



ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DA ABELHA TIÚBA ORIUNDAS DE MUNICÍPIOS DO MARANHÃO, BASEADA NO MARCADOR mtDNA

RÔMULO NUNES SOUSA; JOSÉ DE RIBAMAS SILVA BARROS; GABRIEL GARCÊS
SANTOS

RESUMO

Introdução: A meliponicultura é uma atividade desenvolvida desde antes da colonização do Brasil, onde os indígenas faziam o manejo de abelhas nativas sem ferrão. Esta atividade ao longo dos anos foram adotadas por pequenos agricultores, visando a economia e também seus produtos como pólen, mel e própolis. A meliponicultura tem suma importância para o ecossistema, pois insetos polinizadores como as abelhas geram reprodução de diversas espécies de plantas, além de ser uma atividade que pode ser pauta transversal na educação ambiental nas comunidades e escolas. **Justificativa:** Atualmente estudos voltados a genética da conservação vem crescendo, gerando dados importantes na preservação de espécies nativas, e no Maranhão estudos voltados a *Melipona fasciculata* são pouco explorados, tendo em vista a diminuição da população de abelhas no mundo é necessário um levantamento da diversidade de abelhas Tiúba nativa do estado do Maranhão. **Objetivos:** Analisar a composição nucleotídica, comparar a similaridade das amostras com a do banco de dados Genbank e construir rede de haplótipos. **Métodos:** Foram feitas coletas de amostras dos municípios de Barra do Corda, Chapadinha e São Bento, para estudos da diversidade genética. Posteriormente foram submetidas as amostras em PCR para verificação da amplificação da região COI, que foi possível obter nesta pesquisa, sendo a região ND2 sem resultados de amplificações, assim não sendo possível as análises desta região. Após o sequenciamento das 6 amostras da região COI, tivemos: 2 amostras de Barra do Corda, 1 de Chapadinha e 3 de São Bento. **Resultados:** Nas análises foi possível observar uma maior variabilidade genética dentro das populações e uma menor entre populações, com resultado de diferenciação genética moderada; com a rede de haplótipos foi possível observar que o haplótipo intermediário é oriundo do município de Barra do Corda. **Conclusões:** Ao final foi possível confirmar que a análise molecular a partir da região COI mtDNA culminou nas taxas taxonômicas de *Melipona fasciculata* de similaridade alta.

Palavras-chave: abelha sem ferrão; composição nucleotídica; rede de haplótipos; similaridade; Tiúba.

1 INTRODUÇÃO

Os meliponíneos, popularmente conhecido como abelhas sem ferrão, assumem um papel importante nos ecossistemas por meio da polinização (MORGADO et al., 2002). Estão agrupados na Classe Insecta, Hymenoptera, Superfamília Apoidea, Família Apidae, Subfamília Meliponinae, existindo duas tribos: Meliponini possui o gênero *Melipona*, onde está presente a *Melipona fasciculata*, conhecida popularmente como Tiúba, distribuída principalmente nos estados do Para e Maranhão (YAMAMOTO; OLIVEIRA;

GAGLIANONE, 2014).

O manejo de abelha sem ferrão, também conhecido como meliponicultura é uma atividade desenvolvida pelos indígenas, logo depois pequenos produtores rurais seguidos de médios produtores, e atualmente alcançando maior parte do território brasileiro devido a sua expansão na complementação da renda de muitas famílias. Esta renda está ligada aos produtos de atividades apícolas como: o mel utilizado bastante na indústria alimentícia; a própolis que é uma resina obtida a partir da cera, seiva das árvores e saliva de abelha; e a cera difundida na indústria de cosméticos (RIOS, 2018).

Estudos genéticos voltados para biologia de populações deve estar concentrado no uso de marcadores haplóides e/ou codominantes, devido ao fornecimento de dados mais robustos para as análises em relação a marcadores dominantes, dentre estes marcadores temos o DNA mitocondrial (mtDNA) que se encaixa na categoria (FRANCISCO, 2002). A redução populacional de espécies atinge diretamente a diversidade genética da mesma, por conta da fragmentação e redução do habitat, levando ao isolamento natural da espécie; gerando aumento na endogamia da população, deriva genética e perda da variabilidade genética. O sequenciamento de regiões do DNAm tem sido uma das metodologias mais aplicadas para a caracterização desse genoma e detecção da variabilidade genética entre populações ou espécies (FRANCISCO, 2008).

