

**Diversidade genética da abelha sem ferrão *Melipona*  
*quinquefasciata* baseada no seqüenciamento das regiões  
ITS1 parcial e 18S do DNA ribossômico nuclear.**

**Júlio Otávio Portela Pereira**

**FORTALEZA - CEARÁ**

**2006**

Diversidade genética da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata* baseada no seqüenciamento das regiões ITS1 parcial e 18S do DNA ribossômico nuclear.

Júlio Otávio Portela Pereira

---

TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - CEARÁ

2006

Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários a obtenção do Grau de Doutor em Zootecnia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

---

Júlio Otávio Portela Pereira

Tese aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

---

Breno Magalhães Freitas – Ph.D

Orientador

---

Thalles Barbosa Grangeiro - D.Sc.

Conselheiro

---

Antonio Alves Tavares – D.Sc

Conselheiro

---

Márcia de Fátima Ribeiro – Ph.D

Conselheira

---

Raimundo Maciel Sousa - D.Sc.

Conselheiro

A Deus, e à Virgem Santíssima, por todas as graças concedidas.

Aos meus pais José de Ribamar Pereira e Maria Celina Portela Pereira pelo maior dos ensinamentos, “a família”.

À minha amada esposa Masu Capistrano Camurça Portela, meu filho Júlio Otávio Camurça Portela (Julinho), e pelos nossos outros filhos que Deus mandar, que são em resumo a minha vida.

Aos meus irmãos Marcelo Portela Pereira e Marcely Portela Pereira de Alencar, e suas recém criadas famílias, pelo apoio incondicional, em todos os momentos.

Ao meu eterno amigo e torcedor, o querido Padre João De Vries (*in memorian*). Muito obrigado.

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

A realização do presente trabalho não seria possível sem a participação de várias pessoas e instituições, às quais agradeço:

À Universidade Federal do Ceará, através do Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, no estado do Ceará representado pelo Curso de Pós-Graduação em Zootecnia do Departamento de Zootecnia, pela possibilidade da realização da presente tese de doutoramento.

Ao Professor Breno Magalhães Freitas, pelos ensinamentos, orientação responsável e determinada, e principalmente pela amizade construída.

Ao Professor Thalles Barbosa Grangeiro pelo apoio e utilização do Laboratório de Citologia e Biologia Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

Aos demais professores componentes de minha banca de defesa, Professora Márcia de Fátima Ribeiro, Professor Antonio Alves Tavares e Professor Raimundo Maciel Sousa, pelas importantes contribuições apresentadas.

Ao Professor Paulo Nogueira Neto, pelo apoio e fornecimento da amostra de Luziânia, Goiás.

Ao engenheiro agrônomo e apicultor Francisco das Chagas Ribeiro Filho, “Chicão”, pelo fornecimento das amostras de Canto do Buriti, Piauí.

Ao meu querido Tio Bernardo, pela grande ajuda durante a coleta de amostras na Chapada da Ibiapaba.

Aos amigos e colegas Hélio Machado e Messias Oliveira, pelos valiosos conselhos e apoio incondicional.

À CAPES, pela bolsa de estudos que me possibilitou realizar o presente curso.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto de tese, edital universal 01/2002, processo número 521946/96-4.

Aos colegas do Departamento de Zootecnia, principalmente aos abelhudos: Eva, Everton, Darci, Ednir, Társio, Rômulo, Marcelo, Igor, Isac, Thiago, Patrícia e Michelle.

Aos colegas do Departamento de Biologia, Márcio, Cândida, Tuana, Denise, Lili, Wal e em especial aos amigos Daniel Jorge, Carlos Eduardo e Davi Coe pela paciência e valiosa ajuda, na construção desta tese.

A todos que, participaram direta ou indiretamente da construção e êxito deste trabalho.

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	4
RESUMO.....	14
ABSTRACT .....	16
1. INTRODUÇÃO .....	18
2. OBJETIVOS .....	22
3. HIPÓTESES.....	23
4. REVISÃO DE LITERATURA .....	24
4.1. Abelhas do gênero <i>Melipona</i> .....	24
4.1.1. Classificação .....	24
4.1.2. Biodiversidade de abelhas no Brasil .....	26
4.1.3. <i>Melipona</i> .....	29
4.2. <i>Melipona quinquefasciata</i> .....	30
4.2.1. “Descoberta” da <i>Melipona quinquefasciata</i> no estado do Ceará.....	31
4.3. Biologia molecular de abelhas.....	34
4.3.1. Evolução nas seqüências de DNA .....	34
4.3.2. Alinhamento e busca por homologias .....	35
4.3.3. O DNA ribossômico nuclear .....	37
4.3.4. Banco de dados .....	41
4.3.5. Buscas em bancos de dados .....	42
4.3.6. Biologia molecular em espécies do gênero <i>Melipona</i> .....	44
4.3.6.1. Caracterização de populações .....	45
4.3.6.2. Caracterização de espécies e filogenia .....	47
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
5.1. Localização dos experimentos / locais de coleta.....	51
5.1.1. Chapada do Araripe, Ceará.....	51

5.1.2. Chapada da Ibiapaba, Ceará .....	51
5.1.3. Cidade de Canto do Buriti, Piauí .....	52
5.1.4. Cidade de Luziânia, Goiás .....	52
5.2. Coleta das abelhas.....	52
5.3. Isolamento do DNA genômico.....	60
5.4. Eletroforese de DNA em gel de agarose a pH neutro .....	62
5.5. Amplificação do gene do rRNA 18S por reação em cadeia da DNA polimerase (PCR).....	63
5.6. Amplificação do gene do rRNA ITS1 parcial por reação em cadeia da DNA polimerase (PCR).....	66
5.7. Seqüenciamento de DNA.....	68
5.8. Análise dos dados .....	69
5.9. Montagem das seqüências consenso .....	70
5.10. Alinhamento múltiplo e edição das seqüências.....	72
5.11. Teste do Modelo (Model test e DAMBE) .....	73
5.12. Análises Filogenéticas.....	73
5.13. Teste de Mantel.....	74
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
6.1. Região 18S.....	75
6.1.1. Extração de DNA genômico .....	75
6.1.2. Amplificação da região 18S do nrDNA.....	77
6.1.3. Seqüenciamento do rDNA 18S (SSU rRNA) e obtenção das seqüências consenso .....	81
6.1.4. Alinhamento múltiplo de seqüências .....	82
6.1.5. Análise do conteúdo GC.....	83
6.1.6. Análises de agrupamento.....	84
6.1.7. Matriz de distância .....	85
6.1.8. Árvore filogenética.....	86
6.1.9. Teste de Mantel para Região 18S.....	88
6.2. Região ITS1 parcial.....	90

6.2.1. Extração de DNA genômico .....	90
6.2.2. Amplificação da região ITS1 completa do nrDNA .....	90
6.2.3. Seqüenciamento do rDNA ITS1 parcial e obtenção das seqüências consenso .....	92
6.2.4. Alinhamento múltiplo de seqüências .....	94
6.2.5. Análise do conteúdo GC.....	97
6.2.6. Análises de agrupamento.....	97
6.2.7. Matrizes de distância genética e identidade genética das amostras seqüenciadas .....	99
6.2.8. Árvore filogenética.....	101
6.2.9. Teste de Mantel para Região ITS1 parcial .....	104
7. CONCLUSÕES .....	106
8. SUGESTÕES PARA NOVAS PESQUISAS .....	107
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	108
10. ANEXOS .....	122
10.1. Seqüências consenso da região 18S .....	122
10.2. Seqüências consenso da região ITS1 parcial .....	128
10.3. Alinhamento das seqüências obtidas para região 18S.....	131
10.4. Alinhamento das seqüências obtidas para região ITS1 parcial .....	135

## ÍNDICE DAS TABELAS

Tabelas	Página
01. Número de gêneros de abelhas brasileiras revisadas ao longo das últimas cinco décadas e número de espécies incluídas nesses gêneros.	27
02. Histórico das coletas de amostras de <i>Melipona quinquefasciata</i> , nos estados do Ceará, Piauí e Goiás.	58
03. Nome, seqüência dos oligonucleotídeos e sentido do anelamento utilizados para amplificação da região-alvo rDNA 18S.	64
04. Constituintes e volumes utilizados na preparação das reações de PCR para amplificação do seguimento do rDNA 18S.	65
05. Condições de amplificação da região do rDNA 18S, programa “abelha”.	66
06. Nome, seqüência do oligonucleotídeo e sentido do anelamento utilizado para amplificação da região-alvo rDNA ITS1.	67
07. Constituintes e volumes utilizados na preparação das reações de PCR para amplificação do seguimento parcial do rDNA ITS1.	67
08. Condições de amplificação da região do rDNA ITS1 parcial, programa “abelha”.	68
09. Concentração das amostras de DNA genômico obtidas de espécimes de <i>Melipona quinquefasciata</i> coletados em diferentes localidades dos estados do Ceará e Goiás.	77
10. Dados gerais sobre as amostras escolhidas para estudo da região rDNA 18S das abelhas <i>Melipona quinquefasciata</i> .	78
11. Relação das seqüências obtidas da região do rDNA 18S (SSU rRNA) das amostras estudadas, mostrando seus respectivos tamanhos em pares de bases e conteúdo G + C (Guanina + Citosina) e composição nucleotídica.	82
12. Características do alinhamento das seqüências do rDNA 18S (SSU rRNA) estudadas.	84

