre as distâncias geográficas e as distâncias genéticas de Nei

Para efeitos de conservação, a população de Mossoró do Estado do Rio Grande do Norte deve ser priorizada visto apresentar a mais baixa variabilidade genética em comparação com as outras cinco populações. Em relação a estratégias de melhoramento genético, visando obter heterose, sugere-se troca de colmeias entre as populações de João Pessoa (PB) e Granja (CE) pois são as populações mais distantes geneticamente.

4.5 Conclusões

Os onze *primers* específicos de microssatélites foram eficientes em estimar a variabilidade genética nas populações amostradas de *M. subnitida*.

As populações de João Pessoa (PB) e de Granja (CE) são as mais distantes geneticamente (0,662).

As populações da cidade de Granja (CE) e Apuiarés (CE) são as mais próximas (0,180).

Geneticamente as populações de *M. subnitida* se reuniram em dois grupos.

As populações apresentam uma moderada estruturação genética.

4.6 Referências

CÂMARA, J.Q.; SOUSA, A.H.S.; VASCONCELOS, W.E.; FREITAS, R.S.; MAIA, P.H.S.; ALMEIDA, J.C.; MARACAJÁ, P.B. Estudos de meliponíneos com ênfase a *Melipona subnitida* D. no município de Jandaíra, RN. *Revista de biologia e ciências da terra*, v.4, n.1, 2004.

CRUZ, D.O.; FREITAS, B.M.; SILVA, L.A.; SILVA, E.M.S.; BOMFIM, I.G.A. Adaptação e comportamento de pastejo da abelha Jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) em ambiente protegido. *Acta Sci. Animal Science*, v. 26, n.3, p.293-298, 2004.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, v.14, p.2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite v3.5: a new series of programs to perform population genetic analysis under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, v.10, p.564-567, 2010.

FRANCINI, I.B.; SFORÇA, D.A.; SOUSA, A.C.B.; CAMPOS, T.; CIDADE, F.W.; ZUCCHI, M.I.; SOUZA, A.P.; NUNES-SILVA, C.G.; CARVALHO-ZILSE, G.A. Microsatellite loci for an endemic stingless bee *Melipona seminigra merrillae* (Apidae, Meliponini) from Amazon. *Conservation Genetics Resources*, v.1, p.487-490, 2009.

GOULDET, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Update de Goudet (2009). Systems <http://www.unilch/izea/software/fstat.html>, 2009.

HAMMER, O., HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis, *Paleontologia Electronica*, v.4, p.1–9, 2001.

JAKOBSSON, M. ;ROSENBERG, N.A. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, v.23, p.1801–1806, 2007.

JOST, L. GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, v.17, p.4015–4026, 2008.

KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, v.16, p.1099-1106, 2007.

LESSIOS, H.A. Testing electrophoretic data for agreement with Hardy–Weinberg expectations. *Marine Biology*, v.112, p.517-523, 1992.

MAY-ITZÁ, W.J.; QUEZADA-EUÁN, J.J.G.; DE LA RÚA, P. Intraspecific variation in the stingless bee *Melipona beecheii* assessed with PCR-RFLP of the ITS1 ribosomal DNA. *Apidologie*, v.40, p.549–555, 2009.

NOAH, A.R. Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes*, v.4, p.137–138, 2004.

NOGUEIRA, J.; RAMOS, J.C.; BENEVENUTO, J.; FERNANDES-SALOMÃO, T.M.; RESENDE, H.C.; CAMPOS, L.A.O.; TAVARES, M.G. Conservation study of an endangered stingless bee (*Melipona capixaba* - Hymenoptera: Apidae) with restricted distribution in Brazil. *Journal of Insect Conservation*, v.18, p.317–326, 2014.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, v.28, p.2537-2539, 2012.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v.155, p.945-959, 2000.

RAPOSO, A.; MARTINS, K.; CIAMPI, A. Y.; WADT, L. H. O.; VEASEY, E. A. Diversidade genética de populações de *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba) no Baixo Acre. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* (Online), v. 42, p. 1291-1298, 2007.

RICE, W.R. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, v.43, p.223-225, 1989.

SILVA, G.R. Caracterização genética de populações da abelha sem ferrão *Melipona subnitida* Ducke, 1910 no nordeste do Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), 2012. 114f. Universidade Federal do Piauí, Teresina.

SILVA, G.R.; SOUZA, B.A.; PEREIRA, F.M.; LOPES, M.T.R.; VALENTE, S. E.; DINIZ, F.M. New molecular evidence for fragmentation between two distant populations of the threatened stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Journal of Hymenoptera Research*, v.38, p.1-9, 2014.

SOUZA, I.G.B.; PATERSON, I.; MCBRIDE, M.C.; SOUZA, B.A.; PEREIRA, F.M.; LOPES, M.T.R.; PAUL BENTZEN, DINIZ, F.M. Isolation and characterization of 23 microsatellite *loci* in the stingless bee *Melipona subnitida* using next-generation sequencing. *Conservation Genetics Resources*, v.7, p.239-241, 2015.

TAVARES, M.G.; ALMEIDA, B.S.; PASSAMANI, P.Z.; PAIVA, S.R.; RESENDE, H.C.; CAMPOS, L.A.O.; ALVES, R.M.O.; WALDSCHMIDT, A.M. Genetic variability and population structure in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae) from Bahia, Brazil, based on molecular markers. *Apidologie* (Celle), v.44, p.720–728, 2013.

WEIR, B.S., COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, v.38, p.1358–1370, 1984.

WRIGHT, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations*, Vol. 4. University of Chicago Press, Chicago.

CAPÍTULO 5

Organização e caracterização parcial do mitogenoma da abelha sem ferrão *Melipona subnitida* Ducke (Apidae: Meliponinae)

* Estudo realizado em parceria com as seguintes instituições:

(1) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Laboratório Multidisciplinar para Análise de Dados e (2) Dalhousie University (Canadá), Department of Biology, Marine Gene Probe Laboratory.

Artigo “A first glimpse at the mitogenome of the stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (Apidae: Meliponinae)”, Isis G. B. Souza, Bruno A. Souza, Fabia M. Pereira, Maria T. R. Lopes, Paul Bentzen, Francisco Prosdocimi, Fábio M. Diniz. A ser submetido.

5.1 Resumo

Estudos filogenéticos são importantes por permitir uma melhor compreensão das relações evolutivas e dos fatores que levam a diversificação de uma espécie. O conhecimento da taxonomia do gênero *Melipona* é crucial para o monitoramento das populações de *Melipona* introduzidas e uma parte constante da fauna atual em muitas áreas naturais. Estudos que visam elucidar as relações evolutivas dentro do gênero *Melipona* são necessários para ampliar o conhecimento do gênero e para contribuir na compreensão das suas relações de parentesco. Assim, objetivamos sequenciar, montar e caracterizar o genoma mitocondrial da abelha sem ferrão *M. subnitida*. Um conjunto de dados do genoma parcial foi produzido para abelha *M. subnitida* usando um sequenciador Illumina MiSeq. O genoma mitocondrial (mitogenoma) foi quase completamente montado por abordagens *in silico* usando corridas iterativas de software MIRA e MITObim. O mitogenoma parcial contém 12.740 pares de bases de comprimento. Os genes encontrados conservam a estrutura esperada na maioria dos invertebrados. Estrutura do genoma, a ordem dos genes e orientação foi semelhante às mitocôndrias descritas anteriormente para as abelhas *Melipona*. Dados descritos aqui contêm relatório da terceira mitocôndria parcial para a subfamília Meliponinae e pode ajudar ainda mais a genética de populações e estudos de filogenia no clado Apidae.

Palavras - chave: filogenia, genoma mitocondrial, sequenciamento de nova geração.

5.2 Introdução

Abelhas da tribo Meliponini, ou meliponíneos, também conhecidas como abelhas sem ferrão (por possuir ferrão atrofiado), destacam-se dentre os mais abundantes e principais insetos na manutenção da biodiversidade dos ecossistemas. Pertencem à família Apidae e subfamília Apinae e são representadas por vários gêneros e centenas de espécies em todas as regiões tropicais do mundo, bem como na região Neotropical, onde foram descritas muitas espécies (CAMARGO; PEDRO, 2008), tais como *Melipona quadrifasciata*, *Melipona rufiventris* e *Melipona subnitida*.

Neste grupo é possível destacar o gênero *Melipona* Illiger, por reunir o maior número de espécies, ser restrito à região Neotropical (ROUBIK, 1992) e agrupar algumas das espécies mais criadas com fim comercial. A *Melipona subnitida* é um membro desse grupo apresentando distribuição restrita à região semiárida do Nordeste brasileiro. Assim como os outros meliponíneos, são importantes pela produção de mel e por trazer grandes benefícios diretos à fruticultura, agricultura e recuperação de matas ciliares.

Estudos filogenéticos são importantes por permitir uma melhor compreensão das relações evolutivas e dos fatores que levam a diversificação de uma espécie. Uma classe de marcadores amplamente utilizada em estudos filogenéticos de organismos é o conjunto de genes do DNA mitocondrial (mitogenoma), o qual vem sendo utilizado em estudos taxonômicos e genéticos de populações naturais e cultivadas (TSOI et al., 2005). Os genes citocromo b (CytB) e citocromo c oxidase subunidade 1 (COX1) do mitogenoma, por exemplo, são importantes marcadores filogenéticos. Já a região controle do DNA mitocondrial (região rica em adenina e timina em invertebrados) é hipervariável sendo usada para estudos genéticos populacionais por possuir uma maior variação.

Vários trabalhos têm utilizado a análise de sequências de mitogenoma para estudos das relações evolutivas (GUARNIZO et al., 2016) e estudos genéticos populacionais (BONATTI et al., 2014), entretanto, grupos neotropicais ainda possuem poucas informações a esse respeito. Para o estudo dessas regiões é necessário que se tenha o genoma mitocondrial parcial ou completamente sequenciado. No gênero *Melipona* até o momento só existem dois mitogenomas parciais disponíveis: *Melipona bicolor* (SILVESTRE; DOWTON; ARIAS, 2008) e mais recentemente o da espécie *Melipona scutellaris* (PEREIRA et al., 2015).

O conhecimento da taxonomia do gênero *Melipona* é crucial para o monitoramento das populações de *Melipona* introduzidas e uma parte constante da fauna atual em muitas áreas naturais. Estudos que visam elucidar as relações evolutivas dentro do gênero *Melipona* são

necessários para ampliar o conhecimento do gênero e para contribuir na compreensão das suas relações de parentesco.

Neste estudo objetivamos sequenciar, montar e caracterizar o genoma mitocondrial da abelha sem ferrão *M. subnitida*. Os dados aqui reportados fornecem uma fonte para análises comparativas da evolução recente dos genomas mitocondriais em espécies de abelhas.

5.3 Material e Métodos

No laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia da Embrapa Meio-Norte (Teresina-Pi-Brasil) o DNA genômico da abelha foi extraído a partir do tórax de dois indivíduos oriundos do Nordeste do Brasil (Estado do Piauí), utilizando fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) com SDS e o tecido digerido com proteinase-K, seguido por precipitação em etanol (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

As amostras foram levadas para o laboratório Marine Gene Probe do departamento de Biologia na Dalhousie University (Halifax-Canadá) e duas bibliotecas Illumina *paired-end* (*Msub1* e *Msub2*) foram criadas usando 1 ng de DNA genômico, seguindo o protocolo padrão da Illumina Nextera DNA Kit Preparação de Amostras (Illumina Inc., San Diego, Califórnia). O sequenciamento em seguida das bibliotecas de DNA foi realizada utilizando uma plataforma Illumina (MiSeq Benchtop) com a biblioteca carregada como 16% de um MiSeq Reagente Kit v2 com 300 ciclos de execução de sequenciamento.