Devido ao declínio dos polinizadores, principalmente das abelhas em uma escala global ao longo dos anos. Estudos voltados para a conservação de espécies nativas como a *M. fasciculata* tem suma importância para o equilíbrio ecológico, além diversas contribuições no ramo da economia, da saúde e da educação ambiental (SANTOS, 2020). Diante disso, a necessidade de um programa afim de conservar as populações dessa abelha é crucial para os meliponicultores, baseado principalmente na sua biologia comportamental e genético, gerando maior expectativa econômica. Consequentemente, preservando a biodiversidade e os recursos naturais, além de possíveis futuros trabalhos em melhoramento genético. A pesquisa tem como objetivo o estudo da *Melipona fasciculata* por meio de análises da diversidade genética, por meio da análise do mtDNA de colmeias oriundas dos municípios de Barra do Corda, Chapadinha e São Bento.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos de armazenamento, extração e PCR, foram feitas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular Warwick Estevam Kerr – Labwick, situado no campus da Universidade Estadual do Maranhão em São Luís. A extração do material genético foi feita a partir do tórax das abelhas, baseada na metodologia adaptada da técnica descrita por Sambrook et al. (1989), de Fenol-Clorofórmio, onde o DNA genômico foi obtido a partir do mesossoma das abelhas coletadas. No processo foi retirada as asas, cabeça e metassoma, utilizou-se 1 (um) tórax de *M. fasciculata*, onde segundo Francisco (2002), as cabeças são retiradas para evitar contaminação das extrações com produtos glandulares e pigmentos dos olhos, pois tais contaminantes poderiam interferir no processo de digestão do DNA e na reação de PCR. As sequências e referências bibliográficas de cada primer (Tabela 1), assim como as condições específicas de PCR (Polymerase Chain Reaction), são apresentadas a seguir.

Tabela 1. Sequência da região COI.

Região	Primer	Sequência	Referência
COI	F	5' GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC 3'	Bonatti, 2012

R 5' CCCGGTAAAATTAAAATATAAACTTCC 3'

As condições de amplificação utilizadas para este trabalho foram: desnaturação inicial por 5 minutos a 94 °C, seguida por 35 ciclos de: desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento 42 °C por 1 minuto e elongação a 64 °C por 3 minutos. Extensão extra de 64 °C a 10 minutos e deixado à 4°C até ser retirado do equipamento. Após o sequenciamento as análises de alinhamento, correção e identificação de similaridade das sequências serão feitas no programa MEGA X v. 11.0 (KUMAR et al., 2018), pois possui diversas ferramentas como o CLUSTAL- W que possibilita o alinhamento múltiplo, com parâmetros de penalidades sugeridos por Schneider (2007). O arquivo gerado será então convertido para o formato Fasta e as sequências serão editadas no programa MEGA X, para inspeção visual do alinhamento produzido e possíveis correções na codificação das inserções ou deleções presentes; O BLAST é a ferramenta do programa MEGA X onde será utilizada para identificar similaridades entre as sequências obtidas e as disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para cada região gênica sequenciada serão analisados alguns índices de diversidade genética e estes parâmetros foram comparados entre os distintos genes. Utilizando os programas DnaSP v. 6 (ROZAS et al., 2017) e Arlequin v. 3.5.2.2 (EXCOFFIER et al., 2010) serão calculados os seguintes parâmetros de diversidade genética: diversidade haplotípica (Hd), que estima a probabilidade de amostrarmos dois haplótipos do total amostral e estes serem diferentes; diversidade nucleotídica (π), que representa o número médio de diferenças entre duas sequências (por sítio) retiradas ao acaso da amostra total, para cada população; índice de fixação (FST), índice de fixação para alelos por locus, ou seja, é a probabilidade de que 2 genes sejam homólogos, combinados ao acaso na população, ambos originários de um gene na população (WRIGHT, 1978); índice de fixação (FIS) índice de fixação que ocorre dentro de população, ou seja, é a probabilidade de que 2 genes sejam homólogos no indivíduo I derivado do mesmo gene de um ancestral comum dentro da população (WRIGHT, 1978); Análise Hierárquica de Variância Molecular (AMOVA), para verificar a homogeneidade de um conjunto de dados, identificando assim se esta variabilidade é estruturada entre grupos, subgrupos ou organizada dentro dos indivíduos.