13. Resultados do teste do modelo, utilizando o programa *ModelTest*, para os dados das seqüências do rDNA 18S (SSU rRNA). 85
14. Matriz de distância genética (região 18S) para *Melipona quinquefasciata* coletada em seis localidades dos estados do CE, PI e GO, gerada a partir do modelo de Jukes-Cantor. 86
15. Matriz de dissimilaridade da distância geográfica para *Melipona quinquefasciata* coletadas em seis localidades, valores expressos em km. 89
16. Teste de Mantel para a comparação entre distância geográfica e dissimilaridade genética para região 18S da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata* coletada de 6 localidades das regiões Nordeste e Centro-oeste do Brasil. 89
17. Dados gerais sobre as amostras escolhidas para estudo da região rDNA ITS1 parcial das abelhas *Melipona quinquefasciata*. 91
18. Relação das seqüências obtidas da região do rDNA ITS1 parcial das amostras estudadas, mostrando seus respectivos tamanhos em pares de bases e conteúdo G + C (Guanina + Citosina) e composição nucleotídica. 94
19. Características do alinhamento das seqüências obtidas do rDNA ITS1 parcial estudadas. 98
20. Resultados do teste do modelo, utilizando o programa *ModelTest*, para os dados das seqüências do rDNA ITS1. 98
21. Matriz de distância genética (região ITS1 parcial) para *Melipona quinquefasciata* coletada em nove locais, gerada pelo método de Jukes-Cantor. 99
22. Matriz de Identidade genética (região ITS1 parcial) para *Melipona quinquefasciata* coletada em nove locais. 99
23. Matriz de dissimilaridade da distância geográfica para *Melipona quinquefasciata* coletadas em nove locais, valores expressos em quilômetros. 105

24. Teste de Mantel para a comparação entre distância geográfica e dissimilaridade genética para região ITS-1 de *Melipona quinquefasciata* coletada em 9 localidades das regiões Nordeste e Centro-oeste do Brasil.

105

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
01. Estados Brasileiros onde se conhece a presença da <i>Melipona quinquefasciata</i> .	32
02. Início da escavação da colônia de <i>Melipona quinquefasciata</i> .	33
03. Túnel de acesso à colônia de <i>Melipona quinquefasciata</i> .	33
04. Quebra do perfil de pedras, para atingir a colônia de <i>Melipona quinquefasciata</i> .	33
05. Retirada de areia, para atingir a colônia de <i>Melipona quinquefasciata</i> .	33
06. Localização da colônia de <i>Melipona quinquefasciata</i> .	33
07. Transferência da colônia de <i>Melipona quinquefasciata</i> , para caixa de transporte.	33
08. Representação esquemática do DNA ribossômico nuclear (nrDNA). ETS ( <i>External Transcribed Spacer</i> ), NTS ( <i>Non Transcribed Spacer</i> ) e ITS ( <i>Internal Transcribed Spacer</i> ). Em destaque as regiões investigadas neste trabalho (i.e., 18S e ITS1).	39
09. Localidades de coleta das amostras de <i>Melipona quinquefasciata</i> nos estados do Ceará, Piauí e de Goiás.	53
10. Identificação cartográfica dos locais de coleta das amostras seqüenciadas de <i>Melipona quinquefasciata</i> no estado do Ceará.	54
11. Ação antrópica, causando impacto sobre as colônias remanescentes de <i>Melipona quinquefasciata</i> .	55
12. Coleta da amostra de <i>Melipona quinquefasciata</i> , com rede entomológica na entrada do ninho.	57
13. Coleta de amostras, escavação e registro por GPS da colônia de <i>Melipona quinquefasciata</i> .	57
14. Tubo tipo Falcon, usado para transporte e armazenamento após a coleta das amostras.	57
15. Depósito no Museu do Grupo de Pesquisa com abelhas da UFC.	61

16. Retirada do tórax da abelha para extração do DNA. 61
17. Aplicação do DNA extraído, para eletroforese. 61
18. Esquema da organização dos genes rDNA em eucariontes. ETS – “external transcribed spacer”, ITS – “internal transcribed spacer” e NTS – “nontranscribed spacer”. 63
19. Representação esquemática do anelamento dos oligonucleotídeos nas suas respectivas regiões rDNA 18S ou gene do rRNA SSU. 65
20. Visualização através do programa Consed das montagens das seqüências consenso realizadas pelo pacote de programas Phred e Phrap. 71
21. Eletroforese em agarose a 0,8% na presença de EtBr a 0,5µg/ml visualizado em UV, DNA extraído. 76
22. Eletroforese em gel de agarose a 1% em presença de EtBr a 0,5µg/ml do produto de PCR da região 18S das amostras de *Melipona quinquefasciata*. 79
23. Cladograma agrupando as seqüências obtidas. Árvore consenso obtida a partir do método NJ com *bootstrap* de 500 replicações. 86
24. Eletroforese em agarose a 1,0% corado com EtBr a 0,5µg/ml visualizado em UV, produto de PCR. 91
25. Edição das seqüências de *Melipona*, com o auxílio do programa BioEdit, visão das posições 92 a 174. 96
26. Cladograma agrupando as seqüências obtidas no laboratório com as seqüências obtidas no *GenBank* e em FERNANDES-SALOMÃO (2005). Árvore original obtida a partir do método NJ com *bootstrap* de 1000 replicações. 101

## RESUMO

A pesquisa foi desenvolvida no período de janeiro de 2003 a março de 2006, nos Departamentos de Zootecnia, e Biologia da Universidade Federal do Ceará, localizada no município de Fortaleza, estado do Ceará. As amostras de abelhas foram coletadas nos estados do Ceará, Piauí e Goiás. O objetivo desta tese foi estudar a diversidade genética de populações da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata*, ocorrendo naturalmente na Chapada do Araripe (Sul do Ceará), na Chapada da Ibiapaba (Oeste do Ceará), na cidade de Canto do Burití-PI, e na cidade de Luziânia-GO (Centro-Oeste do Brasil), visando contribuir para a correta classificação taxonômica da população nordestina e dar subsídios iniciais para trabalhos de criação racional desta espécie, em colméias para produção de mel, motivando então que a atual ação extrativista e predatória, reverta-se numa atividade zootécnica produtiva e ecologicamente sustentável. As regiões do DNA ribossômico nuclear 18S e ITS-1 parcial foram extraídas e seqüenciadas, podendo-se verificar os seguintes aspectos: Composição nucleotídica, matrizes de distância genética, múltiplos alinhamentos e cladogramas. Os resultados mostraram alto grau de similaridade entre as amostras, 0,008 para região 18S e 0,015 para o ITS-1 parcial. O tamanho das seqüências correspondente à região 18S, foram de 1823 a 1869, do ITS-1 491 a 572. O cladograma gerado para o 18S, apresentou um único clado, porém, o ITS-1 quando acrescido de amostras externas (*M. quadrifasciata*, *M. subnitida*, *M. scutellaris*, *M. mandaçaia*), derivou-se em três grupos, refletindo os subgêneros descritos pela taxonomia morfológica. A distância entre as áreas não se correlacionou significativamente com a dissimilaridade das abelhas para o 18S, porém houve correlação com o ITS-1

parcial, que agregou a amostra oriunda do estado do Piauí. Conclui-se (i) que as abelhas amostradas nos estados do Ceará e Piauí são indistinguíveis em termos moleculares das abelhas do estado de Goiás, sugerindo tratar-se da mesma espécie, embora apresentando algum nível de variabilidade entre as populações; (ii) os resultados encontrados refletem a taxonomia por dados morfológicos, para a espécie *Melipona quinquefasciata*; (iii) o distanciamento geográfico sugeriu algum grau de alteração no genoma das abelhas que nidificam nos três estados estudados; (iv) a região ITS-1 parcial do DNA ribossômico nuclear, mesmo em pequenas amostragens de abelhas, pode ajudar a resolver dúvidas taxonômicas ao nível de subgêneros, em *Melipona*.

## ABSTRACT

The research was carried out from January 2003 to March 2006, at the Department of Animal Science and Department of Biology in the Federal University of Ceará, in Fortaleza, Ceará. Bee samples were collected in the states of Ceará, Piauí and Goiás, Brazil. The objective of this work was to study the genetic variability of populations of the stingless bee *Melipona quinquefasciata*, which occurs naturally in the plateau of Araripe (South of Ceará), in the plateau of Ibiapaba (West of Ceará), in Canto do Burití, Piauí and Luziânia-Goiás (Center-Western, Brazil). Our aims were to contribute to the correct taxonomic classification of the Northeastern population and to give initial support to future work on the rational breeding of this species. Meliponiculture in rational hives for honey production will stimulate the change of the present predatory actions into a productive bee rearing activity which is ecologically sustainable. The regions of nuclear ribosomal DNA 18S and partial ITS-1 were extracted and sequenced and the following aspects were determined: nucleotid composition, matrixes of genetic distances, multiple alignments and cladograms. Results showed a high degree of similarity among the samples: 0,008 to region 18S, and 0,015 to partial ITS-1. The sequences' size found to region 18S varied: from 1823 to 1869, and to ITS-1 from 491 to 572. The cladogram made to 18S presented a single clade. However, when external samples (*M. quadrifasciata*, *M. subnitida*, *M. scutellaris*, *M. mandaçaia*), were added to ITS-1, three groups were formed reflecting the described subgenus by the morphological taxonomy. Distance among the localities where samples were collected was not significantly correlated to the dissimilarity of the bees to

18S. Nevertheless, there was a correlation with partial ITS-1, which contained the Piauí sample. Our conclusions are: (i) the bee samples from Ceará and Piauí cannot be distinguished, in molecular terms, from the bee samples of Goiás, suggesting they are the same species, although presenting some level of variability among the populations; (ii) the results reflect the taxonomy based in morphological aspects for *Melipona quinquefasciata*; (iii) the geographical distance suggested some level of alteration in the genoma of bees which inhabit in the three studied regions; (iv) the region partial ITS-1 of the nuclear ribosomal DNA, even in small bee samples, can help to solve taxonomic doubts at the subgenus level, in *Melipona*.