No Instituto de Bioquímica Médica (Laboratório Multidisciplinar para Análise de Dados da Universidade Federal do Rio de Janeiro) as seqüências concatenadas de ambos os conjuntos de dados (*Msub1* e *Msub2*) foram alinhadas para um banco de dados construído com três mitogenomas conhecidos de abelhas, incluindo os mitogenomas parciais de *Melipona bicolor* (NC_004529; SILVESTRE; DOWTON; ARIAS, 2008), *Melipona scutellaris* (NC_026198; SILVERIO et al., 2014) e todo o genoma mitocondrial de *Apis mellifera ligustica* (NC_001566; CROZIER; CROZIER, 1993). O software GMAP (WU; WATANABE, 2005) foi utilizado para o alinhamento e foram encontradas 2.553 seqüências *paired-end* correspondentes a outros mitogenomas de abelhas.

A sobreposição geral das *reads*, dados obtidos do sequenciamento, foi verificada manualmente usando o software Tablet (MILNE et al., 2013). A anotação do genoma foi realizada utilizando um servidor MITOS (BERNT et al., 2013), mitoMaker e curação manual usando o BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). Previsões de RNA de transferência foram realizadas no servidor da web tRNAscan-SE (LOWE; EDDY, 1997). As posições de início e fim de cada gene foram verificadas manualmente usando o software Artemis (CARVER et al., 2012).

Adicionalmente foi realizado um alinhamento (BLAST) da região do gene que codifica citocromo c oxidase subunidade 1 (COX1) entre as espécies *M. subnitida* (*query*) e *M. scutellaris* (*subject*) para verificar o nível de homologia entre as duas espécies e a confiabilidade

do sequenciamento dos nucleotídeos. Resumo da metodologia da montagem e anotação do mitogenoma da abelha encontra-se no fluxograma seguinte (Figura 1)

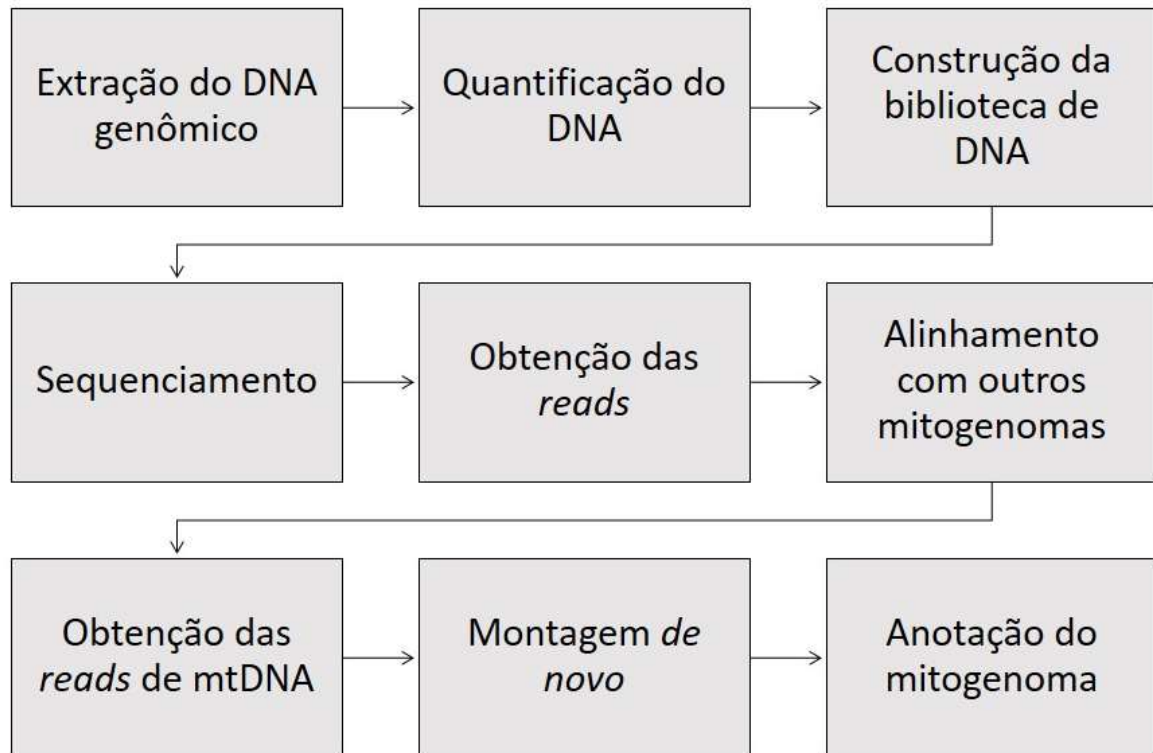


Figura 1 Metodologia para a montagem e anotação do mitogenoma

5.4 Resultados e Discussão

O primeiro conjunto de dados (*Msub1*) gerou 997.552 *reads* sequenciadas e o segundo (*Msub2*), 2.533.648 *reads*. Uma vez que cada conjunto de dados foi executado como sequências *paired-end* com 250 pb cada, o conjunto de dados inteiro foi de aproximadamente de 1,7 Gb de sequências de DNA com um rendimento médio observado de 3,7 *reads* por posição de nucleotídeos.

O tamanho do mitogenoma da *M. subnitida* foi previamente estimado por análises utilizando enzimas de restrição (RFLP) em 18.500 pb, assim como de seis outras abelhas do gênero *Melipona* (*M. bicolor*, *M. compressipes*, *M. marginata*, *M. melanoventer*, *M. quadrifasciata* e *M. rufiventris*) (WEINLICH et al., 2004). Dentre essas, foi confirmado por meio da tecnologia de sequenciamento o tamanho parcial do mitogenoma da *M. bicolor* em 14.422 pb faltando a região rica/repetitiva em adenina e timina onde encontra-se a origem da

replicação do DNA do genoma mitocondrial. Essa região em uma abelha de outro gênero (*Apis mellifera ligustica*) com o mitogenoma completamente sequenciado possui 826 pb (CROZIER; CROZIER, 1993) e é muito utilizada em estudos genéticos populacionais.

Por meio da tecnologia de sequenciamento de nova geração, o mitogenoma parcial da abelha *M. subnitida* foi montado e contém 12.740 pb apresentando 7 genes que codificam proteínas, 6 que codificam RNAs de transferência e 1 que codifica RNA ribossomal (Tabela 1, Figura 1). Os comprimentos dos genes não foram encontrados como esperado (existência de *gaps*) comparando-os com os genes de duas outras abelhas *Melipona* e uma *Apis*. Por exemplo, o gene ATP6 que em *M. subnitida* foi observado 396 pb é encontrado no tamanho 683, 683 e 680 pb em *M. bicolor*, *M. scutellaris* e *A. mellifera ligustica*, respectivamente. Os que foram encontrados completos estão em sintonia com os dos mitogenomas dessas outras três espécies.

O tamanho total do mitogenoma da *M. subnitida* não pode ser confirmado pelos dados gerados da tecnologia de sequenciamento de nova geração. É necessário que a estratégia *primer walking* (uso de iniciadores para amplificação do genoma mitocondrial a partir do DNA total) seja utilizada para a montagem do mitogenoma completo. Não obstante, os resultados aqui estão de acordo com um estudo inicial com enzimas de restrição (WEINLICH et al., 2004) sobre a ausência de uma região hipervariável intergênica entre COX1 e COX2, a qual está presente em abelhas do gênero *Apis* e supostamente seja a segunda origem de replicação e transcrição do mitogenoma (CORNUET et al., 1991).

Sobre a organização dos genes, o COX1, COX2, ATP6, COX3, CytB e os tRNAs [tRNA(Leu), tRNA(Asp), tRNA(Asn), tRNA(Glu), tRNA(Ser)] foram codificados na cadeia pesada (*H-strand* – rica em guaninas), já os genes NAD5, NAD4, NAD1 e tRNA(Phe) foram codificados na cadeia leve (*L-strand* – rica em citosina) (Figura 2).

Por meio do alinhamento realizado (Figura 2) da região do gene citocromo c oxidase subunidade I (COX1) entre as espécies *M. subnitida* (*query*) e *M. scutellaris* (*subject*) pôde-se verificar 93% de homologia/identidade entre as duas espécies e assim obtivemos uma confiabilidade do sequenciamento dos nossos dados.

Os dados fornecidos auxiliarão a esclarecer as relações evolutivas dentro da família Apidae e podem ser usados para estudos da genética de populações e de identificação em insetos. O mitogenoma completo da *Melipona subnitida* pode beneficiar estudos filogenéticos, delimitação e filogeografia de espécies, que são essenciais para os esforços de conservação em curso e também irá promover nossa compreensão da evolução e metabolismo energético das abelhas.

Tabela 1 Características do genoma mitocondrial parcial de *M. subnitida* comparado com os mitogenomas de duas outras abelhas *Melipona* e uma *Apis*.

Gene	Posição (pb)		Tamanho observado		Tamanho esperado		
	Início	Fim	Nucleotídeo	aa	<i>M. bicolor</i>	<i>M. scutellaris</i>	<i>A. mellifera ligustica</i>
COX1	86	1624	1539	513	1559	1562	1565
tRNA (Leu)	1646	1711	66		66	64	69
COX2	1712	2386	675	225	677	701	677
tRNA (Asp)	2395	2461	67		68	65	68
ATP6	2905	3300	396	132	683	683	680
COX3	3310	4086	777	259	776	779	779
tRNA (Asn)	4593	4658	66		63	63	68
tRNA (Glu)	4720	4782	63		66	66	65
tRNA (Phe)	4777	4842	66		64	65	68
Nad5	5635	6402	768	256	1646	1622	1664
Nad4	6938	7636	699	233	1322	1305	1343
CytB	9002	10030	1029	343	1149	1143	1151
tRNA (Ser)	10032	10097	66		65	65	66
Nad1	10198	10983	516	172	929	932	917
rRNA (16S)	11072	12738	1667		1353	1358	1370

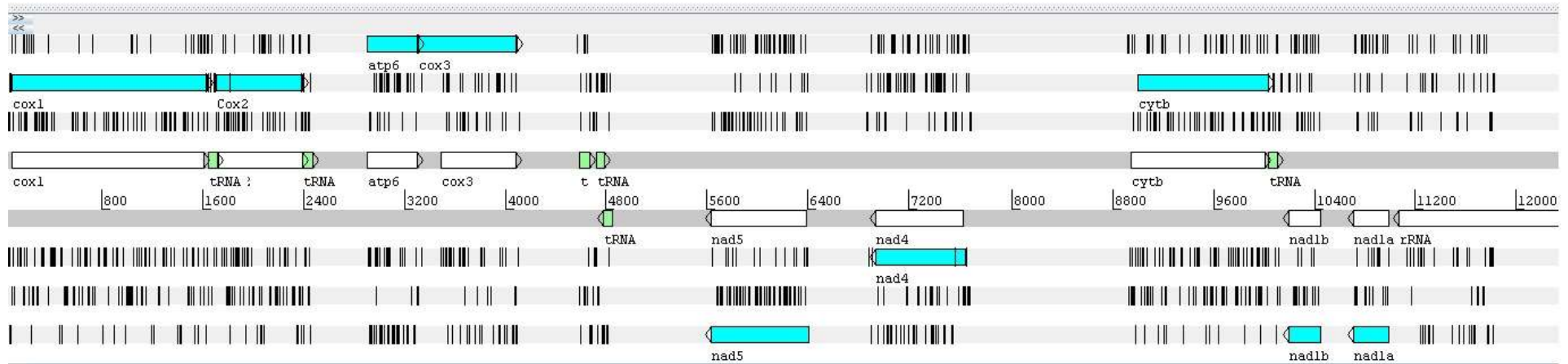


Figura 2 Mapa linearizado da organização parcial do mitogenoma da *M. subnitida*.