A rede de haplótipos será construída no programa NETWORK v. 4.6 (ENGINEERING, 2017), utilizando o algoritmo Median Joining, pois permite identificar os haplótipos relacionados que estão mais próximos. O dendograma será construído tendo como base nas distancias genéticas, pelo método de Neighbor Joining, utilizando o programa MEGA X (KUMAR et al., 2018).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As edições tiveram fragmentos de 112 pb, nos quais oito sítios variáveis foram encontrados, resultado de amplificação abaixo do encontrado por Bonatti *et al.* (2014) onde obteve 446 pb para abelha *M. subnitida* no sequenciamento da região COI após as edições. A composição nucleotídica foi de A = 34,34%, C = 17,38%, G = 7,59, T = 40,69% (Tabela 2), podendo ser observado uma maior quantidade de bases A e T, conforme esperado em genomas mitocondriais de insetos (CROZIER; CROZIER, 1993; SIMON *et al.*, 1994).

Tabela 2. Composição nucleotídica do sequenciamento.

Composição Nucleotídica
T = 40,69%
A = 34,34%

G = 7,59%

C = 17,38

Total: 100%

As amostras foram comparadas com sequências de *M. fasciculata* disponíveis no NCBI GenBank, sendo possível averiguar a porcentagem de similaridade da região COI das sequências amplificadas disponíveis (Tabela 3), foi encontrado apenas um dado sobre *M. fasciculata* da região mitocondrial no estado do Piauí, sendo esta ainda parcialmente sequenciada. É notório que as sequências do município de São Bento possuem maior similaridade, enquanto o município de Chapadinha apresenta menor similaridade em relação a amostra do Piauí.

Tabela 3. Identificação molecular das sequências obtidas de *M. fasciculata*.

Morfologia	Molecular	Localidade	Código	Similaridade (%)
<i>M. fasciculata</i>	<i>M. fasciculata</i>	Barra do Corda	BDC 2 (S2)	90,91%
<i>M. fasciculata</i>	<i>M. fasciculata</i>	Barra do Corda	BDC 3 (S3)	93,58%
<i>M. fasciculata</i>	<i>M. fasciculata</i>	Chapadinha	CHA 7 (C7)	90,48%
<i>M. fasciculata</i>	<i>M. fasciculata</i>	São Bento	SB 1 (S1)	96,43%
<i>M. fasciculata</i>	<i>M. fasciculata</i>	São Bento	SB 2 (S2)	96,43%
<i>M. fasciculata</i>	<i>M. fasciculata</i>	São Bento	SB 3 (S3)	96,43%