## 1. INTRODUÇÃO

As abelhas do gênero *Melipona* são insetos sociais, sem ferrão, exclusivas dos neotrópicos, onde se encontram presentes mais de 40 espécies, distribuídas nas regiões equatorial, tropical e subtropical do continente americano (SCHWARZ, 1932; MICHENER & SAKAGAMI, 1990; CAMARGO & PEDRO, 1992).

Até o ano 2000, conhecia-se no Nordeste brasileiro nove espécies de *Melipona* (*M. asilvai*, *M. compressipes fasciculata*, *M. mandaçaia*, *M. marginata*, *M. quadrifasciata anthidioides*, *M. rufiventris*, *M. scutellaris*, *M. seminigra pernigra* e *M. subnitida*), representando 23% das espécies conhecidas (SCHWARZ, 1932; MOURE & KERR, 1950; MOURE, 1975; GONÇALVES, 1973; MOURE, 1992). No entanto, LIMA-VERDE & FREITAS (2002) relataram recentemente a descoberta de *Melipona quinquefasciata* ocorrendo naturalmente nas chapadas do Oeste e Sul do Ceará. Esta espécie pertence ao subgênero *Melikerria*, tendo sido descrita por Lepeletier em 1836 (MOURE, 1975), e não havia registros da sua ocorrência no Nordeste do Brasil. Sua distribuição geográfica conhecida até então, limitava-se aos estados do Sudeste e Sul do Brasil, desde o Sul do Espírito Santo, até o Rio Grande do Sul; na Bolívia, no sul do Paraguai e no Norte-Nordeste da Argentina (MARIANO-FILHO, 1911; SCHWARZ, 1932, KERR, 1948; MOURE, 1948; 1975; VIANA & MELO, 1987).

O fato de uma espécie de abelha social apenas agora ter sido relatada em uma região relativamente bem povoada, deve-se à particularidade de *M.*

*quinquefasciata* nidificar sob a superfície do solo, numa profundidade de até 4 metros, utilizando-se de ninhos abandonados de formigas, cupins e túneis formados por raízes de plantas já decompostas, o que dificulta muito a localização das colônias, associada à implacável predação pela população local, que extrai e destrói seus ninhos em busca de mel e pólen (LIMA-VERDE & FREITAS, 2002). O mel dessa abelha é bastante saboroso e muito procurado na região, o que estimula meleiros a buscarem e escavarem seus ninhos, levando inúmeras colônias à destruição. Essa atividade vem sendo praticada há séculos, tendo reduzido grandemente a população natural dessa espécie, segundo relatos da própria população local. Os nomes populares dessa abelha (uruçú, uruçú de buraco, uruçú do chão e mandaçaia do chão) são os mesmos de outras espécies de *Melipona* já conhecidas como ocorrendo na região Nordeste (*M. scutellaris* e *M. rufiventris*), o que fez com que *M. quinquefasciata* passasse despercebida pelos pesquisadores até recentemente. Infelizmente sua descoberta na região ocorreu quando a própria espécie já se encontrava ameaçada de extinção pelo extrativismo direto, e pela ação indireta da população sobre o meio ambiente, com a destruição de seu habitat, pelo desmatamento e uso de defensivos químicos em cultivos agrícolas.

A situação atual de *M. quinquefasciata* no Nordeste demanda estudos urgentes que possam contribuir para reverter esse quadro. Sendo uma espécie cujo mel é tão procurado e valorizado, o estímulo ao criatório racional seria uma maneira de minimizar a destruição das colônias silvestres. No entanto, todas as informações existentes sobre essa abelha em cativeiro foram obtidas nas regiões Sul e Sudeste (NOGUEIRA-NETO, 1997), não se sabendo se podem ser

aplicadas às populações nordestinas, considerando as diversidades ecológicas das regiões e o isolamento das duas populações dessa espécie de abelha.

Abelhas de diferentes regiões do Estado do Ceará, bem como amostras de abelhas trazidas do centro-oeste do país e do estado vizinho, o Piauí, foram coletadas e passaram por análise de seqüenciamento de DNA, para que fosse apurado se o isolamento destas populações levou de fato à uma diversificação genética, em relação às abelhas encontradas nas outras regiões do Brasil, proporcionando o surgimento de uma subespécie ou até mesmo de uma espécie distinta.

A análise do seqüenciamento de DNA de espécimes de *Melipona* encontrados em duas regiões distintas do estado do Ceará, no estado do Piauí e no estado de Goiás, proporcionará também diversas comparações entre populações, abrindo então perspectivas de novas teorias e aplicações zootécnicas, como estudos de comportamento, pastejo, necessidades de alimentos, reprodução dentre outros. Além disso, este trabalho teve como finalidade explicar a distribuição desta espécie no Nordeste, contribuindo para futuras pesquisas relativas as suas peculiaridades na polinização de espécimes vegetais, e produção de mel, que hoje constitui uma fonte de renda e alimentos para comunidades locais.

Foram realizadas ações conjuntas entre departamentos, onde de forma multidisciplinar unimos os Departamentos de Zootecnia/UFC, centro gerador de informação sobre produção e manejo racional de abelhas, com o Departamento de Biologia/UFC, local do seqüenciamento e análise do DNA das abelhas.

Esta tese, portanto, propôs-se estudar a diversidade genética de populações da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata*, que ocorre

naturalmente nas Chapadas do Araripe (Sul do Ceará) e Ibiapaba (Oeste do Ceará), na cidade de Canto do Burití-PI, e na cidade de Luziânia-GO (Centro-Oeste do Brasil), ela visou contribuir para a correta classificação taxonômica de sua população nordestina e dar subsídios iniciais para trabalhos de criação racional desta espécie. Sua criação em colméias para produção de mel, certamente motivaria a reversão da atual ação extrativista predatória em uma atividade zootécnica produtiva e ecologicamente sustentável.

## 2. OBJETIVOS

Geral – Estudar a diversidade genética de populações da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata*, que ocorre naturalmente nas Chapadas do Araripe (Sul do Ceará) e Ibiapaba (Oeste do Ceará), no estado do Piauí e no Centro-Oeste do Brasil.

### Específicos

- Determinar se as colônias de *Melipona* encontradas no Araripe, Ibiapaba e no Piauí compõe populações isoladas de *M. quinquefasciata*, uma sub-espécie de *M. quinquefasciata* ou uma nova espécie ainda não descrita;
- Contribuir para a conservação de *M. quinquefasciata*.

### 3. HIPÓTESES

H0 - A espécie de abelha *Melipona quinquefasciata* encontrada nos estados do Ceará e Piauí, é a mesma espécie encontrada no Centro-oeste do Brasil.

H1 - A espécie de abelha *Melipona quinquefasciata* encontrada nos estados do Ceará e Piauí não é a mesma espécie encontrada no Centro-oeste do Brasil.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1. Abelhas do gênero *Melipona*

#### 4.1.1. Classificação

As classificações biológicas, em geral, são construídas agrupando-se organismos que compartilham características similares, dessa forma, busca-se produzir estruturas que reflitam uma ordem hierárquica percebida na natureza. Para produção das classificações foram necessários alguns princípios, dentre eles podemos citar a aceitação de que as espécies se originam de outras espécies, ao longo do processo da evolução. O campo da biologia que estuda as relações entre os organismos chama-se *sistemática*. A *taxonomia*, por sua vez, procura empregar os conhecimentos obtidos pela sistemática para a construção de classificações naturais dos seres vivos. As classificações devem refletir as relações evolutivas entre os organismos. Para obtenção dessas classificações, reconhecem-se dois processos evolutivos básicos: a cladogênese e a anagênese. A cladogênese é o processo pelo qual uma espécie se divide, dando origem a duas ou mais espécies-filhas. A anagênese é a modificação, ao longo do tempo, das características de uma espécie, sem que novas espécies sejam produzidas (SILVEIRA *et al.*, 2002).

Duas escolas taxonômicas contemporâneas defendem posições antagônicas. A escola evolutiva (também chamada *ortodoxa* ou gradista)

argumenta que tanto a cladogênese quanto a anagênese devem estar representadas nas classificações. A escola filogenética (também chamada cladística), por outro lado, defende que apenas a cladogênese deve estar representada nas classificações. Como consequência, há entre estas escolas uma diferença de opinião sobre quais tipos de grupos devem receber nomes formais na classificação (AMORIM, 1997).

Classificações baseadas em hipóteses filogenéticas facilitam o avanço dos estudos em biologia comparada (morfologia, fisiologia, comportamento, ecologia e biologia evolutiva), pois novas descobertas podem sugerir novas hipóteses sobre as relações evolutivas entre os organismos estudados. Desta forma tal conhecimento pode gerar novas classificações. As classificações biológicas são reflexos do que se tem de conhecimento dos grupos de organismos em um dado momento, por isso, são muito importantes estudos mais amplos em diversos organismos (AMORIM, 1997).