Sequence ID: ICI|Query_69763 Length: 1563 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 1544 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.74 bits(1231)	0.0	1440/1545(93%)	1/1545(0%)	Plus/Plus
Query 86	145	866	925	
Sbjct 1	60	781	840	
Query 146	205	926	985	
Sbjct 61	120	841	900	
Query 206	265	986	1045	
Sbjct 121	180	901	960	
Query 266	325	1046	1105	
Sbjct 181	240	961	1020	
Query 326	385	1106	1165	
Sbjct 241	300	1021	1080	
Query 386	445	1166	1225	
Sbjct 301	360	1081	1140	
Query 446	505	1226	1285	
Sbjct 361	420	1141	1200	
Query 506	565	1286	1345	
Sbjct 421	480	1201	1260	
Query 566	625	1346	1405	
Sbjct 481	540	1261	1320	
Query 626	685	1406	1465	
Sbjct 541	600	1321	1380	
Query 686	745	1466	1525	
Sbjct 601	660	1381	1440	
Query 746	805	1526	1585	
Sbjct 661	720	1441	1500	
Query 806	865	1586	1630	
Sbjct 721	780	1501	1544	

Figura 3 Alinhamento da região do gene citocromo c oxidase subunidade I (COX1) entre as espécies *M. subnitida* (query) e *M. scutellaris* (subject).

5.5 Conclusão

Por meio do sequenciamento de nova geração foi possível a caracterização parcial do genoma mitocondrial da abelha *M. subnitida*.

Regiões aqui sequenciadas podem ser usadas para desenhos de *primers* e aplicadas em estudos genéticos.

5.6 Referências

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res*, v.25, p.3389–402, 1997.

BERNT, M.; DONATH, A.; JUHLING, F.; EXTERNBRINK, F.; FLORENTZ, C.; FRITZSCH, G.; PUTZ, J., et al. MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Mol Phylogenet Evol*, v.69, p.313–19, 2013.

BONATTI, V.; SIMÕES, Z.L.P.; FRANCO, F.F.; FRANCOU, T.M. Evidence of at least two evolutionary lineages in *Melipona subnitida* (apidae, Meliponini) suggested by mtDNA variability and geometric morphometrics of forewings. *Naturwissenschaften*, v.101, p.17-24, 2014.

CAMARGO, J.M.F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version 2008. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed Apr/24/2011.

CARVER, T.; HARRIS, S.R.; BERRIMAN, M.; PARKHILL, J.; MCQUILLAN, J.A. Artemis: An integrated platform for visualization and analysis of high throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics* v.28, p.464-9, 2012.

CHEVREUX, B., WETTER, T.; SUHAI, S. Genome Sequence Assembly Using Trace Signals and Additional Sequence Information. *Computer Science and Biology: Proceedings of the German Conference on Bioinformatics (GCB)*, p.45-56, 1999.

CORNUET, J.M.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M. Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. *Mitochondrial DNA. Genetics* v.1128, p.393-403, 1991.

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.

GUARNIZO, C.E.; WERNECK, F.P.; GIUGLIANO, L.G.; SANTOS, M.G.; FENKER, J.; SOUSA, L.; ANGIOLELLA, A.B.D.; SANTOS, A.R.; STRÜSSMANN, C.; RODRIGUES, M.T.; DORADO-RODRIGUES, T.F.; GAMBLE, T.; COLLID, G.R. Cryptic lineages and diversification of an endemic anole lizard (*Squamata, Dactyloidae*) of the Cerrado hotspot. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.94, p. 279-289, 2016.

LOWE, T.M.; EDDY, S.R., tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Research*, v.25, p.955-964, 1997.

MILNE, I.; STEPHEN, G.; BAYER, M.; COCK, P.J.; PRITCHARD, L.; CARDLE, L.; SHAW, P.D.; MARSHALL, D. Using tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Briefings in Bioinformatics*, v.14, p.193-202, 2013.

PEREIRA, U.P.; BONETTI, A.M.; GOULART, L.R.; SANTOS, A.R.; OLIVEIRA, G.; CUADROS-ORELLANA, S.; UEIRA-VIEIRA, C. Complete mitochondrial genome sequence of a Brazilian stingless bee. *Mitochondrial DNA*, v.23, p. 1-2, 2015.

ROUBIK, D. W. Ecology and natural history of tropical bees. 1. ed. 1992, 514p.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SILVERIO, M. S.; RODOVALHO, V. R.; BONETTI, A. M.; DE OLIVEIRA, G. C.; CUADROS-ORELLANA, S.; UEIRA-VIEIRA, C.; SANTOS, A. R. Preliminary Characterization of Mitochondrial Genome of *Melipona scutellaris*, a Brazilian Stingless Bee. *BioMed Research International*, v. 2014, p.1-6, 2014.

SILVESTRE, D.; DOWTON, M.; ARIAS, M.C. The mitochondrial genome of the stingless bee *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Sequence, gene organization and a unique tRNA translocation event conserved across the tribe Meliponini. *Genetics and Molecular Biology*, v.31, p. 451-460, 2008.

TSOI, K. H.; WANG, Z.Y.; CHU, K.H. Genetic Divergence Between two Morphologically Similar Varieties of the Kuruma Shrimp. *Marine Biology*, v.147, p.367, 2005.

WEINLICH, R.; FRANCISCO, F.O.; ARIAS, M.C. Mitochondrial DNA restriction and genomic maps of seven species of *Melipona* (Apidae, Meliponini). *Apidologie*, v.35, p.365-370, 2004.

WU, T. D.; WATANABE, C. K. GMAP: a genomic mapping and alignment program for mRNA and EST sequences. *Bioinformatics*, v.21, p.1859-1875, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Identification and abundance of microsatellite Motifs in the stingless bee *Melipona subnitida* (Apidae: Meliponini)

I. G. B. Souza¹, P. Bentzen², B. A. Souza¹, F. M. Diniz^{1,*}

¹EMBRAPA Meio-Norte, Laboratory of Molecular Biology & Biotechnology, CP: 01,
CEP: 64.006-220, Teresina, PI, Brazil.

² Marine Gene Probe Laboratory, Biology Department, Dalhousie University, 1355
Oxford Street, Halifax, NS B3H 4R2, Canada.

Keywords: genetic diversity, microsatellite, polymorphic, stingless bee

*Correspondence:

Fabio Mendonca Diniz

¹EMBRAPA Meio-Norte, Laboratory of Molecular Biology & Biotechnology, CP: 01,
CEP: 64.006-220, Teresina, PI, Brazil.

Fax: +55 (86) 3198 0530

Email: fabio.diniz@embrapa.br

Introduction

Melipona subnitida Ducke, known as jandaira, is stingless bee native from northeastern Brazil own great economic and ecological value to native populations. They are not only associated with honey and fruit production but also the environmental conservation (Silva et al. 2006). Threatened species, as *M. subnitida*, by the human activities made its natural population size decline rapidly.

The assessment of the genetic diversity present within bee populations is a prerequisite for the establishment of efficient management and conservation practices. Despite the existence of few genetic studies related to stingless bee species, it has been shown that molecular markers (e.g. microsatellite DNA loci - SSR, SNPs, etc.) can be useful in the analysis of natural populations, contributing to the development of management strategies for these important genetic resources. Microsatellite markers are still widely used because they have unique traits compared with other markers (e.g. McBride et al. 2014).

Microsatellites consist of short runs of 2-6 nucleotides that are scattered throughout the genome of eukaryotic organisms (Diniz et al. 2007). They have been considered the most used markers for population studies due to their multiallelic nature, high level of polymorphism and codominance inheritance (Zane et al. 2002). Traditional methods for the identification of microsatellite markers usually demand the construction of small-insert genomic libraries, colony selection using microsatellites for probe hybridization, sequencing of selected clones, primers design for suitable flanking regions, and assessments on the marker polymorphism by PCR on population samples (e.g. Britto et al. 2009). More recently, research groups have been applying next-generation sequencing (NGS) technologies to generate sequence data for the identification of microsatellite regions and primer design (Li et al. 2014; Rico et al. 2014). For this

purpose, both genomic DNA and genic regions (using cDNA libraries) have been used as templates for sequencing. The impact of this approach on microsatellite marker development is evident: partial genomic surveys using even fractions of the capacity of next-generation sequencing machines allow for the discovery of thousands of potentially amplifiable microsatellite regions which can be selected for primer design. This is a promising approach for species with limited genomic information (e.g. *M. subnitida*), the breeding programs of which would greatly benefit from the use of genomic tools, such as molecular markers (e.g. microsatellites and SNPs), but for which molecular genetic markers are not currently available.

Several microsatellite mining reports scanning genome sequences of various organisms have appeared in recent years (Wang et al, 2014, Sahu et al, 2014), providing important data for genetic population studies. Limited knowledge is available about distribution of microsatellites in bees. In this study, we report the mining and characterization of SSRs in the eukaryotic genome of the stingless bee *M. subnitida*.

Materials and methods

Samples of *M. subnitida* were collected from hives originally from the Northeast region of Brazil. Whole genomic DNA was extracted from the thorax of five individuals using phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) with the SDS/proteinase-K-digested tissue, followed by ethanol precipitation (Sambrook and Russell 2001). A single individual with the highest quality DNA yield was selected for sequencing. DNA this individual was quantified using a PicoGreen dsDNA assay (Thermo Fisher Scientific - Waltham, MA, USA), and was run using a Perkin Elmer Fusion DNA Quantifier (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts).

An Illumina paired-end library was created following the standard protocol of the Illumina Nextera DNA Sample Preparation Kit (Illumina Inc., San Diego, California).

DNA sequencing was conducted using a MiSeq Benchtop Sequencer (Illumina Inc., San Diego, California). Contigs were assembled from the resulting paired-end sequence data using CLC Genomics Workbench 7.0.4 (CLC bio, Aarhus, Denmark).

The contigs in FASTA format were input into software Msatcommander 0.8.2 (Faircloth 2008) for mining of possible di- to hexanucleotide repeats (microsatellite loci). Combined search were made for dinucleotide, trinucleotide, tetranucleotide, pentanucleotide and hexanucleotide motifs with 10, 9, 8, 7 and 6 repeats or more respectively. The percentage of motif types, lengths and variation, and frequency were calculated.

Results and discussion

Next-generation sequencing technologies have been used in many organism and non-organism model by quick result and low per base pair cost for development of molecular resources. In *M. subnitida* Illumina sequencing run produced 1,995,104 reads (633,411,884 total bases) and the GC content was 266,685,755 (42%). These reads were assembled *de novo* into 141,412 contigs in CLC Workbench and the Msatcommander identified 5574 perfect microsatellite loci.

Among the total SSRs identified, the amount of dinucleotide repeats was the most abundant accounting for 89.7% of total reads, followed by trinucleotide (6.4%), tetranucleotide (2.7%), pentanucleotide (0.7%) and hexanucleotide (0.5%). As molecular markers, dinucleotide is more important than the other SSRs because of their higher mutation rates (Karaoglu et al. 2005). However, the other repeats (e.g tetranucleotide) has ease imaging and scoring being preferred in population studies. As expected, the occurrence of pentanucleotide and hexanucleotide repeats was less than that of the other repeats.

Six, 16, 29, 20 and 18 types of dinucleotide, trinucleotide, tetranucleotide, pentanucleotide and hexanucleotide were found, respectively. The highest repeat number was 41 (Table 1) and the most frequent dinucleotide motif was CT (4040 repeats) (Figure 1). Among the six repeat motifs of dinucleotide, the motif CT showed a huge dominance followed by GT. (CT) n and (GT) n were characterized previously in *Apis mellifera* and *bombus terrestris* where (CT) n microsatellites were more common than (GT) n in the genomes of both species. These motifs are similar to those of (GT) n and (CT) n microsatellites in mammalian genomes that resulted to insect the concept of an evolutionary conservation for quantitative and qualitative traits of these microsatellites (Estoup et al, 1993).