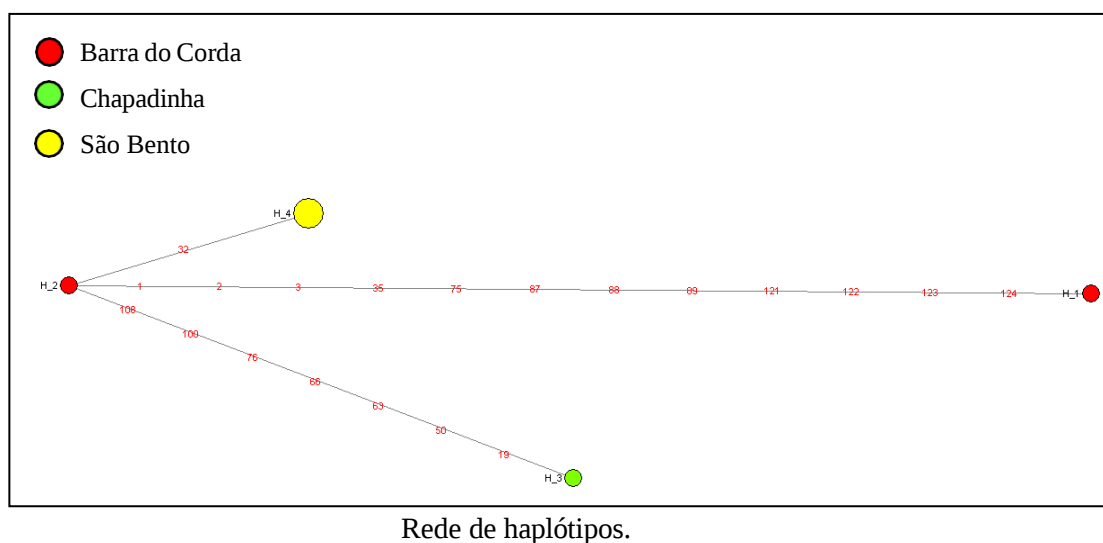
As populações de *M. fasciculata* nos municípios de Barra do Corda, São Bento e Chapadinha foram observados sítios polimórficos (S), haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd) e nucleotídica (π). O número de sítios polimórficos das sequências obtidas foram de 14 (S), sendo ao todo 4 haplótipos (h) gerados no programa *NEWTWORK* (Figura 1), a diversidade nucleotídica só foi possível para a população de Barra do Corda e para o conjunto de amostras (Tabela 4). A Hd foi 1,000 para o município de Barra do Corda com a média interpopulacional de 0,800; a diversidade nucleotídica (π) em Barra do Corda foi de 0,528 sendo a média interpopulacional de $\pi = 0,041$ foram de 0,041. Segundo Bonatti (2012), essa elevada diversidade haplotípica (Hd) indica que, mesmo ocorrendo degradação de habitats dessas abelhas nativas, sua variabilidade genética encontra-se alta.

Tabela 4. Diversidade genética da população de Barra do Corda e do total das populações.

Populações	N	S	h	k	Índice de diversidade molecular	
					Hd	π
Barra do Corda	2	64	2	64	1,000	0,528
População total	6	4	4	5	0,800	0,041

(N) número de indivíduos; (S) número de sítios polimórficos; (h) número de haplótipos; (k) número médio de diferença; (Hd) diversidade haplotípica; (π) diversidade nucleotídica.

A rede de haplótipos sugere que a sequência de Barra do Corda (h2) é a amostra intermediária entre os haplótipos de São Bento e Chapadinha, visto geograficamente seria impossível que ambos os municípios estão em média cerca de 264 quilômetros de distância. Isso nos remete a verificar que de alguma forma está havendo fluxo gênico com as populações de *M. fasciculata*, e sendo a população de Barra do Corda dando origem as populações de Chapadinha e São Bento, segundo Holanda (2015), a região do cerrado maranhense tem sido bastante difundida à atividade de criação de abelha sem ferrão, com as espécies Tubi (*Scaptotrigona aff. postica*) e Tiúba (*M. fasciculata*), isso pode indicar que a comercialização de ninhos de abelhas nativas está sendo propagada para estes municípios, sendo uma forma delas estarem compartilhando genes com os outros municípios.



Foram observadas mutações nas sequências proteicas gerada para todos os haplótipos (Figura 2), sendo comparada a sequência aminoácidos entre *M. fasciculata* obtidas na pesquisa com a de *M. fasciculata* oriunda de Teresina (PI), é notório observar variações na sequência proteica (Figura 2), essas diferenças observadas nas sequências de aminoácidos indicam e identificam organismos de categoria taxonômica mais elevada (HEBERT *et al.* 2003).

[illegible]

Na AMOVA, é observado os seguintes resultados de estruturação genética (Tabela 5), temos uma maior diversidade genética dentro de populações com 88,66% e menor diversidade entre populações com 11,34%, para o índice de F_{st} (Φ) foi obtido o valor de 0,1135; para interpretação destes dados temos: de 0 a 0,05, pouca diferenciação genética; de

0,05 a 0,15, diferenciação moderada; de 0,15 a 0,25, grande diferenciação genética; e valores acima de 0,25 significam alta diferenciação genética Wright (1978) propôs a interpretação dos valores do F_{st} , onde: de 0 a 0,05. Desse modo, as populações de *M. fasciculata* de estudo apresentam moderada diferenciação genética, assim dizendo, moderada estruturação genética, segundo Bonatti (2012) em sua pesquisa com *M. subnitida*, obteve resultados diferentes onde consta que 61,9% foi entre populações e 38,1% dentro de população, sendo seu F_{st} de 0,61898, considerado alto.

Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) baseada nas sequências da região COI de *M. fasciculata*.

Componente da variação	% total	Variação	Φ	p=valor
Interpopulacional	11,34%	1,37	0,1135	0,1857
Intrapopulacional	88,66%	10,37		

4 CONCLUSÃO

Por meio da identificação molecular de *Melipona fasciculata* obtidas a partir da análise da região COI do mtDNA confirmou-se a taxonomia de *M. fasciculata* devido ao índice alto de similaridade. A maior variabilidade genética foi observada na dentro da população. Houve compartilhamento de haplótipos entre as populações, indicando a ocorrência de fluxo gênico entre elas. Por meio da diversidade genética foi observado que Barra do Corda possui maior variabilidade. Este estudo possibilitou identificar o comportamento genético das populações da abelha Tiúba nestes municípios.

REFERÊNCIAS

BONATTI, Vanessa. **Caracterização genético-morfológica de populações de *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) no nordeste brasileiro**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

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 viability and geometric morphometrics of forewings. *Naturwissenschaften*, v. 101, p. 17-24, 2014.

CROZIER, R. H.; CROZIER, Y. C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*, v. 133, n. 1, p. 97-117, 1993.

ENGINEERING, F. Phylogenetic Network Software. 2017. Disponível em: <<https://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>>.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resource**. v. 10, p. 564-567, 2010.

FRANCISCO, F. O. **Diversidade Genética de Populações da Abelha sem Ferrão *Plebeia remota*: Análise do DNA Mitocondrial e Microssatélites**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. SP. 140 p.. 2002.

FRANCISCO. F. O. **Estrutura genética de populações insulares e continentais de abelhas da Mata Atlântica**. Projeto de pesquisa apresentado ao Comitê Técnico Científico (CTC) do Instituto Ambiental do Paraná. São Paulo. 22 p. 2008.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; WAARD, J. R. de. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

HOLANDA, Carlos Alexandre et al. Qualidade e estimativa do tempo de consumo do Mel de Tiúba (*Melipona fasciculata* Smith) produzido na região do cerrado maranhense. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 6, p. 53-64, 2015.

KUMAR, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, Oxford, v.35, p.1547-1549. 2018.

MORGADO. L. N.; CARVALHO. C. F.; SOUZA. B.; SANTANA. M. P. Fauna de Abelhas (HYMENOPTERA: APOIDEA) nas Flores de Girassol *Helianthus annuus* L. em Lavras – MG. **Ciência e agrotecnologia**. v. 26. n. 6. p. 1167-1177. 2002.

RIOS. Bruna Dias. **Genotipagem de colônias de abelha ameaçada de extinção indica importância genética de populações manejadas para a conservação de melipona capixaba**. 2018.

ROZAS, J., SÁNCHEZ-DELBARRIO, J.C., MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v. 19, p. 2496- 2497, 2003.

SAMBROOK. J.; FRITSCH. E.F.; MANIATS. T. Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. **Cold Spring Harbor Laboratory**. 1989.

SANTOS. Gabriel Garcês et al. A Meliponicultura atua na conscientização ambiental e incrementa a renda de comunidades carentes no Maranhão. **Brazilian Journal of Development**. v. 6. n. 8. p. 63578-63585. 2020.

SCHNEIDER, H. Método de Análise Filogenética: Um Guia Prático. 3. ed. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2007. 200 p.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 87, n. 6, p. 651-701, 1994.

TAKAHASHI, K.; TERAII, Y.; NISHIDA, M.; OKADA, N. Phylogenetic relationships and ancient incomplete lineage sorting among cichlid fishes in lake Tanganyika as revealed by analysis of the insertion of retroposons. *Molecular Biology and Evolution* v.18, n.11, p. 2057– 2066, 2001.

WRIGHT, S. *Evolution and Genetics of Populations: Variability within and among Natural Populations*. Chicago: University of Chicago Press, 1978. 465 p.

YAMAMOTO. M.; OLIVEIRA. P. G.; GAGLIANONE. M. C. Uso sustentável e restauração da diversidade dos polinizadores autóctones na agricultura e nos ecossistemas relacionados: planos de manejo. **Rio de Janeiro. Funbio**. 2014.