A classificação das abelhas foi inicialmente dividida em dois grandes grupos. Estes grupos reuniam as abelhas de língua longa e as de língua curta, respectivamente. Mais tarde, elas foram divididas, também, de acordo com seus hábitos solitários, sociais ou parasitas. Um dos marcos para taxonomia das abelhas foi o trabalho de MICHENER (1944), pois todos os principais grupos de abelhas reconhecidos hoje foram delimitados e sua classificação proposta. Posteriormente, MICHENER (1974) apresentou uma nova classificação incorporando várias modificações propostas por ele e outros autores nos anos anteriores. Com o advento dos métodos de análise cladística, a história evolutiva dos diversos grupos de abelhas vem sendo intensivamente re-estudada e novas

classificações têm sido propostas com base nas hipóteses filogenéticas levantadas.

Com o advento da filogenia molecular, diversos marcadores genéticos têm sido utilizados nas classificações, dentre eles podemos citar como principais as seqüências de DNA mitocondrial, DNA ribossômico, seqüências não codificantes e seqüências codificantes (CATERINO *et al.*, 2000; SILVESTRE, 2002).

#### **4.1.2. Biodiversidade de abelhas no Brasil**

As pesquisas com abelhas no Brasil, começaram com Lineu, durante os séculos 18 e 19, durante expedições científicas organizadas por governos e instituições estrangeiras, para explorar o território nacional. As abelhas coletadas durante essas viagens foram depositadas em vários museus europeus e descritas por pesquisadores como Fabricius, Latreille, Lepeletier, Spinola e Smith (SILVEIRA *et al.*, 2002).

No final do século 19, e início do século 20, Friese publicou as primeiras monografias sobre grupos de abelhas neotropicais, que incluíram grande número de espécies brasileiras. Curt Schrottky e Adolph Ducke, nesta época, foram os primeiros taxonomistas a trabalhar com abelhas em instituições brasileiras (NOMURA, 1995; apud SILVEIRA *et al.*, 2002), publicando sobre elas até o início da década de 1920 (SILVEIRA *et al.*, 2002).

No século 20, (1902) Schrottky reconheceu 385 espécies em seu ensaio sobre as abelhas solitárias do Brasil. Considerando-se as espécies de

*Meliponinae*, compiladas em 1914 por DUCKE (1916), chega-se a um total de cerca de 450 espécies conhecidas para nossa fauna. Hoje são contabilizados 1576 nomes válidos para as espécies de abelhas brasileiras e estima-se que ela reúna, pelo menos, 3000 espécies. A evolução das pesquisas sobre a classificação dos espécimes de abelhas brasileiras pode ser mensurada pelo número de gêneros revisados nas últimas décadas (Tabela 1), refletindo o crescimento de revisões entre as décadas de 80 e 90, e inferindo que, seria então necessário uma grande quantidade de tempo para que os grupos atualmente reconhecidos fossem revisados (SILVEIRA *et al.*, 2002).

Tabela 1- Número de gêneros de abelhas brasileiras revisadas ao longo das últimas cinco décadas e número de espécies incluídas nesses gêneros.

Táxons Revisados	DÉCADAS					TOTAL
	1950	1960	1970	1980	1990	
Gêneros*	1	11	9	15	28	59
Espécies	8	69	18	78	122	295

Fonte: SILVEIRA *et al.*, 2002.

\* Gêneros revisados duas vezes em uma década foram contados apenas uma vez. Quando um gênero foi revisado mais de uma vez em décadas diferentes, apenas as espécies adicionais foram consideradas na segunda década; dessa forma, os números de espécies representam os números de espécies adicionadas naquela década ao número total de espécies incluídas nas revisões.

Entretanto, é importante ressaltar que apesar de toda essa diversidade ocorre de forma paralela, e bem mais acelerada que as pesquisas e novas descobertas, a ação antrópica. Esta acontece com a ocupação intensiva do ambiente pelo homem, que causa impactos nas comunidades locais de abelhas, através da eliminação de fontes de alimento, destruição de substratos de nidificação e envenenamento com praguicidas, dentre outros. Dessa forma, na

medida em que as florestas são derrubadas, queimadas e substituídas por plantios ou áreas urbanas, espécies de abelhas (e de outros organismos) dependentes desses ambientes são localmente extintas ou confinadas a pequenos fragmentos, de onde podem eventualmente desaparecer por problemas de escassez de recursos, endogamia pela redução populacional, ou pela competição ou predação por organismos invasores (SILVEIRA *et al.*, 2002), sem que antes pudessem ter sido estudadas, ou mesmo conhecidas como nidificando, e pertencentes ao ecossistema daquela região afetada. Assim, é possível que inúmeras espécies que tinham, até cerca de 500 anos atrás, ampla distribuição na região costeira originalmente coberta pela mata atlântica, possam estar confinadas, hoje, a um ou poucos fragmentos florestais isolados. Por exemplo, na lista das espécies em extinção ou ameaçadas de extinção, segundo o banco de dados tropical (<http://www.bdt.fat.org.br/>), encontram-se pelo menos três abelhas sem ferrão (*Melipona bicolor*, *M. marginata* e *M. rufiventris*) em Minas Gerais. Todavia, esse número pode ser maior, pois tanto a diversidade brasileira quanto a mundial é pouco conhecida.

### 4.1.3. *Melipona*

Reúne as chamadas “abelhas indígenas sem ferrão”, entre elas a uruçú do chão (*Melipona quinquefasciata* Lepeletier, 1836), a jataí (*Tetragonisca angustula* Latreille, 1811), a mandaçaia (*Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836) e a irapuá (*Trigona spinipes* Fabricius, 1793), dentre outras. Esse gênero é representado por várias centenas de espécies em todas as regiões tropicais do mundo, bem como nas regiões subtropicais do hemisfério sul. São abelhas minúsculas a médias, em geral robustas. Todas as suas espécies são eussociais, embora algumas delas vivam de alimento roubado de colônias de outras espécies, como exemplo a *Lestremelita limao*. Seus ninhos são, em geral, construídos em cavidades pré-existentes (occos de árvores, ninhos abandonados de cupins e formigas), mas algumas espécies constroem ninhos expostos (WILLE & MICHENER 1973). A classificação de Moure e Camargo é a mais aceita (MOURE, 1951, 1961; CAMARGO & PEDRO, 1992). Classificações alternativas têm sido propostas por outros autores, como por exemplo, MICHENER (2000), em que são reconhecidos gêneros maiores contendo vários subgêneros. Dados moleculares apresentados por COSTA *et al.* (2003) corroboram a classificação de MOURE e CAMARGO, indicando os caracteres utilizados por MICHENER (1990, 2000) para propor táxons (SILVEIRA *et al.*, 2002).

#### 4.2. *Melipona quinquefasciata*

Classificação zoológica, segundo MICHENER (1990):

Reino – *Animal*

Filo - *Arthropoda*

Classe – *Insecta*

Ordem – *Hymenoptera*

Subordem - *Apócrita*

Super família – *Apoidea*

Família – *Apidae*

Sub-Família – *Apinae*

Tribo – *Meliponini*

Gênero – *Melipona* (Illiger, 1806)

Sub-Gênero - *Melikerria*

Espécie – *Melipona quinquefasciata* (Lepelletier, 1836)

#### 4.2.1. “Descoberta” de *Melipona quinquefasciata* no estado do Ceará

Até 2002, o Nordeste brasileiro, que representa 9,3% do território brasileiro, contava, até então, com 23% das espécies de *Melipona* conhecidas, são elas: *M. asilvai*, *M. compressipes fasciculata*, *M. mandaçaia*, *M. marginata*, *M. quadrifasciata anthidioides*, *M. rufiventris*, *M. scutellaris*, *M. seminigra pernigra* e *M. subnitida* (SCHWARZ, 1932; MOURE & KERR, 1950; MOURE, 1948; GONÇALVES, 1973; MOURE, 1992). Entretanto, a partir de relatos de agricultores e extrativistas de mel do Estado do Ceará, ocorreram as primeiras informações sobre a presença da “uruçú do chão” *M. quinquefasciata*, nas chapadas do Araripe, no sul do estado, bem como na chapada da Ibiapaba, localizada no oeste do Ceará (LIMA-VERDE & FREITAS, 2002).

*Melipona quinquefasciata* é uma espécie pertencente ao subgênero *Melikerria*, foi descrita por Lepeletier em 1836 (MOURE, 1975), e até 2002 não havia sido reportada sua ocorrência no Nordeste do Brasil. Sua distribuição geográfica é ampla, ocorrendo desde o estado do Rio Grande do Sul até o estado de Rondônia (Figura 1), principalmente na porção oriental do país. Porém, foi registrada principalmente nos estados do sudeste e sul do país, desde o sul do Espírito Santo, até o Rio Grande do Sul. No Paraná esta espécie foi coletada uma única vez, em 1969, no Parque Estadual de Vila Velha, Município de Ponta Grossa, pelo Padre Jesus Santiago Moure. Há também registros na Bolívia, no sul do Paraguai e no norte-nordeste da Argentina (MARIANO-FILHO, 1911; SCHWARZ, 1932, KERR, 1948; MOURE, 1948; 1975; VIANA & MELO, 1987).