Of the trinucleotide motifs, AAG motif was predominant in the *M. subnitida* genome followed by two abundant motifs in descending order AAT and AGC. These three types of motifs accounted for 79% of all trinucleotide motifs. Of the 29 tetranucleotide motifs, CTTT was dominant, account for 13.15 % (20), followed by AACG (16, 10.52%). There were 26 other motif types accounting for 76.33%. Among the pentanucleotide motifs, the most abundant was AAAAG 17.94% and 18 other of motifs were rarely found in all the sequences. Of the 18 hexanucleotide motifs, CCTCTT motif was predominant and 17 other of motifs were rarely found in all the sequences as well as the pentanucleotides.

Table 1. The number, proportion and number of repeats for each type of SSRs in *M. subnitida*.

Repeat types	Number of SSRs	Proportion	Number of repeats
Dinucleotide	5000	89.7%	10-39
Trinucleotide	359	6.4%	9-41
Tetranucleotide	152	2.7%	8-31
Pentanucleotide	39	0.7%	7-13
Hexanucleotide	24	0.5%	6-31
Total	5574	100%	6-41

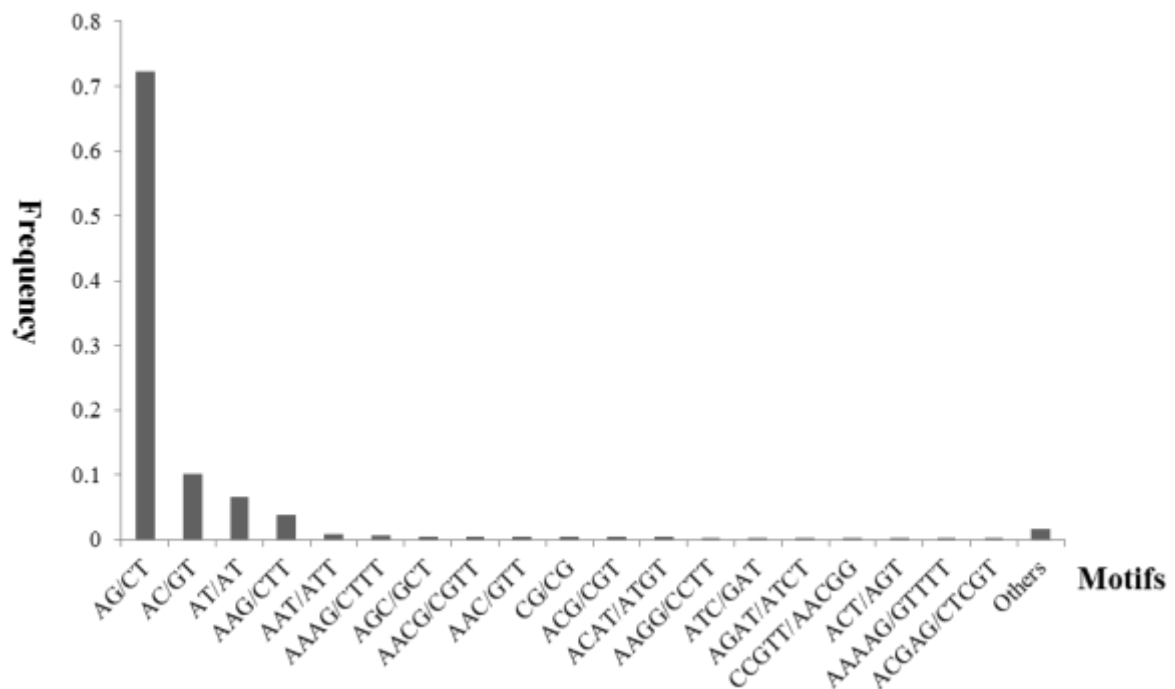


Figure 1. Proportion of different types of SSR motifs.

Among the characteristics of SSRs not only the frequency of repeat is important as a marker but also the variation in length. We chose 20, 27, 32, 35 and 36 pb as a minimum length in dinucleotide, trinucleotide, tetranucleotide, pentanucleotide and hexanucleotide, respectively. 20 pb was dominant length of the *M. subnitida* microsatellites, accounting for 14% approximately. The amount of the motifs with length over 51 pb was 4 %. Long repeat lengths in microsatellites is suggested that they are of recent origin and are biased towards an increase in repeat length (Harr and Schlotterrer, 2000; Katti, Ranjekar and Gupta, 2001). The length distribution and frequency of microsatellites are shown in figure 2.

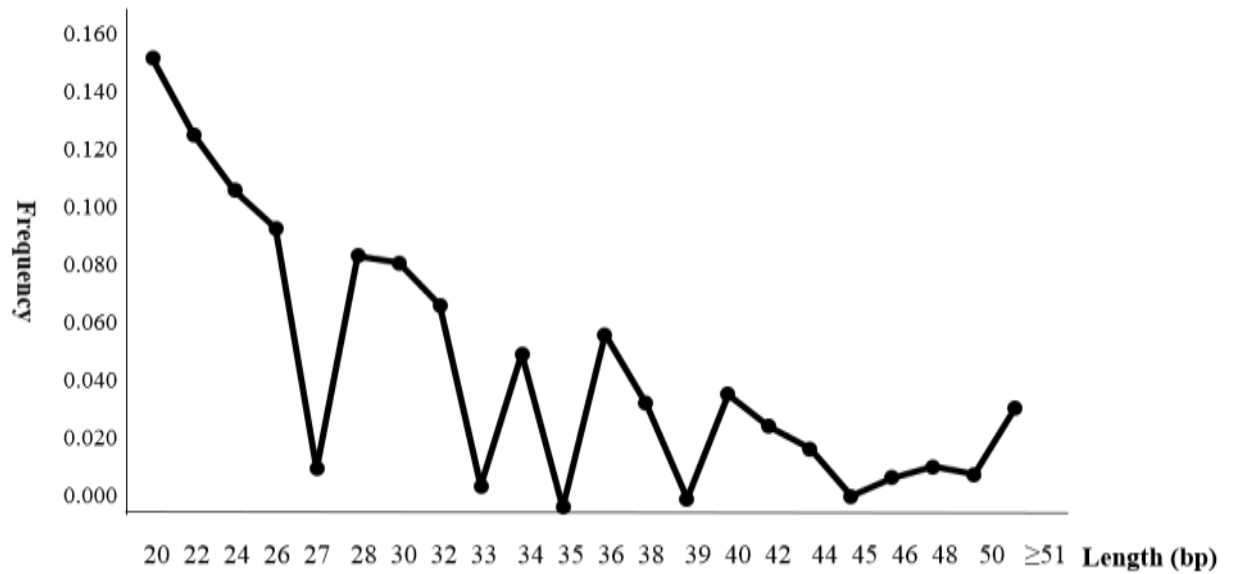


Figure 2. Length distribution and frequency of microsatellites.

The relevance of microsatellite sequences obtained through *in silico* mining is a high abundance of SSRs in different sequence resources. Further, by exploiting genome-wide microsatellite mining is possible to analyze various aspects related to structural, functional and evolutionary genomics (Sharma et al, 2007). This first survey microsatellite loci for *M. subnitida* will be used for development of molecular marker to be applied in genetic analyses of distinct populations.

Acknowledgements:

Sequencing was conducted on a MiSeq DNA sequencer purchased with a bequest from Elizabeth Ann Nielsen to the Marine Gene Probe Laboratory. The first author acknowledges the Brazilian Federal Government (Science without Borders program) scholarship support for carrying out this research and Embrapa Macroprograma 2 (02.11.01.029.00.00) for funding this work.

References

Britto FB, Diniz FM, Paterson I, et al. (2009). Polymorphic microsatellite DNA markers in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura: Ocypodidae). *Molecular Ecology Resources (Print)* **9**, 1249-1252.

Diniz, F. M. ; Iyengar, Arati ; Lima, P. S. C. ; Maclean, Norman ; Bentzen, Paul . Application of a double-enrichment procedure for microsatellite isolation and the use of tailed primers for high throughput genotyping. *Genetics and Molecular Biology*, v. 30, p. 380-384, 2007.

Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite v 3.5: a new series of programs to perform population genetic analysis under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**:564-567.

Faircloth B (2008) Msatcommander: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Molecular Ecology Resources* **8**, 92-94.

Hauswaldt JS and Glenn TC (2003) Microsatellite DNA loci from Diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*). *Molecular Ecology Notes* **3**,174-176.

Haydar Karaoglu, Crystal Man Ying Lee, and Wieland Meyer (2005) Survey of Simple Sequence Repeats in Completed Fungal Genomes *Mol. Biol. Evol.* **22**(3):639–649.

Lessios HA (1992) Testing electrophoretic data for agreement with Hardy–Weinberg expectations. *Marine Biology* **112**, 517-523.

Li S, Qian Z, Fu Y, et al. (2014) Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in the Tibetan cypress *Cupressus gigantea* using paired-end Illumina shotgun sequencing. *Conservation Genetics Resources* **6**, 795-797.

Meghan C. McBride • Theodore V. Willis Rod G. Bradford • Paul Bentzen Genetic diversity and structure of two hybridizing anadromous fishes (*Alosa pseudoharengus*, *Alosa aestivalis*) across the northern portion of their ranges. 05 Jun 2014

Rico Y, Paetkau D, Harris LR, et al. (2014) Development of nuclear microsatellite markers for American badger subspecies (*Taxidea taxus* spp.) using next generation sequencing. *Conservation Genetics Resources* **6**, 715-717.

Sambrook J, Russell DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Silva, T.M.S, C.A. Camara, A.C.S. Lins, J.M. Barbosa, E.M.S. Silva, B.M. Freitas, F.A.R. Santos Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (2006), pp. 507–511

Silva GR, Souza BA, Pereira FM, et al. (2014) New molecular evidence for fragmentation between two distant populations of the threatened stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Journal of Hymenoptera Research* **38**, 1-9.

van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, et al. (2004) Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**, 535-538.

APÊNDICE B

Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the stingless bee *Melipona subnitida* using next-generation sequencing

Isis G. B. Souza¹, Ian G. Paterson², Meghan C. McBride², Paul Bentzen², Bruno A. Souza¹, Fabia M. Pereira¹, Maria T. R. Lopes¹, Fabio M. Diniz^{1,*}

¹EMBRAPA Meio-Norte, Laboratory of Molecular Biology & Biotechnology, CP: 01, CEP: 64.006-220, Teresina, PI, Brazil.

² Marine Gene Probe Laboratory, Biology Department, Dalhousie University, 1355 Oxford Street, Halifax, NS B3H 4R2, Canada.

*Correspondence:

Fábio Mendonça Diniz

¹EMBRAPA Meio-Norte, Laboratory of Molecular Biology & Biotechnology, CP: 01, CEP: 64.006-220, Teresina, PI, Brazil.

Fax: +55 (86) 3198 0530

fabio.diniz@embrapa.br

Abstract We described the isolation and characterization of 23 microsatellite loci from the stingless bee (*Melipona subnitida*). Out of 52 microsatellite primer pairs screened, 17 displayed polymorphisms and six were monomorphic. The analysis of variability was performed in 56 individuals. The number of alleles per locus ranged from 2 to 22 among populations; values for expected and observed heterozygosities ranged from 0.125 to 1.000 and from 0.121 to 0.923, respectively. These are the first microsatellite markers characterized for *M. subnitida* and they will be useful in obtaining estimates of population-level genetic diversity studies in a near future.

Keywords genetic diversity, microsatellite, polymorphic, stingless bee

Melipona subnitida Ducke is a stingless bee endemic to the semi-arid region of northeastern Brazil. The species has great ecological significance as a pollinator of the local native and cultivated flora. However, they are currently threatened by the increasing destruction of native semi-arid vegetation and by the intensification of agriculture in the Caatinga (exclusively Brazilian biome). In response, populations of the stingless bee are declining, resulting in local extinction (Silva et al. 2014). Next-generation sequencing technologies is a promising approach for species with limited genomic information (e.g. *M. subnitida*), the breeding programs of which would greatly benefit from the use of genomic tools, such as molecular markers (e.g. microsatellites and SNPs), but for which molecular genetic markers are not currently available.

Whole genomic DNA was extracted from the thorax of five individuals using phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) with the SDS/proteinase-K-digested tissue, followed by ethanol precipitation (Sambrook and Russell 2001). An Illumina paired-end library was created using 1 ng of genomic DNA, following the standard protocol of the

Illumina Nextera DNA Sample Preparation Kit (Illumina Inc.). DNA sequencing was conducted using a MiSeq Benchtop Sequencer (Illumina Inc.). Contigs were created from the resulting paired-end sequence data using CLC Genomics Workbench 7.0.4 (CLC bio).

The *Melipona subnitida* library was loaded as 16% of a MiSeq Reagent Kit v2 300 cycle sequencing run and produced 1,995,104 reads. These reads were assembled into 141,412 contigs in CLC Workbench. The program Msatcommander 0.8.2 (Faircloth 2008) identified 6422 microsatellite loci, being in the majority dinucleotide repeats (5998), and the most common motifs (CT)_n. For ease of imaging and scoring, we chose to examine only tri- and tetranucleotide loci. Of these, 52 loci were suitable for primer design and further testing. One primer of each pair was ordered with a CAG tail. Microsatellites were individually amplified in 5 µL consisting of 2.15 µL of dd.H₂O, 0.5 µL of 10× reaction buffer (Thermo Fisher Scientific Inc.), 2.5 mM of MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific Inc.), 0.1 µM of fluorescently labeled CAG tag, 0.1 µM of un-tailed primer (either forward or reverse), 0.01 µM of CAG tailed primer (either forward or reverse), 200 µM dNTPs (New England BioLabs Inc.), 0.25 U *Taq* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc.), and approximately 15 ng of genomic DNA. Samples (n=4) were initially amplified using thermocycling conditions which consisted of an initial 5 min denaturation at 95 °C, followed by 30 cycles of 95 °C for 40 s, primer specific annealing temperature using gradient PCR (50-65°C) for 30 s, 72 °C for 40 s, and a final extension at 72 °C for 7 min. Imaging of PCR products was conducted using Li-COR 4200/4300 DNA analyzers (Li-COR Biosciences). For polymorphic markers, a subsequent set of 56 individuals from three Brazilian populations (Ceara-CE, Piauí-PI and Rio Grande do Norte-RN) were chosen for further testing in order to obtain estimates of basic population level statistics.

The genotyped data was analyzed using Micro-checker 2.2.3 (van Oosterhout et al. 2004) to test for the presence of null alleles or other possible scoring inconsistencies. Tests for Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium were conducted using Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer 2010). Bonferroni-corrected P-values were used to assess the significance ($P < 0.05$).

Of the 52 tested loci, 17 were identified as polymorphic with allele numbers ranging between two (Msub48) and 22 (Msub41). A further six microsatellites were identified as monomorphic (Table 1) and the remaining exhibited unclear allelic pattern and/or unspecific products. Expected and observed heterozygosities ranged from 0.125 to 1.000 and from 0.121 to 0.923, respectively (Table 2). No evidence of null alleles or scoring error was detected using Micro-checker. A departure from HWE was detected for locus Msub41 (adjusted P-value < 0.0029).

The first microsatellite loci for *M. subnitida* will be used for genetic analyses of distinct populations across the northeast region of Brazil, and to reveal how environmental degradation affects this endangered species.

Acknowledgements:

Sequencing was conducted on a MiSeq DNA sequencer purchased with a bequest from Elizabeth Ann Nielsen to the Marine Gene Probe Laboratory. The first author acknowledges the Brazilian Federal Government (Science without Borders program) scholarship support for carrying out this research and Embrapa Macroprograma 2 (02.11.01.029.00.00) for funding this work.

References

Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite v 3.5: a new series of programs to perform population genetic analysis under Linux and Windows. *Mol Ecol Res* 10:564-567.

- Faircloth B (2008) Msatcommander: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Mol Ecol Res* 8, 92-94.
- Sambrook J, Russell DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Silva GR, Souza BA, Pereira FM, et al. (2014) New molecular evidence for fragmentation between two distant populations of the threatened stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Journal of Hymenoptera Research* 38, 1-9.
- van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, et al. (2004) Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Eco Notes* 4, 535-538.

Table 1 Characteristics of 23 microsatellite loci developed for *Melipona subnitida* Ducke.

Locus	Primer sequence (5'-3')	Repeat Motif	Ta (°C)	Na	Size range (bp)	N	GenBank Accession N°
Msub02	F: GCCCAAAGATGGTATGCCG R: ACGAGGCGGATTCAACGAG	(ACG) ₁₄	60	6	146-173	56	KM494946
Msub03	F: CTCGCGCACAATTTCGAG R: GGTATTTCGCCGGCAAGC	(CGTT) ₁₁	60	6	171-191	56	KM494947
Msub04	F: AAAGTTGGTTCAGGTGCC R: CAGGGCGGGTTCAATACC	(CTT) ₁₅	60	7	146-173	56	KM494948
Msub07	F: ACACCAACCCTAATGCTCATCGC R: CTCGCTTGTAAGCTGCC	(ACTG) ₁₃	60	4	160-180	56	KM494949
Msub08	F: GGAAGAAGTCTCTCGAGTAAAG R: TATCTCTGGCAGGTTCCG	(AAG) ₁₄	60	7	146-185	56	KM494950
Msub09	F: TGGTCTTCTTTATGGCAGCG R: GCATCCGACAAGTTGGCTC	(CTT) ₁₇	60	8	155-188	56	KM494951
Msub11	F: TCTCGCGCATACCTAACC R: GCTGACTCGGAACAATGGC	(CTT) ₁₃	60	3	175-181	56	KM494952
Msub18	F: TCCCGATTTCCACCGATCC R: GCCGACCTCTTCGACGG	(ACG) ₁₈	62	17	154-232	56	KM494953
Msub26	F: CAACACCTCTGCTTTATCGT R: CACTCACTTTGTTCCCTTT	(ATGT) ₁₂	60	8	171-203	56	KM494954
Msub30	F: CCTGTTATTTGCTCCTCGAAAT R: AACTCAAGGTTTCCCCGAAC	(CCTT) ₁₂	60	5	142-170	56	KM494955
Msub31	F: TTACCGTCTGTGCTACTGATCC R: TGTCTGTCTGTCTGTCTATCTTTCTG	(AGAT) ₁₄	60	12	162-210	56	KM494956
Msub37	F: AAATGCAGGCAGAAATGG R: TTGGACGAAAGTCAAATGC	(ACGC) ₁₄	60	17	150-226	56	KM494957
Msub38	F: AATACTCTGTTTCTTCCAGGGG R: CTGAAATTGCTTTCGTGCC	(AAAG) ₁₅	60	7	134-184	56	KM494958
Msub41	F: ATCTCCTTCCTTGCCTCACTC R: GTGGACAGAGGTTGGAAAAGAC	(ACTC) ₁₅ (TC) ₁₁	60	22	146-218	56	KM494959
Msub46	F: CACTGTTTCTCCAGTTGCTGTC R: GTTTCGTTTCGCGTGATTC	(AAAG) ₁₂	60	6	118-146	56	KM494960
Msub48	F: AAAGAGCGTAGGACTTCCACAG R: CATCCATCTATCCGTACATCCA	(GGAT) ₁₀	60	2	181-185	56	KM494961
Msub51	F: GGCATTACAAAGGGGAGAA R: AGTTGACAGCGTTTCTTACCTC	(AGAA) ₉	62	4	147-159	56	KM494962
Msub01	F: GGGCGTGGACTAAGTAGC R: GTGAGGAGAAACGTCGCAG	(CTT) ₁₁	60	1	161	56	KM494963
Msub20	F: GCAGAGTTGACAGCGTTTCC R: TGTATAAGAGACAGGCTCGGC	(CTTT) ₉	60	1	100	56	KM494964
Msub32	F: AAAACTCGAAGAAAACGAGGG R: GCTTGTTCGTAAGGCACCG	(AACG) ₁₄	60	1	158	56	KM494965
Msub35	F: GGCTTAGATACAGATCGGGTGT R: GGGTGGGGTGATGGG	(ACGC) ₁₆	60	1	134	56	KM494966
Msub49	F: AAACACCGTCGAGAGCCAT R: CTGACAAGCAAAGAAGCAAAGA	(CCTT) ₁₃	60	1	120	56	KM494967
Msub52	F: ATCAGGCATCAGACACAATCC R: ACTACTGAAATATGGCGTCGTG	(CCTT) ₉	60	1	110	56	KM494968

Included are locus name, primer sequence, repeat motif, annealing temperature (Ta), number of observed alleles (Na), allele size range, number of individuals (N) and associated GenBank accession number.

Table 2 Variability of 17 microsatellite loci and F-statistic in *Melipona subnitida* populations.

Locus	Ceara (N = 21)			Piauí (N = 15)			Rio Grande do Norte (N = 20)			F _{ST}
	H _o	H _e	P _{HWE}	H _o	H _e	P _{HWE}	H _o	H _e	P _{HWE}	
Msub02	0.563	0.688	0.022	0.909	0.558	0.025	0.789	0.679	0.500	0.144
Msub03	0.882	0.804	0.940	0.467	0.370	0.527	0.947	0.721	0.034	0.156
Msub04	0.722	0.717	0.855	0.643	0.627	0.074	0.727	0.675	0.051	0.037
Msub07	0.316	0.474	0.144	0.667	0.515	0.414	0.600	0.483	0.562	-0.009
Msub08	0.611	0.675	0.355	0.933	0.828	0.004	0.474	0.568	0.292	0.100
Msub09	0.800	0.650	0.040	0.500	0.632	0.063	0.600	0.687	0.295	0.104
Msub11	0.750	0.578	0.460	0.600	0.683	0.010	0.650	0.606	0.030	0.060
Msub18	1.000	0.863	0.052	1.000	0.869	0.003	0.867	0.862	0.060	0.069
Msub26	1.000	0.656	0.006	0.571	0.794	0.001	0.842	0.819	0.000	0.089
Msub30	0.611	0.570	1.000	0.667	0.653	0.005	0.450	0.383	1.000	0.063
Msub31	0.947	0.868	0.021	0.929	0.828	0.050	0.889	0.852	0.003	0.040
Msub37	0.842	0.898	0.035	0.769	0.886	0.002	0.750	0.798	0.098	0.096
Msub38	0.789	0.757	0.190	0.786	0.767	0.036	0.471	0.526	0.092	0.142
Msub41	0.842	0.923	0.001*	0.643	0.810	0.000*	0.737	0.865	0.000*	0.094
Msub46	0.368	0.367	0.457	0.333	0.287	1.000	0.625	0.597	0.455	0.083
Msub48	0.143	0.136	1.000	0.200	0.480	0.034	0.200	0.185	1.000	0.142
Msub51	0.125	0.121	1.000	0.308	0.280	1.000	0.417	0.467	0.117	0.069
Mean	0.665	0.632	-	0.643	0.639	-	0.649	0.634	-	0.083

*Locus that deviated significantly from HWE after Bonferroni correction (adjusted critical $P < 0.0029$). H_o, observed heterozygosity; H_e, expected heterozygosity; P_{HWE}, probabilities of departure from Hardy-Weinberg Equilibrium; N, number of individuals.