Figura 1- Estados Brasileiros onde se conhece a presença da *Melipona quinquefasciata*.

Esta espécie de *Melipona* possui a particular característica de nidificar sob o solo, podendo suas câmaras chegarem a uma profundidade de até 4 metros (KERR *et.al*, 2001; NOGUEIRA-NETO, 1997) (Figuras 2 a 7), utilizando-se de formigueiros ou cupinzeiros abandonados. E embora de difícil coleta, seu mel tem comércio garantido, sendo então cobiçado pelos meleiros do local. A extração do mel leva ainda à morte da colônia, já que nesta época a rainha está em seu período fértil, estando com sobrepeso, não permitindo seu vôo de fuga, para uma futura formação de colônia, como acontece com outras espécies (KERR *et.al.*, 2001). Possui um comprimento de 9 a 10,5mm, com cinco faixas de coloração amarelada no abdômen. Infelizmente, a *M. quinquefasciata* já consta em listas de espécies em extinção, como mencionado no Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná ([www.maternatura.org.br](http://www.maternatura.org.br)).



Figura 2- Início da escavação da colônia de *Melipona quinquefasciata*.



Figura 3- Túnel de acesso à colônia de *Melipona quinquefasciata*.



Figura 4- Quebra do perfil de pedras, para atingir a colônia de *Melipona quinquefasciata*.



Figura 5- Retirada de areia, para atingir a colônia de *Melipona quinquefasciata*.



Figura 6- Localização da colônia de *Melipona quinquefasciata*.



Figura 7- Transferência da colônia de *Melipona quinquefasciata*, para caixa de transporte.

Figuras 2 a 7- Seqüência de fotos durante uma captura de colônia de *Melipona quinquefasciata*, na chapada da Ibiapaba, Ceará.

### **4.3. Biologia molecular de abelhas**

#### **4.3.1. Evolução nas seqüências de DNA**

As mudanças no DNA podem ser de quatro tipos. Elas podem envolver a substituição de um nucleotídeo por um outro, a remoção ou a inserção de um nucleotídeo da seqüência, e a inversão de nucleotídeos (MEYER, 1997). Inserção, remoção e inversão possivelmente ocorrem em muitos nucleotídeos como uma unidade (NEI & KUMAR, 2001). As substituições nucleotídicas são divididas em duas classes: transições e transversões. Uma transição é a substituição de uma base nitrogenada do tipo purina (adenina ou guanina) por outra purina ou a substituição de uma base nitrogenada do tipo pirimidina (timina e citosina) por outra pirimidina. O outro tipo de substituição nucleotídica é chamado de transversão, quando uma base do tipo pirimidina é substituída por outra do tipo purina e vice-versa (NEI & KUMAR, 2001; PAGE & HOLMES, 2001). As substituições do tipo transição são mais freqüentes que as transversões, porque necessitam uma menor mudança na estrutura da base nitrogenada (PAGE & HOLMES, 2001).

Existe uma relação entre o número de substituições e o tempo de divergência entre duas seqüências. O número de diferenças entre duas seqüências com o aumento do tempo se torna uma estimativa cada vez menos acurada em relação ao verdadeiro número de substituições que ocorreram desde a divergência das seqüências do ancestral comum (PAGE & HOLMES, 2001). À medida que aumenta a divergência entre duas espécies, os números de

transições observadas em relação ao das transversões decresce (SCHNEIDER, 2003). A relação entre a diferença da seqüência e o tempo decorrido desde a divergência não é linear, entretanto, hiperbólico, devido à ocorrência de múltiplas mudanças no mesmo sítio. Com o acúmulo das substituições entre duas seqüências, pode ocorrer a saturação dos dados, ou seja, a maioria dos sítios que estão mudando já mudou anteriormente (PAGE & HOLMES, 2001; LIMA, 2003). Dessa forma ao se trabalhar com conjuntos de seqüências, para estudo das relações filogenéticas, deve-se fazer a análise da saturação dos dados. Dar continuação a uma análise filogenética quando se evidencia saturação de substituições nas seqüências, pode levar a subestimar eventos evolutivos importantes que possam ter ocorrido durante o tempo, desde a divergência inicial. A saturação de substituições, no entanto, é difícil de ser estimada de acordo com o tempo de divergência, pois na maioria das vezes se trabalha com táxons de existência atual. Uma medida relativamente fácil para contornar este problema é relacionar o número de substituições com a distância matemática entre as seqüências, já que a distância entre estas é proporcional ao tempo de divergência (PAGE & HOLMES, 2001).

#### **4.3.2. Alinhamento e busca por homologias**

Todas as análises de relações filogenéticas derivadas a partir de dados de seqüências são fundamentalmente baseadas no seu correto alinhamento (PHILLIPS, *et al.*, 2000; BROWN, 2000; PAGE & HOLMES, 2001). Então as variações observadas na filogenia resultante dependem muito mais do

alinhamento das seqüências do que dos métodos de construção filogenética. Sendo assim o alinhamento das seqüências é essencial, para se poder identificar potenciais regiões homólogas entre as posições de nucleotídeos ou aminoácidos (PHILLIPS, *et al.*, 2000). Existem dois tipos principais de alinhamento. O primeiro é o local, que procura uma pequena região na seqüência (chamada de semente) que possua o melhor alinhamento com parte de outra seqüência e começa a estender esse alinhamento. Entretanto, se a extensão deste alinhamento possuir uma pontuação baixa, ele é descartado, caso contrário ele é retornado como um resultado. O outro tipo básico é o global, que alinha as duas seqüências em todo o seu tamanho, adicionando espaços vazios (*gaps*), para maximizar o alinhamento nas seqüências, tanto no início, quanto no meio e no fim, para tornar as duas seqüências com o mesmo número de caracteres. Existem ainda alinhamentos entre pares de seqüências e entre múltiplas seqüências (BROWN, 2000; GIBAS & JAMBECK, 2001).

O alinhamento entre pares de seqüências deve ser utilizado quando se quer ter uma estimativa da similaridade entre essas duas seqüências, e a partir dessa similaridade concluir se são homólogas ou não (BROWN, 2000). O alinhamento múltiplo pode ser usado para estudar grupos de genes relacionados ou proteínas, inferir relações evolucionárias entre duas seqüências, e descobrir os padrões que são compartilhados entre grupos de genes funcionalmente ou estruturalmente relacionados (GIBAS & JAMBECK, 2001).

As seqüências podem diferir no comprimento, isto pode ser explicado por eventos de inserção e remoção (*indels*) para entender essa variação. Dessa forma, os métodos de alinhamento entre seqüências possuem um sistema de pontuação para cada alinhamento obtido, entretanto, nem sempre a maior

pontuação indica o melhor alinhamento possível (BROWN, 2000; GIBAS & JAMBECK, 2001).

Atualmente existem vários programas computacionais especializados em alinhamentos, sendo a maioria deles de distribuição gratuita (RUSSO 2001). O ClustalX (THOMPSON *et al.*,1997) tornou-se um dos softwares mais utilizados para alinhamento múltiplo (VARELA, 2003). Neste programa, para se obter o alinhamento, inicialmente, todas as seqüências são comparadas par a par e uma medida de similaridade máxima é calculada entre cada duas seqüências. Baseando-se no cálculo obtido anteriormente, as seqüências dos grupos mais relacionados são alinhadas primeiro, em seguida alinha-se as que se conectam a estas, até que todas as demais seqüências sejam alinhadas gradualmente (THOMPSON *et al.*, 1997; RUSSO, 2001)

Então após a obtenção do alinhamento, é necessário fazer uma verificação do alinhamento para correção de possíveis erros, como também para a codificação de inserções ou deleções (BROWN, 1994; SCHNEIDER, 2003).

#### **4.3.3. O DNA ribossômico nuclear**

As seqüências de DNA evoluem de maneira mais regular do que caracteres fenotípicos (morfológicos, fisiológicos e embriológicos) (LI, 1997; VARELA, 2003). Dentre as vantagens dos marcadores moleculares em relação aos caracteres morfológicos, podemos citar: possibilidade de serem classificados objetivamente eliminando o problema da subjetividade, e os marcadores serem

obtidos em grandes quantidades e poderem ser utilizados em estudos de relações filogenéticas em diversos níveis (MEYER, 1997). A construção de filogenias requer a escolha da molécula apropriada para o seqüenciamento e a aplicação de uma metodologia para inferir a informação filogenética por meio da comparação das seqüências (RUSSO *et al.*, 2001).

A seqüência do gene nuclear que codifica para o rRNA da subunidade pequena do complexo ribossômico tem sido muito utilizada como *locus* apropriado para inferir relações entre diversos organismos (LIMA, 2003). Estudando seqüências moleculares para inferências, BROCCHERI (2001), identificou que o gene que codifica para a subunidade pequena do RNA ribossômico (SSU rRNA – “small subunit rRNA”) tem baixa taxa de mutação, é resistente à transferência lateral de genes, funcionalmente conservado e amplamente distribuído entre os organismos, portanto, possuindo características imprescindíveis para a sua utilização em filogenia molecular. As seqüências ribossômicas já têm sido utilizadas nos estudos filogenéticos dentro dos insetos (CATERINO, *et al.*, 2000). O gene é composto por regiões conservadas (universais), semi-conservadas e não-conservadas, permitindo o estudo em diversos níveis taxonômicos. Outra característica importante é que o gene possui nas extremidades 5' e 3' regiões conservadas, possibilitando a utilização de oligonucleotídeos universais para a amplificação do gene via reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) (OLIVEIRA, 1993). A alta conservação da estrutura primária do *locus* está largamente relacionada à sua função na célula.

Os genes da família do rRNA encontram-se em blocos repetidos por todo o genoma, que os tornam úteis para o sistemata (DOYLE, 1987). Existem indícios que as unidades individuais (repetições) do rDNA não evoluem em total

independência uma da outra, um fenômeno que é também conhecido para outros genes e chamado de evolução em concerto (DOYLE, 1987, 1990; GRAUR & LI, 2000). Nos eucariontes, os genes ribossomais são encontrados separados pelo espaçador não transcrito – NTS (*non-transcribed spacer*) e pela região externa de transcrição – ETS (*external transcribed spacer*) que precede o 18S (onde “S” é a unidade de Svedberg que está relacionado ao coeficiente de sedimentação da molécula durante centrifugação, de acordo com a sua massa e sua estrutura tridimensional). O conjunto das seqüências das regiões NTS e ETS é conhecido como espaço intergênico – IGS (*intergenic spacer*) e seus transcritos primários incluem o SSU rDNA, 5,8S, e o LSU rDNA, separados pelos dois espaçadores ITS – 1 e ITS – 2 (Figura 8).

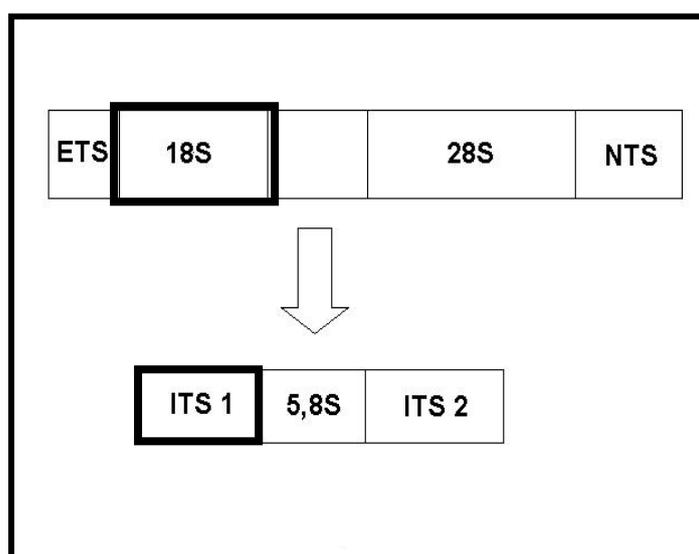


Figura 8 - Representação esquemática do DNA ribossômico nuclear (nrDNA). ETS (*External Transcribed Spacer*), NTS (*Non Transcribed Spacer*) e ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Em destaque as regiões investigadas neste trabalho (i.e., 18S e ITS1). Fonte: Matioli, 2001.

Os ribossomos são organelas citoplasmáticas que ocorrem em todos os seres vivos. Sua estrutura é formada através de grandes complexos de proteínas e ácidos ribonucléicos, formando subunidades. Nas células eucariontes duas subunidades são observadas, a primeira chamada de pequena (“small subunit” – SSU) que é formada pelo rRNA 18S, rRNA 5S e mais um total de 32 proteínas formando a subunidade 30S. A segunda subunidade, denominada de grande (“large subunit” – LSU), é formada pelo rRNA 26S, rRNA 5,8S e 50 proteínas formando a subunidade 50S. A função dos complexos ribossômicos está relacionada à síntese de proteínas. Durante a síntese protéica as subunidades 30S e 50S irão se complexar formando o ribossomo que é 70S devido à sua estrutura tridimensional. O ribossomo conecta-se ao mRNA (RNA mensageiro) originado do núcleo e contendo a informação da estrutura primária da proteína a ser formada. Os ribossomos auxiliam a ligação entre o mRNA e o tRNA (RNA transportador), complexado com o aminoácido a ser adicionado à proteína em formação (BROCCHIERI, 2001).

Os genes codificadores da região do rRNA são essenciais para o organismo, por isso evoluem de maneira mais lenta. Sendo assim modificações pontuais em sítios específicos podem determinar a inativação da função da subunidade comprometendo a síntese protéica. Entretanto, o gene do 18S sofre menores taxas de mutação do que o gene que codifica para a região 28S, sendo então muito utilizado para construção de filogenias (BARGUES & MAS-COMA, 1997). Por serem regiões não codificadoras, o ETS e o ITS sofrem uma pressão seletiva diferenciada em relação aos genes codificadores e, portanto, evoluem mais rapidamente, acumulando maiores números de mutações.

O ITS estaria relacionado com o processamento do transcrito primário do arranjo ribossomal (MAI & COLEMAN, 1997). A excisão correta dos espaçadores no processamento do pre-rRNA é passo fundamental na biogênese de uma unidade ribossomal ativa (VAN NUES *et al.*, 1995; OLIVERIO *et al.*, 2002). Regiões ITS apresentam-se muito variáveis entre os diferentes organismos. Portanto, as seqüências que codificam para essa região possuem grande heterogeneidade (YOKOTA *et al.*, 1989), sendo usadas dessa forma para resolver problemas filogenéticos de táxons relacionados, principalmente daqueles que apresentaram divergência relativamente recente (OLIVERIO *et al.*, 2002; COLEMAN & VACQUIER, 2002).

#### **4.3.4. Banco de dados**

Nas últimas décadas, com os avanços científicos e tecnológicos dos processos laboratoriais, atividades como o seqüenciamento foram aperfeiçoadas, permitindo resultados rápidos e com menores custos. A partir disso, houve uma grande produção de seqüências de ácidos nucléicos e proteínas, e conseqüentemente a criação de repositórios para armazenar tais informações (MEIDANIS & SETÚBAL, 1994). Foi nesse contexto que o *GenBank*® surgiu, sendo então um dos bancos de seqüências nucleotídicas e de aminoácidos mais acessado na atualidade. Até fevereiro de 2004, o número de seqüências depositadas alcançou mais de 32 milhões. Sua atualização é feita a cada 2 meses

e o *GenBank*® é parte do *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* que compreende também o *DNA DataBank of Japan* (DDBJ) e o *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL). Essas três organizações trocam informações entre si (LOPES, 2004; [www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez)).

#### 4.3.5. Buscas em bancos de dados

Com a deposição de uma grande quantidade de seqüências, vários programas foram desenvolvidos a partir de algoritmos, com a finalidade de permitir comparações (alinhamentos) de seqüências de DNA produzidas (Query) com todas as seqüências de domínio público depositadas em bancos de dados (PROSDOCIMI *et al.*, 2002). Algoritmos para comparação de seqüências, tais como o BLAST e o FAST, são métodos de busca heurística, não são utilizados para mensurar a homologia entre as seqüências, mas para identificar similaridades e identidades (PERTSEMLIDIS & FONDON III, 2001). A partir destes algoritmos tenta-se alinhar seqüências procurando valorizar bases iguais e penalizar alinhamentos de bases desiguais (MEIDANIS & SETÚBAL, 1994; CORPET & CHEVALET, 2000).

O primeiro programa a surgir foi o FASTP, que é responsável por realizar buscas de proteínas. Logo em seguida, surgiu uma outra versão para busca de seqüências de nucleotídeos, chamado FASTN. Posteriormente, ambos foram unidos no mesmo programa, o qual foi denominado FAST. Todos estes

programas efetuam comparações com as seqüências depositadas, retornando a seqüência mais próxima, ou seja, o alinhamento considerado melhor (MEIDANIS & SETÚBAL, 1994).

O programa BLAST é a ferramenta mais utilizada na procura de regiões de similaridade local (PERTSEMLIDIS & FONDON III, 2001). Este programa não visa conduzir uma comparação de extensão total das moléculas comparadas. Na verdade, o que se identifica no banco de dados é a presença de uma seqüência parecida (similar) com aquela pesquisada (ALTSCHUL *et al.*, 1990; PERTSEMLIDIS & FONDON III, 2001; PROSDOCIMI *et al.*, 2002). No programa BLAST são utilizadas janelas, cada uma contendo 12 bases, que são comparadas com as seqüências depositadas nos bancos de dados. A partir destas janelas, chamadas “sementes”, o alinhamento é estendido nas duas direções sem a adição de buracos (MEIDANIS & SETÚBAL, 1994). Desta forma, os resultados não produtivos são descartados logo no início.

No programa BLAST há um parâmetro, valor de “E” ou *E value*, calculado a partir de sofisticadas teorias estatísticas, que expressa a dificuldade de encontrarmos uma seqüência perfeitamente idêntica nos bancos de dados, ou seja, este valor demonstra a chance de tal comparação ter sido encontrada por simples coincidência. O resultado desta busca retorna aquelas seqüências depositadas com maior similaridade sem buracos e que teria a menor probabilidade de ter sido encontrada ao acaso (MEIDANIS & SETÚBAL, 1994).

#### 4.3.6. Biologia molecular em espécies do gênero *Melipona*

Os estudos que tratam da biologia molecular de *Melipona* são muito escassos quando comparados com outros gêneros. No Brasil, as universidades e centros de pesquisas localizados no sudeste do país são responsáveis pela grande maioria das publicações.