APÊNDICE C

Microsatellite markers developed in the stingless bee *Melipona fasciculata* by next-generation sequencing and an exploratory analysis of its geographic genetic variation

Geice Ribeiro da Silva ^{a,1}, Isis Gomes de Brito Souza ^{a,b,1}, Ian Paterson ^c, Meghan McBride ^c, Bruno de Almeida Souza ^d, Fabia de Mello Pereira ^d, Maria Teresa do Rego Lopes ^d, Paul Bentzen ^c, Fabio Mendonça Diniz ^{d,*}

^a Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Ininga, Teresina, PI, 64049-550, Brazil

^b Universidade Federal do Piauí, Northeast Biotechnology Network RENORBIO, Teresina, PI, 64049-550, Brazil

^c Department of Biology, Dalhousie University, Halifax, NS, B3H 4J1, Canada

^d Embrapa Mid-North, CP: 01, Teresina, PI, 64.006-220, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55 86 3198 0593; fax: +55 86 3198 0500.

E-mail address: fabio.diniz@embrapa.br (F.M. Diniz).

¹ These authors contributed equally to this work.

Abstract

I. Background: Native meliponines are currently threatened by increased human impacts. The assessment of their genetic variation by microsatellite DNA markers can assist in the conservation of populations and help in the planning and establishment of efficient management strategies. Next generation sequencing has proven to be useful for identifying microsatellite loci from the large amounts of sequence data generated. The purpose of this study was to develop the first set of microsatellite markers for *Melipona fasciculata*, selected from partial genome assembly of Illumina paired-end reads. An exploratory analysis of its genetic variation is performed to characterize these markers.

II. Methods and Results: Out of 37 microsatellite loci selected from next generation sequencing data, 17 displayed polymorphism in 50 genotyped individuals from two different populations, Maranhão and Piauí, of Northeastern Brazil. The number of alleles per locus ranged from 2 to 10. Mean expected and observed heterozygosities were 0.453 and 0.536, respectively. The polymorphism information content across all loci ranged from 0.108 to 0.714. A genetic diversity analysis revealed high values for population differentiation estimates ($F_{ST} = 0.194$, $R_{ST} = 0.230$, and $D_{est} = 0.162$). PCoA and Bayesian clustering showed a separation of the species into two distinct clusters.

III. Conclusions: Microsatellite loci have demonstrated strong potential for population-level genetic studies of *Melipona fasciculata* and can be used effectively as a molecular tool. Moreover, the exploratory analysis of the genetic diversity in *M. fasciculata* provides provisional evidence of significant population differentiation between the two studied populations.

Keywords: genetic diversity; short tandem repeats; polymorphism; stingless bee.

1. Introduction

Stingless bees (Hymenoptera: Apidae: *Meliponini*) are quite a diverse group of bees regarded for their great economic and ecological importance. For instance, beekeeping provides a sustainable source of *income under* a low-cost investment for smallholder *farming* communities; and these native bees support an efficient pollination service in both natural and agricultural systems [1-3].

Currently, native meliponines *are* threatened by increased *human impacts such as* destruction of native vegetation and consequent landscape transformation [4-7]. Negative effects may influence the survival and sustenance of small populations of native stingless bees resulting in local extinction [8]. The assessment of the genetic variation and population structure of meliponine bees, therefore, can assist in the conservation of these original populations and help in the planning and establishment of efficient management strategies essential to species survival.

The *Melipona* (*Melikerria*) *fasciculata* Smith, 1854 (Hymenoptera, Apidae), popularly known as “uruçu-cinzenta” or “tiúba”, is a native stingless bee species that can be found in the neotropical region of Brazil, within the states of Pará, Tocantins, Maranhão, Piauí and Mato Grosso [9]. Apart from its role as a pollinator in most ecosystems and crops [10-11], a *great interest* in the species has emerged because (i) stingless *beekeeping* is relatively *easy*, as long as flowering plants are available, and (ii) its production of honey and geopropolis with *antioxidant potential* [12-13] and anti-inflammatory effect [14].

Microsatellites, stretches of short DNA sequences tandemly repeated, have become the markers of choice for high-resolution assessment of genetic variation and population structure studies, most importantly, due to their abundance throughout the eukaryote genome and their hypervariability [15-16]. Emerging technologies in DNA sequencing (i.e. next generation sequencing - NGS) have proven to be useful for identifying microsatellite loci from the large amounts of sequence data they generate with much less effort and low cost, therefore, challenging traditional approaches for their development [17-20].

In this paper, we describe the first set of microsatellite markers developed for *Melipona fasciculata*, selected from partial genome assembly of Illumina paired-end reads. An exploratory analysis of its geographic genetic variation is also performed to characterize and validate these polymorphic markers.

2. Materials and methods

2.1 *Bee materials and genomic DNA isolation*

Genomic DNA was extracted from each adult worker thorax ($n = 50$) using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instruction. Bees were collected from hives originally from the Northeast region of Brazil, in the states of Piauí (Elesbão Veloso city; $6^{\circ}11'56.2''S$ $42^{\circ}11'43.8''W$) and Maranhão (São Bento city; $2^{\circ}42'30.6''S$ $44^{\circ}50'18.9''W$). The extracted DNA samples were electrophoresed on 0.8 % agarose gel to test for overall quantity and quality of the DNA yield.

2.2 *Library preparation and NGSequencing*

A single individual with the highest quality DNA yield was selected for sequencing. DNA was quantified using a PicoGreen protocol and was run using a Perkin Elmer Fusion DNA Quantifier (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts). An Illumina paired-end library was created using 1 ng of genomic DNA, following the standard protocol of the Illumina Nextera XT Library Preparation kit (Illumina Inc., San Diego, CA). DNA was tagged and fragmented by the Nextera XT transposome, followed by limited-cycle PCR amplification, AMPure XP magnetic-bead purification (Agencourt Bioscience Corporation, Beverly, MA) and the Illumina Nextera XT bead-based normalization protocol. The DNA library was sequenced using a MiSeq Benchtop Sequencer (Illumina Inc., San Diego, CA). Contigs were created from the resulting paired-end sequence data (reads) using CLC Genomics Workbench 7.0.4 (Qiagen).

2.3 *Microsatellite loci search and primer design*

All these contigs were subsequently added directly into MSATCOMMANDER 0.8.2 [21] for detection of possible microsatellite loci with at least four repeats, except for dinucleotides (six repeats), and designing of primer pairs for each detected locus at their flanking regions. Long mononucleotide repeats were ignored for marker development. Primer design was performed with the Primer3 [22].

2.4 Microsatellite-PCR amplification for primer validation and genotyping

Genomic DNAs from 5 individuals were initially used to validate all designed primer pairs using polymerase chain reactions (PCRs). Reactions were performed in a 10 μ L total volume containing at least 10 ng of genomic DNA, with 1.25 to 1.5X buffer, 2 to 2.5 mM MgCl₂, 10 mM dNTP mix, 0.25 mM of each primer and 0.25 units of Taq DNA polymerase (Thermo Scientific Inc.) or HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen). All amplifications were run in a Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems) using the PCR temperature profile indicated in Table 1. The amplification products were screened by silver nitrate detection on denatured 6% polyacrylamide gels. Additional bee samples were genotyped from two different locations (Piauí and Maranhão), 25 individuals each, to obtain baseline allele frequency information.

2.5 Data analysis

The genotyped data was initially analyzed using Micro-Checker 2.2.3 [23] to test for the presence of null alleles, large alleles dropout and scoring errors by stuttering. Observed and expected heterozygosities (H_O and H_E), the number of alleles (N_a), and the polymorphic information content (PIC) were determined using CERVUS 3.0 [24]. Allelic richness (A_R) as a *measure* of the number of alleles per locus independent of population size was calculated by *FSTAT* version 2.9.3.2 [25]. Deviations from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and tests for linkage disequilibrium were conducted using Genepop software [26]. The Bonferroni correction [27] was applied when multiple pairwise tests were performed to assess the significance ($P < 0.05$).

The genetic diversity for each locus was evaluated by ARLEQUIN ver. 3.5 [28], which determined the value of θ (F_{ST}) for the whole sample set.

A Bayesian grouping admixture model was used to infer possible population structuring using the software STRUCTURE v2.3.3 [29]. The program was set up for 1,000,000 Markov chain Monte Carlo repetitions after an initial burn-in of 500,000 steps. The estimate of the best K was calculated based on 5 replications for each K (from 1 to 6) as described by Evanno et al. [30] using Structure Harvester v.0.6.92 [31]. The program CLUMPP v.1.1.2 [32] was used to align the five repetitions of the best K. The program DISTRUCT v.1.1 [33] was used to graphically display the results produced by CLUMPP. Population structure was also analyzed using principal coordinate analysis

(PCoA), R_{ST} [34], a measure of genetic differentiation analogous to F_{ST} , and the D_{est} estimator of actual differentiation [35] as implemented in GenAlEx v.6.5 [36].

Table 1

3. Results and discussion

3.1 Sequence assembly, microsatellite identification and primer design

The genomic library, which was previously loaded as 16 % of a MiSeq Reagent Kit v2 300 cycle sequencing run, produced 2,669,884 reads, which were assembled into 47,087 contigs. The program MSATCOMMANDER 0.8.2 [21] identified 9,954 contigs (11.3 % of total contigs) containing 11,869 microsatellite loci, being in majority mononucleotide (6,444) and dinucleotide (3,225) repeats. For ease of imaging and scoring, we chose to examine only tri- (734) and tetranucleotide (574) loci. From these, 37 loci were chosen for primer designing and validation.

3.2 Polymorphism and validation of genomic microsatellite markers

The Micro-Checker analysis of the *entire dataset* revealed null alleles for loci Mfsc3 and Mfsc11, at lower frequencies than 0.2 (Table 2). Null allele frequencies below 0.2 are acceptable in most microsatellite data sets [37]. When the dataset was divided into two populations (Piauí and Maranhão) only locus Mfsc3 indicated the presence of nulls, which may be a possible cause of its deviation from HWE in the Piauí population, even after Bonferroni's correction for multiple comparisons at the 5% significance level (critical value for $P > 0.0029$). No loci showed significant linkage disequilibrium after Bonferroni's correction.

PCR products of expected size with clear and *consistent bands* were obtained from 18 primer pairs, out of 37 tested on 50 individual bees from the two surveyed populations in Northeastern Brazil (Table 2). The proportion of markers that generated consistent amplicons within their expected sizes was 48.6 %. Expected product sizes for each microsatellite locus were based on sequence data from the partial genome assembly process. Seventeen microsatellite loci were polymorphic across the entire data set. However, few have revealed a monomorphic binding pattern at a population-level

analysis (Mfsc24 and Mfsc30 in Piauí and Mfsc3, Mfsc7, Mfsc13, Mfsc31 and Mfsc32 in Maranhão). Nevertheless, it is still expected that these loci may become polymorphic once again when additional individuals are sampled.

Table 2

The genotyping of the entire dataset has revealed 70 alleles, ranging from 1, for locus Mfsc34 to 10, for locus Mfsc17, with an average of 3.9 ± 2.7 alleles per locus (Table 1). This result was of similar magnitude to that found in other species within the same genus such as *M. rufiventris* [38], *M. seminigra merrillae* [39], *M. interrupta manaosensis* [40], *M. mondury* [41] and *M. yucatanica* [42]. The size of alleles in the least polymorphic locus (H_E and PIC), Mfsc31, ranged from 260 to 263 bp, while for the most polymorphic locus, Mfsc27, alleles varied from 205 to 227. These two loci (Mfsc31 and Mfsc27) were composed of trinucleotide motifs. As shown in Table 2, the level of polymorphism of each locus was also evaluated by the allelic richness (R) and the polymorphic information content (PIC). The values of allelic richness varied from 2 to 9.1 (average of 3.8 ± 2.4), while PIC values ranged between 0.108 and 0.714. Mean PIC (0.372 ± 0.198) characterize all microsatellite loci as reasonably informative markers, as defined by Botstein et al. [42]. Overall mean observed and expected heterozygosity was estimated to be 0.536 and 0.453, respectively. These estimates were higher when compared to most heterozygosities found for *Melipona* species, exception made for *M. subnitida* [19]. It is noteworthy that low levels of heterozygosity are known to occur in social Hymenoptera compared to other insects [43]. Nine microsatellite loci exhibited significant probabilities ($P < 0.05$) of departure from Hardy-Weinberg equilibrium, likely due to the mixing of individuals from populations of different allelic frequencies [44].