As relações filogenéticas e o entendimento de vários aspectos biológicos e evolutivos de uma grande variedade de abelhas, são os principais objetivos desses estudos que desde o final do século passado, têm sido baseados na molécula do DNA. A aplicação do DNA em estudos populacionais e evolutivos se vale devido ao fato deste possuir em algumas regiões específicas, uma alta taxa de substituições de bases, apresentar alterações no tamanho da região estudada, devido à inserções e deleções, quando do confronto entre espécimes. Várias metodologias têm sido aplicadas para caracterização do genoma das abelhas para encontrar variabilidade genética entre populações e espécies (MELO, 1999).

Dentre os Hymenoptera, apenas o genoma de *Apis* está completamente seqüenciado, e em termos moleculares esse genoma é rico em bases de adenina e timina como também é observado em outros insetos.

As publicações referentes a biologia molecular em *Melipona* são ainda muito reduzidas. Para melhor esclarecer, WALDSCHMIDT *et al.* (1997) apresentaram à comunidade científica uma metodologia, adaptada a partir de outras já existentes, para a extração do DNA genômico para *Melipona*, em especial para *M. quadrifasciata*, procedimento este, básico para todo o restante do processo de análise filogenética.

#### 4.3.6.1. Caracterização de Populações

Em meliponíneos, FRANCISCO (2002) empregando o DNA mitocondrial mtDNA como marcador molecular nos estudos populacionais trabalhou com quatro populações de *Plebeia remota* oriundas dos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, usando a técnica de Blot para detecção de fragmentos de DNA clivados, e 15 enzimas de restrição, encontrou 15 haplótipos diferentes, sendo estes 4 em São Paulo, 9 no Paraná e 2 em Santa Catarina, concluiu que esses haplótipos são como local-específicos, dada a exclusividade dos mesmos por região. Embora a amostragem de Curitiba tenha sido pequena (5 ninhos) pode-se inferir que o resultado foi reflexo do isolamento recente entre as populações. O potencial do uso do RFLP para verificação da estruturação populacional em abelhas da espécie *P. remota* proporcionou a perspectiva de aplicação em outras espécies do mesmo gênero como a *Partamona mulata*, *P. helleri*.

Usando marcadores moleculares, e com o objetivo de estudar a filogenia em *Melipona*, através de análises do genoma mitocondrial e dos espaçadores transcritos Internos do DNA ribossômico ITS rDNA, para entender melhor os relacionamentos entre grupos, FERNANDES-SALOMÃO *et al.* (2002) usaram 60 operárias adultas, coletadas em diferentes regiões do Brasil, e identificadas com base morfológica. Aplicou, com pequenas modificações, o método de ZHANG *et al.* (1995) para extração do DNA do tórax das abelhas, e obteve como resultados que as regiões COI e COII em *Melipona quinquefasciata*, *M. compressipes* e *M. marginata* possuem 630pb. Porém as *M. quadrifasciata*, *M. mandaçaia*, *M. favosa*

*orbignyi*, *M. bicolor bicolor*, *M. rufiventris*, *M. scutellares*, *M. capixaba*, *M. seminigra*, *M. ebúrnea*, *M. erinita*, *M. flavolineata*, *M. fuliginosa* e *M. asilvai* possuem 650pb. Já a região ITS-1 de *M. quadrifasciata*, *M. mandaçaia*, *M. favosa orbignyi*, *M. bicolor bicolor*, *M. quinquefasciata* e *M. compressipes* apresentou 1.430pb, em contraste com os 1.450pb de *M. scutellaris*, *M. capixaba* e *M. seminigra*, e os 1.640pb de *M. marginata*, e 1.940 de *M. rufiventris*, indicando o elevado número de pares de bases das espécies do gênero *Melipona*, em comparação com outras espécies de eucarióticos, que apresentam em média 1.000pb na região ITS-1. Os resultados encontrados sugerem que a variação no comprimento do número de pares de base, foi devido à inserções, deleções e repetições encontradas, e que são compatíveis com a filogenia obtida a partir do cariótipo dessas abelhas.

Estudando o cariótipo de espécies de *Melipona*, ROCHA (2002), trabalhou com 10 amostras, coletadas em diferentes estados do Brasil. Usando a técnica de IMAI *et al* (1988) para visualização dos cromossomos, as abelhas foram divididas em dois grupos distintos, separados pela quantidade de heterocromatina encontrada. Os resultados foram no grupo 1: *M. bicolor bicolor*, *M. quadrifasciata*, *M. asilvai*, *M. marginata* e *M. subnitida*, como sendo de baixo valor em heterocromatina, e o grupo 2: *M. capixaba*, *M. compressipes*, *M. crinita*, *M. seminigra fuscopilosa* e *M. scutellares*, como possuidoras de alto conteúdo de heterocromatina. Para todas as espécies estudadas observou-se o valor  $2n=18$  e  $n=9$  foi encontrado, confirmado para o gênero, porém sabe-se que em *M. quinquefasciata* encontra-se  $2n=20$ . Baseado no padrão característico de distribuição encontrado neste trabalho sugeriu-se que altos conteúdos de heterocromatina, associados a eucromatinas (cromatina única) em “U”, são

características derivadas, e que sugerem as espécies do grupo 2, como sendo um grupo natural ou “clade”, dentro do gênero *Melipona*. Já dentro do grupo 1, não foi verificada nenhuma derivação de características, e isto pode evidenciar também uma diferença evolucionária em contraste ao monofiletismo do grupo 2.

#### 4.3.6.2. Caracterização de espécies e filogenia

Trabalhando com 13 espécies, sendo 5 do gênero *Plebeia* e 7 de *Melipona*, ARIAS *et al* (2003) construíram mapas de restrição para caracterizar o genoma mitocondrial, no que se refere ao seu tamanho, número de sítios de restrição por enzima e posição relativa desses sítios. Quando comparados com outras espécies, os mapas determinaram as regiões mais ou menos conservadas do genoma. Os mapas foram gerados a partir de 17 enzimas de restrição e o uso da técnica Southern Blot para identificação dos fragmentos, acrescido da técnica de PCR-RFLP, o que permitiu a localização dos sítios de restrição com relação aos genes presentes no fragmento amplificado. Como resultado, encontraram que o tamanho total do genoma mitocondrial dos meliponíneos estudados foi de aproximadamente 18.500 pares de base (pb), cerca de 2.000 pb, a mais do que o de *Apis mellifera*. Tal diferença foi provavelmente devido à região rica em A+T. Os dados obtidos para as 5 espécies de *Plebeia* (FRANCISCO *et al.*, 2001), mostraram a existência de sítios de restrição espécie específico e outros conservados entre as espécies e à *Apis mellifera*, como exemplo o sítio *Pst* I localizado no gene da subunidade ribossômica 16S.

Um estudo semelhante foi conduzido com espécies de *Melipona* (WEINLICH *et al.*, 2004) e do mesmo modo foram verificados sítios espécie específico e outros conservados entre essas espécies e *Apis mellifera*. A resolução das relações filogenéticas mostrou que subespécies como *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* e *M. q. anthidioides* apresentam distância genética menor do que a observada entre espécies do gênero. Esse resultado é um forte indicativo de que a análise de sítios de restrição pode fornecer dados consistentes.

Visando diferenciar subespécies de *Melipona quadrifasciata*, a *M. q. quadrifasciata* e a *M.q.anthidioides*, e utilizando marcadores moleculares RAPD (Amplificador Randômico de Polimorfismo de DNA), e aplicando 150 iniciadores. Foram coletadas amostras em 64 colônias nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná, Santa Catarina e São Paulo, tomando-se como parâmetro de distinção a presença ou ausência das bandas terciais do terceiro ao sexto seguimento. Os resultados moleculares apresentaram confirmação dos parâmetros morfológicos, como também a ocorrência de híbridos no Paraná e em Minas Gerais. A causa sugerida pelos autores para divergência encontrada, reflete as condições de temperatura e altitude dos locais de nidificação das subespécies, e como conclusão ressaltou-se que a presença ou ausência deste marcador não pode ser usada como único critério para classificação individual entre elas, e que esse marcador em associação com dados morfométricos, pode ser usado em estudos de estrutura genética de híbridos, nas zonas de ocorrência das abelhas (WALDSCHMIDT *et al.*, 2002).

Os mesmos autores (WALDSCHMIDT *et al.*, 2002), usando novamente os marcadores RAPD e 69 amostras de abelhas da espécie *Melipona quadrifasciata*

de 4 estados brasileiros: Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná, Santa Catarina e São Paulo, calcularam o Coeficiente de Simples Coincidência, onde se verificou a similaridade genética entre o iésimo e o jotaésimo indivíduo. Os autores assumiram que a ausência de amplificação para as duas populações seria evidência de homologia. Para análise de distância entre colônias usou-se 29 iniciadores (*primers*), que produziram 139 bandas monomórficas e polimórficas, ou seja, 3 ou 4 bandas para cada *primer*. Os resultados mostraram alto grau de similaridade genética entre as amostras estudadas.

A utilização dos espaçadores transcritos internos do DNA ribossômico nuclear, região ITS1 em espécies de *Melipona*, para caracterização e análise filogenética foi conduzido por FERNANDES-SALOMÃO *et al.* em 2005. Os autores trabalharam com 8 espécies de *Melipona*, oriundas de 4 estados brasileiros: Minas Gerais, Piauí, Goiás e Bahia. Os resultados mostraram uma pequena variação no número de pares de bases, oscilando entre 1.391 e 1.417pb, e a ocorrência de repetição de elementos em 1, 2, 3 e 4 nucleotídeos. Ao final os autores concluíram que as relações filogenéticas derivadas da seqüência ITS1, corroboraram com a classificação taxonômica do gênero *Melipona*, com base nos caracteres morfológicos das abelhas.