3.3 Exploratory analysis of the genetic diversity in *Melipona fasciculata*

Genetic diversity between *M. fasciculata* populations, as measured by the mean number of alleles per microsatellite locus, mean allelic richness, heterozygosity and PIC , was characterized by a slightly higher level of genetic variability from samples collected in Maranhão when compared to those sampled in Piauí (Table 2).

The high F_{ST} (0.194) and R_{ST} (0.230) estimates found in *M. fasciculata* suggest the existence of genetic structure. However, additional genetic surveys should be carried

out to confirm this observation. F_{IS} estimates for most loci were negative, indicating a trend towards an excess of observed heterozygosity. Similarly high F_{ST} estimates were reported in wild populations of *M. rufiventris* [45] and *M. beecheii* [46], with values of 0.25 and 0.280, respectively. D_{est} , which is a measure based on the proportion of alleles that are unique to a subpopulation [35], provides further evidence of population differentiation ($D_{est} = 0.162$). Low rates of dispersion and short flight distance, less than 2000 m, might have contributed to the levels of population differentiation [9, 47-48].

All these estimates reflect that gene exchange is not prevailing in these two *M. fasciculata* populations. Therefore, concerns should be addressed to the question of up to what level the destruction of native semiarid vegetation is influencing genetic drift or reduction of gene flow among *M. fasciculata* populations currently restricted to the remaining fragments of native forests.

The scatter-plot of the principal coordinates analysis (PCoA) showed a clear separation of the species in two distinct clusters of stingless bees, coincidental with the origin of the individuals. This analysis further confirmed the genetic differentiation of the two populations (Figure 1A). The analysis of microsatellite variation using the admixture model of STRUCTURE, at the first level of sub-population separation ($K = 2$), has also revealed two distinct clusters (Figure 1B). These clusters represent each sampling population separately, except for very few individuals mostly located in Piauí that appears to be admixed. Overall, analyses provide provisional evidence of significant population differentiation between Maranhão and Piauí. However, the data generated by this study should be further investigated using the same microsatellites markers, but larger sample size and more widespread sampling throughout the distribution of the species.

Fig. 1 A. Principal coordinates analysis of microsatellite variation in the stingless bee *Melipona fasciculata*. B. Genetic structure inferred using Bayesian analysis in the program STRUCTURE. Each individual is represented by a vertical line.

Given all these considerations, the eighteen isolated microsatellite loci have demonstrated strong potential for population-level genetic studies and can be used effectively as molecular tool to aid in the conservation of the species. Moreover, the results obtained from this exploratory analysis of the genetic diversity in *M. fasciculata*, with these molecular markers, support their use for conducting population genetics and landscape genetics studies.

Acknowledgments

Sequencing was conducted on a MiSeq DNA sequencer purchased with a bequest from Elizabeth Ann Nielsen to the Marine Gene Probe Laboratory. The authors acknowledge financial support from Embrapa Macroprograma2 grant (02.11.01.029.00.00) and the Brazilian Federal Government (Science without Borders program) scholarship. The authors are grateful to Mr. José Maria Vieira-Neto (*in memoriam*) for help in field collection.

References

1. Heard TA (1999) The role of stingless bees in crop pollination. *Annu Rev Entomol* 44(131):183–206.
2. Slaa EJ, Sánchez-Chaves LA, Malagodi-Braga KS, Hofstede FE (2006) Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie* 37(2):293–315.
3. Garibaldi LA, Steffan-Dewenter I, Winfree R, Aizen MA, Bommarco R, Cunningham SA et al. (2013) Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honeybee abundance. *Science* 339(6127):1608–1611.
4. Roulston TH, Goodell K (2011) The role of resources and risks in regulating wild bee populations. *Annu Rev Entomol* 56:293–312.
5. Winfree R, Aguilar R, Vazquez DP, LeBuhn G, Aizen MA (2009) A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. *Ecology* 90:2068–2076.
6. Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE (2010) Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends Ecol Evol* 25:345–353.
7. Brown MJF, Paxton RJ (2009) The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie* 40(3):410–416.
8. Silva GR, Pereira FM, Souza BA, Lopes MTR, Campelo JEG, Diniz FM (2014) Bioecological and behavioral genetic aspects involved in the conservation of the stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini) and the use of molecular tools in studies of diversity. *Arq Inst Biol* 81(3):299–308.
9. Silveira FA, Melo GAR, Almeida EAB (2002) Abelhas do Brasil: Sistemática e Identificação, first edition, Author's edition Belo Horizonte (Brazil), 253 p.
10. Cortopassi-Laurino M, Imperatriz-Fonseca VL, Roubik DW, Dollin A, Heard T, Aguilar IB, Venturieri GC, Eardley C, Nogueira-Neto P (2006) Global Meliponiculture: challenges and opportunities. *Apidologie* 37:1–18.
11. Nunes-Silva P, Hrcir M, Silva CI, Roldão YSO, Imperatriz-Fonseca VL (2013) Stingless bees, *Melipona fasciculata*, as efficient pollinators of eggplant (*Solanum melongena*) in greenhouses. *Apidologie* 44(5):537–546.
12. Oliveira PS, Müller RCS, Dantas KDGF, Alves CN, Vasconcelos MAMD, Venturieri GC (2012) Phenolic acids, flavonoids and antioxidant activity in honey of *Melipona fasciculata*, *M flavolineata* (Apidae, Meliponini) and *Apis mellifera* (Apidae, Apini) from the Amazon. *Quim Nova* 35:1728–1732.
13. Dutra RP, Abreu BVB, Cunha MS, Batista MCA, Torres LMB, Nascimento FRF, Ribeiro MNS, Guerra RNM (2014) Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *J Agri Food Chem* 62:2549–2557.

14. Liberio SA, Pereira ALA, Dutra RP, Reis AS, Araújo MJAM, Mattar NS, Silva LA, Ribeiro MNS, Nascimento FRF, Guerra RNM, Monteiro-Neto V (2011) Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complement Altern Med* 11:108.
15. Goldstein DB, Schlötterer C (1999) *Microsatellites: evolution and applications* Oxford University Press, Oxford
16. Wan QH, Wu H, Fujihara T, Fang SG (2004) Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis* 25(14):2165–2176.
17. Mardis ER (2008) The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet* 24, 133–141
18. Zalapa JE, Cuevas H, Zhu H, Steffan S, Senalik D, Zeldin E, McCown B, Harbut R, Simon P (2012) Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. *Am J Bot* 99(2):193–208.
19. Souza IGB, Paterson I, McBride MC, Souza BA, Pereira FM, Lopes MTR, Bentzen P, Diniz FM (2015) Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the stingless bee *Melipona subnitida* using next-generation sequencing. *Conserv Genet Resour* 7(1):239–241.
20. Park I, Kim J, Lee J, Kim S, Cho O, Yang K, Ahn J, Nahm S, Kim H (2013) Development of SSR markers by next-generation sequencing of Korean landraces of chamoe (*Cucumis melo* var. *makuwa*). *Mol Biol Rep* 40(12):6855–6862.
21. Faircloth B (2008) Msatcommander: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Mol Ecol Res* 8:92–94.
22. Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers In: Krawetz, S, Misener, S (Eds), *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365–386.
23. van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538.
24. Kalinowski ST, Taper ML, Marshal TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16:1099–1106.
25. Goudet J (1995) FSTAT Version 2932: a computer program to calculate F-statistics. *J Hered* 86: 485–486.
26. Raymond M, Rousset F (1995) An exact test for population differentiation *Evolution* 49: 1280–1283.
27. Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223–225.
28. Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite v 35: a new series of programs to perform population genetic analysis under Linux and Windows. *Mol Ecol Res* 10:564–567.
29. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2):945–959.
30. Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620.
31. Earl DA, VonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4:359–361.
32. Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23:1801–1806.

33. Noah AR (2004) Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes* 4: 137–138.
34. Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139:457–462.
35. Jost L (2008) GST and its relatives do not measure differentiation *Mol Ecol* 17(18):4015–4026.
36. Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 65: Genetic analysis in Excel Population genetic software for teaching and research: An update. *Bioinformatics* 28:2537–2539.
37. Dakin EE, Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93:504–509.
38. Lopes DM, Silva FO, Salomão TMF, Campos LAO, Tavares MG (2009) Microsatellite loci for the stingless bee *Melipona rufiventris* (Hymenoptera, Apidae). *Mol Ecol Res* 9:923–925.
39. Francini IB, Sforça DA, Sousa ACB, Campos T, Cidade FW, Zucchi MI, Souza AP, Nunes-Silva CG, Carvalho-Zilse GA (2009) Microsatellite loci for an endemic stingless bee *Melipona seminigra merrillae* (Apidae, Meliponini) from Amazon. *Conserv Genet Resour* 1:487–490.
40. Francini IB, Sousa ACB, Sforça DA, Costa-Pinto MFF, Campos T, Nunes-Silva CG, Zucchi MI, Souza AP, Carvalho-Zilse GA (2010) Isolation and characterization of microsatellite loci in the stingless bee *Melipona interrupta manaosensis* (Apidae: Meliponini). *Conserv Genet Resour* 2:27–30.
41. Lopes DM, Silva FO, Fernandes-Salomão TM, Campos, LAO, Tavares MG (2010) A Scientific note on the characterization of microsatellite loci for *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* 41:138–140.
42. Botstein D, White RL, Skolnick M (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314–331.
43. Graur D (1985) Gene diversity in Hymenoptera. *Evolution* 39:190–199.
44. Templeton AR (2006) *Population Genetics and Microevolutionary Theory*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 705 p.
45. Tavares MG, Dias LAS, Borges AA, Lopes DM, Busse AHP, Costa RG, Fernandes-Salomão TM, Campos LAO (2007) Genetics divergence between populations of the stingless bee uruçú-amarela (*Melipona rufiventris* group, Hymenoptera, Meliponini): Is there a new *Melipona* species in the Brazilian state of Minas Gerais? *Gen Mol Biol* 30:667–675.
46. Quezada-Euan JJG, Paxton RJ, Palmer KA, Itza WJM, Tay WT, Oldroyd BP (2007) Morphological and molecular characters reveal differentiation in a Neotropical social bee, *Melipona beecheii* (Apidae: Meliponini). *Apidologie* 38:1–12.
47. Araújo ED, Costa M, Chaud-Netto J, Fowler HG (2004) Body size and flight distance in stingless bees (Hymenoptera: Meliponini): inference of flight range and possible ecological implications. *Braz J Biol* 64(3b):563–568
48. Duarte OMP, Gaiotto FA, Costa MA (2014) Genetic differentiation in the stingless bee, *Scaptotrigona xanthotricha* Moure, 1950 (Apidae, Meliponini): a species with wide geographic distribution in the Atlantic rainforest. *J Hered* 105(4):477–484.

Table 1 Characteristics of 18 microsatellite markers developed for *Melipona fasciculata*.

Locus	Primer sequence (5'-3')	Motifs repeats	Ta (°C)	Na	Size range (bp)	Reaction profile	GenBank accession no.
Mfsc3	F: GAGCGAGAGGGAGCAAGATA R: TAGTAACGTAATTCGCGCGAT	(AGAT) ₁₄	50	2	090-094	PCR _{STD}	KT730150
Mfsc7	F: TCTACCCATCTCTGTTTCTCTCC R: TCGCAGTTTCGTTGATTTTG	(ATCT) ₁₀	50	2	232-236	PCR _{STD}	KT730151
Mfsc10	F: AGTAGAACGATTTTCGAGAAC R: ACGAAGCCGTATGCTAA	(CTTT) ₁₀	43	2	148-160	PCR _{STD+HOT}	KT730152
Mfsc11	F: GGAAGGACGAGAGAATTC AAGA R: ATAGTCGTTTGTGCGGAGTGTA	(CTTT) ₁₀	50	5	170-186	PCR _{STD}	KT730153
Mfsc13	F: GCAGTAACGGTAGCAGTGGTG R: ACTCCTTTCTCCTTCTCGGTCT	(ACG) ₁₆	52	2	189-207	PCR _{STD}	KT730154
Mfsc14	F: AGTTGCAGCGTTTGTGAAATC R: GTGGGTTTCGAGATGTGTATAAG	(AGT) ₁₇	47-57	2	116-122	PCR _{TCD+HOT1}	KT730155
Mfsc17	F: ATTTTCTCAGTAAGCGAGTCCG R: CGACCTTGTTTCGTATAATAGCA	(ATT) ₁₇	50	10	142-187	PCR _{STD+HOT}	KT730156
Mfsc22	F: GTGACAATAATAGGAGGGAAATCG R: GAAGCTGGTACAGGTATCGGAG	(GAT) ₁₄	58-48	2	231-234	PCR _{TCD+HOT1}	KT730157
Mfsc23	F: ATTCGGCATCGGCGTTAT R: TTAGAGAAAGTTGTTGGACCCG	(CGT) ₁₄	48	3	243-261	PCR _{STD}	KT730158
Mfsc24	F: GTAGAGGAGTAGTAACAGCAA R: CGAGTCCCGTTAGC	(AGC) ₁₄	48	4	165-189	PCR _{STD}	KT730159
Mfsc27	F: CGTCTCCACCGTCTTCTATTTT R: GCGTGTCCCTCTCTTCTCTCTC	(AGC) ₁₃	50	6	205-227	PCR _{STD}	KT730160
Mfsc28	F: ATGATTCTCGCTTTCGTCGT R: GTGAGGAGACGCTGGATTTT	(AGC) ₁₃	52-62	5	160-184	PCR _{TCD+HOT2}	KT730161
Mfsc30	F: TCTATAAGCGCCAGAGAGGAAG R: TTTCAGGGATGCGCC	(ACG) ₁₂	50	3	186-192	PCR _{STD}	KT730162
Mfsc31	F: TGTGGTTCGCGGTTGC R: TCGCCGCTCGGAACT	(AAG) ₁₂	50	2	260-263	PCR _{STD}	KT730163
Mfsc32	F: GTTATCGTTATCGTCATCGTCGT R: CCGTGAGCGAACTCGAAC	(CGT) ₁₂	47-57	2	105-108	PCR _{TCD+HOT1}	KT730164
Mfsc34	F: AACTTTGAGGACGCACGAG R: CACTTCTTGTTTCGACTTGGTTG	(ACGA) ₁₂	53	1	109	PCR _{STD+HOT}	KT730165
Mfsc36	F: CGCCTACACCTAGAACCAAAA R: ACGTACACCGATGGCGTT	(AAAG) ₁₃	55	9	097-109	PCR _{STD}	KT730166
Mfsc37	F: GAAGGAAGGAAAGAGGCCG R: CCATTGCTACCCGTACTTC	(AAAG) ₁₀	55	8	103-119	PCR _{STD}	KT730167

Ta: Annealing temperature; **Na:** Number of alleles; **PCR_{STD}:** Standard PCR [94°C-1min; 40 ciclos (94°C-30seg; Ta-30seg; 72°C-30seg); 72°C-3min]; **PCR_{TCD+HOT1}:** Touchdown PCR with Hotstart Taq DNA polymerase = {95°C-15min; 10 ciclos [94°C-30seg; Ta1-30seg; 72°C-30seg]; 10 ciclos [94°C-30seg; Ta2(-1°C/cycles)-30seg; 72°C-30seg]; 25 ciclos [94°C-30seg; Ta1-30seg; 72°C-30seg]; 72°C-10min}; **PCR_{TCD+HOT2}:** Touchdown PCR with Hotstart Taq DNA polymerase = {95°C-15min; 10 ciclos [94°C-30seg; Ta1 (-1,0°C/cycle)-30seg; 72°C-30seg]; 25 ciclos [94°C-30seg; Ta2-30seg; 72°C-30seg]; 72°C-10min.

Table 2. Variability of 17 microsatellite loci and genetic diversity estimates in *Melipona fasciculata*.

Locus	All Individuals (n = 50)						Piauí (n = 25)						Maranhão (n = 25)						F _{ST}	R _{ST}	Dest
	A _R	H _O	H _E	PIC	pHWE	NAF	A	H _O	H _E	PIC	pHWE	Null	A	H _O	H _E	PIC	pHWE	Null			
Mfsc3	2.0	0.000	0.186	0.167	0.000*	0.156	2	0.000	0.423	0.325	0.000*	0.290	1	0.000	0.000	0.000	Mono	0.000	0.321	0.424	0.089
Mfsc7	2.0	0.353	0.295	0.248	0.556	-0.048	2	0.522	0.394	0.311	0.267	-0.098	1	0.000	0.000	0.000	Mono	0.000	0.189	0.396	0.079
Mfsc10	2.0	0.617	0.431	0.336	0.002*	-0.133	2	0.500	0.384	0.305	0.272	-0.091	2	0.720	0.470	0.355	0.008	-0.177	0.016	0.067	0.012
Mfsc11	4.9	0.326	0.646	0.570	0.000*	0.191	2	0.381	0.316	0.261	1.000	-0.056	4	0.280	0.409	0.376	0.012	0.086	0.601	0.158	0.873
Mfsc13	2.0	0.306	0.262	0.226	0.575	-0.037	2	0.625	0.439	0.337	0.055	-0.137	1	0.000	0.000	0.000	Mono	0.000	0.309	0.084	0.122
Mfsc14	2.0	0.378	0.504	0.373	0.184	0.079	2	0.357	0.516	0.374	0.318	0.094	2	0.391	0.507	0.730	0.404	0.070	-0.038	0.258	-0.039
Mfsc17	9.1	0.732	0.610	0.550	0.013	-0.081	5	0.611	0.571	0.501	0.038	-0.036	7	0.826	0.642	0.572	0.056	-0.122	0.003	0.103	0.004
Mfsc22	2.0	1.000	0.505	0.375	0.000*	-0.333	2	1.000	0.512	0.375	0.000*	-0.333	2	1.000	0.510	0.375	0.000*	-0.333	0.000	0.083	0.000
Mfsc23	3.0	0.864	0.574	0.494	0.000*	-0.189	3	0.762	0.547	0.469	0.056	-0.149	2	0.957	0.510	0.375	0.000*	-0.305	0.161	-0.019	0.207
Mfsc24	3.9	0.370	0.335	0.304	0.392	-0.029	1	0.000	0.000	0.000	Mono	0.000	4	0.680	0.528	0.457	0.276	-0.107	0.253	0.094	0.132
Mfsc27	5.9	0.979	0.762	0.714	0.000*	-0.129	3	1.000	0.532	0.406	0.000*	-0.315	5	0.960	0.731	0.668	0.014	-0.142	0.290	0.017	0.684
Mfsc28	4.8	0.732	0.556	0.509	0.132	-0.118	2	0.375	0.315	0.258	1.000	-0.054	4	0.960	0.626	0.546	0.000*	-0.215	0.182	0.351	0.209
Mfsc30	2.9	0.156	0.186	0.173	0.018	0.024	1	0.000	0.000	0.000	Mono	0.000	3	0.292	0.324	0.286	0.033	0.019	0.125	0.035	0.030
Mfsc31	2.0	0.073	0.116	0.108	0.120	0.037	2	0.188	0.272	0.229	0.305	0.060	1	0.000	0.000	0.000	Mono	0.000	0.164	0.333	0.023
Mfsc32	2.9	0.362	0.334	0.288	0.000*	-0.024	3	0.773	0.538	0.427	0.000*	-0.162	1	0.000	0.000	0.000	Mono	0.000	0.400	0.062	0.226
Mfsc36	8.3	1.000	0.746	0.700	0.000*	-0.151	3	1.000	0.613	0.516	0.000*	-0.252	9	1.000	0.817	0.775	0.000*	-0.111	0.051	0.209	0.137
Mfsc37	7.4	0.872	0.664	0.601	0.000*	-0.130	2	0.727	0.474	0.356	0.017	-0.181	8	1.000	0.783	0.734	0.000*	-0.132	0.082	0.131	0.151
Mean	4.1	0.536	0.453	0.396			2.3	0.519	0.403	0.321	-	-	3.4	0.533	0.403	0.367	-	-	0.194	0.230	0.162

A_R: Allelic richness; **A**: Number of alleles within population; **H_O**: Observed heterozygosity; **H_E**: Expected heterozygosity; **PIC**: Polymorphic Information Content; **pHWE**: probabilities of departure from Hardy-Weinberg equilibrium; **NAF**: Null alleles frequency. *Locus that deviated significantly from HWE after Bonferroni correction (adjusted critical P < 0.0031).

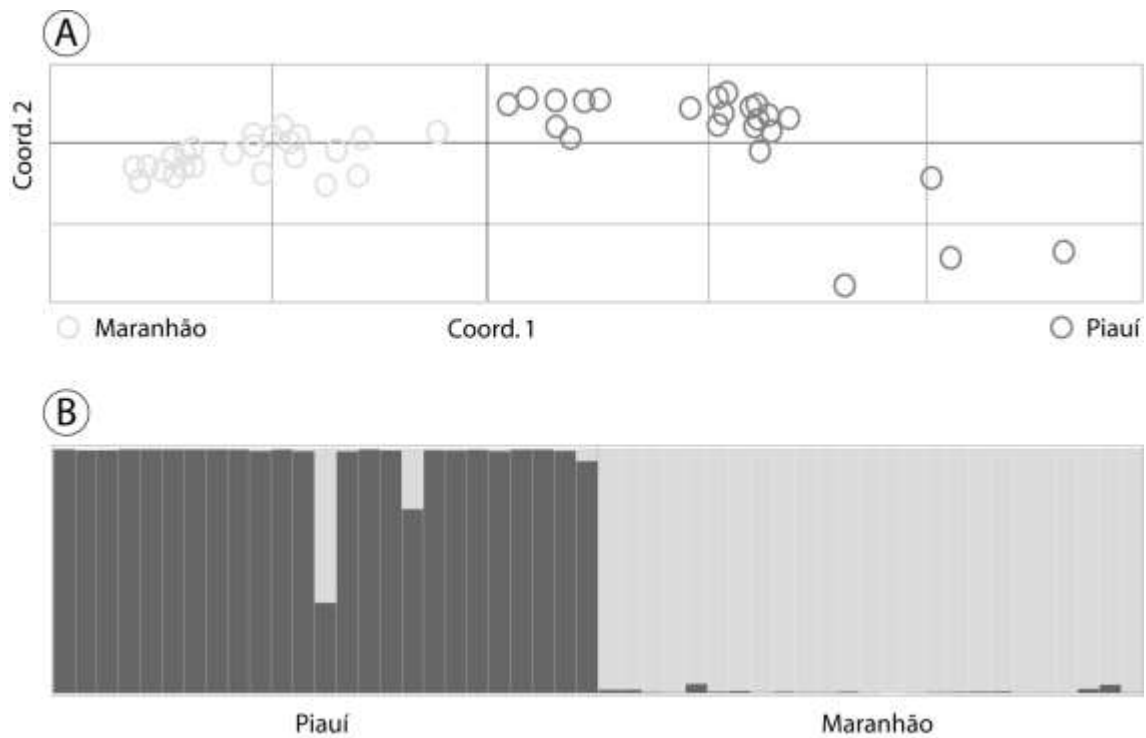


Figure 1. A. Principal coordinates analysis of microsatellite variation in the stingless bee *Melipona fasciculata*. B. Genetic structure inferred using Bayesian analysis in the program STRUCTURE. Each individual is represented by a vertical line.