Trabalhando com os espaçadores transcritos internos (ITS1) parciais, CRUZ *et al.* (aceito 2005), estudaram *M. subnitida*, uma abelha sem ferrão, amplamente conhecida no nordeste brasileiro e principalmente no estado do Ceará como Jandaíra, obtiveram amostras de diversas localidades da Região Nordeste, e concluíram a ocorrência de variabilidade dentro da espécie, naquelas populações, porém não suficientes para proporcionar diversidade específica.

A cariotipagem em *M. mandacaiá* foi comentada por ROCHA *et al.* (2003), descrevendo o cariótipo de 40 abelhas coletadas na cidade de Irecê no estado da Bahia. A descrição do cariótipo foi procedida por Banda-C, marcação por fluorocromo e tratamento de enzimas de restrição. Os resultados revelaram que a heterocromatina detectada na região pericentrométrica dos pares 1, 2 e 8 forma pequenos blocos e os marcadores de fluorocromo mostraram que a heterocromatina é rica em AT, exceto na região correspondente a NOR, que é rica em GC. Para o tratamento de sítios de restrição, usou-se a enzima *Hae* III, e os resultados apresentaram alta complexidade da natureza da heterocromatina.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Localização dos experimentos / locais de coleta**

#### **5.1.1. Chapada do Araripe, Ceará**

A chapada do Araripe está situada no sul do Estado do Ceará, e divide o território dos Estados do Ceará, Pernambuco e Piauí. Esta localizada geograficamente nas coordenadas 39°00'-40°50' Oeste e 7°15'-7°50' Sul. Tem origem mesozóica, possui uma área de 2.580 km<sup>2</sup>, e distâncias de 180 km (leste-oeste) e 70 km (norte-sul), sua altitude localiza-se entre 850 e 900m, seu solo predominante é o Latossolo Distrófico Vermelho-amarelo. (Figuras 09 e 10). Sua pluviosidade é de cerca de 1.000 mm/ano, com temperatura média de 24°C. (IPLANCE, 2004).

#### **5.1.2. Chapada da Ibiapaba, Ceará**

A chapada do Ibiapaba está situada no oeste do Estado do Ceará, e divide o território dos Estados do Ceará e Piauí. Esta localizada geograficamente nas coordenadas 40°50'-41°50' Oeste e 3°50'-7°00' Sul. Sua altitude localiza-se entre 680 e 902m, seu solo predominante é Areias Quartzosas Distróficas, Solos Litólicos e Latossolo Vermelho-Amarelo (Figuras 09 e 10). Sua pluviosidade relata valores acima de 1.900 mm/ano, com temperatura média de 24°C. A vegetação composta de Carrasco e Floresta Subperenifólia Tropical Pluvio-Nebular e estratificada conforme a altitude (IPLANCE, 2004).

### **5.1.3. Canto do Burití, Piauí**

O município de Canto do Buriti, antes pertencente ao município de São João do Piauí, está situado no sudoeste piauiense, mais precisamente na microregião de São Raimundo Nonato. Suas coordenadas geográficas são 08°06'36,0" S e 42°56'40,0" O, com altitude de 269m acima do nível do mar, área corresponde a 4.419,39km<sup>2</sup>, e média térmica registra 25°C. Possui vegetação do tipo cerrado e cerradão ([www.pi.gov.br](http://www.pi.gov.br)).

### **5.1.4. Luziânia, Goiás**

O município de Luziânia está localizado a 16°15'09,0" S e 47°57'01,0" O. Situado na micro região sul 355, no planalto goiano, faz parte do chamado Entorno do Distrito Federal. As temperaturas anuais circulam em torno da média de 21,1°C. Os índices pluviométricos variam entre 1.000 e 1.500mm anuais, sua altitude é de 930 metros acima do nível do mar. A vegetação predominante é cerradão, cerrado, campo-cerrado e campo, com árvores baixas de feição tortuosa ([www.seplan.go.gov.br](http://www.seplan.go.gov.br)).

## **5.2. Coleta das abelhas**

As abelhas para análise foram obtidas de várias colônias silvestres, em localidades distintas da Chapada do Araripe-CE (600 km da capital), Chapada da Ibiapaba-CE (300 km de Fortaleza), cidade de Canto do Burití-PI (1000 km de Fortaleza) e Luziânia-Goiás (1.500 km de Fortaleza) (Figuras 09 e 10). O número mínimo de abelhas a ser amostrada por colônia foi de 20 operárias (Tabela 2).

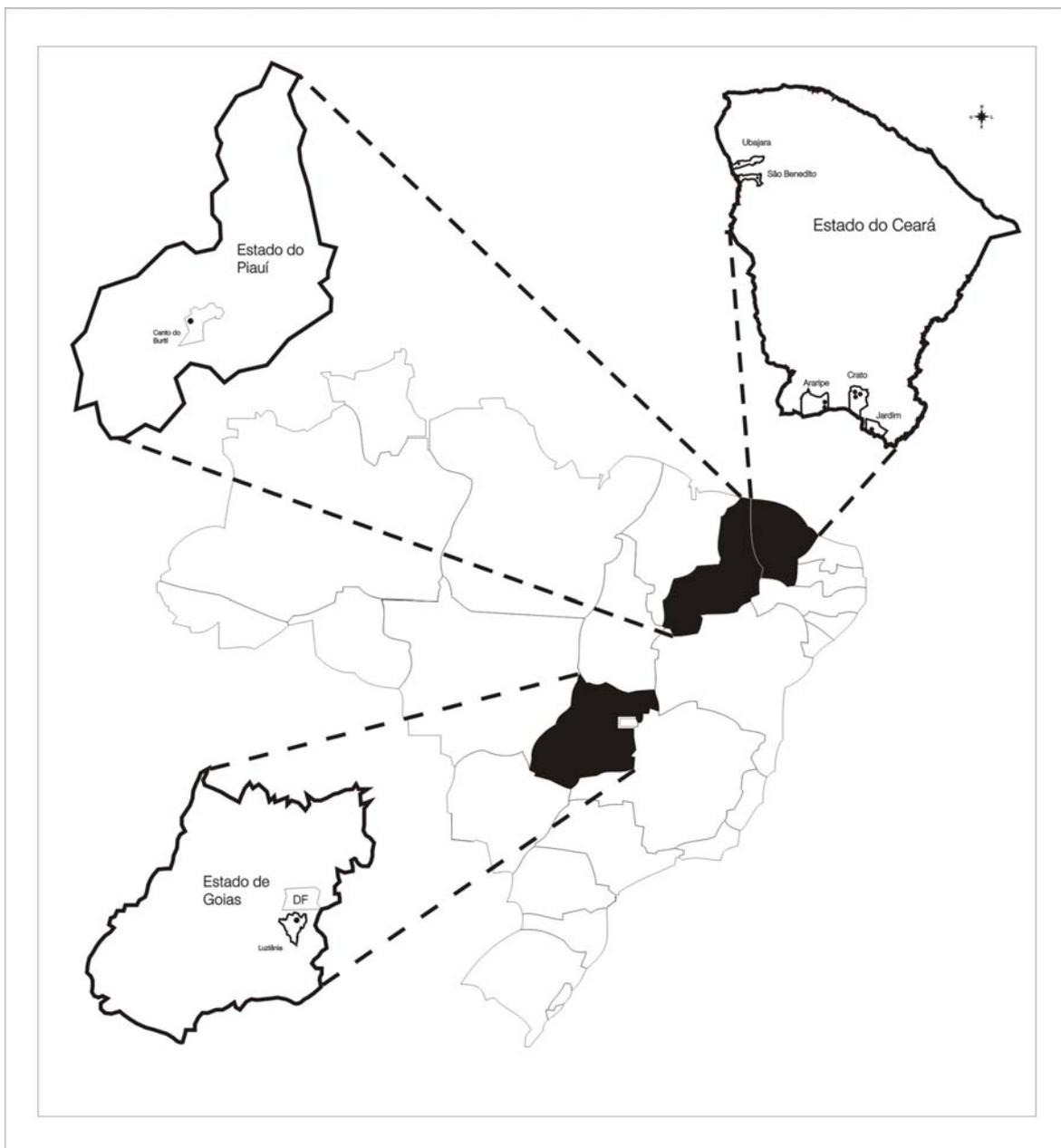


Figura 09: Localidades de coleta das amostras seqüenciadas de *Melipona quinquefasciata* nos estados do Ceará, Piauí e de Goiás.



Figura 10- Identificação cartográfica dos locais de coleta das amostras sequenciadas de *Melipona quinquefasciata* no estado do Ceará.



Figura 11 - Ação antrópica, causando impacto sobre as colônias remanescentes de *Melipona quinquefasciata*; momento de coleta de abelhas na Chapada da Ibiapaba, Ceará.

A localização das colônias se deu basicamente de duas maneiras, a primeira por meio de informações já disponíveis nos estudos anteriores que relatavam através de georeferenciamento os pontos de nidificação nas chapadas do estado do Ceará. A segunda maneira de obtenção das colônias foi a prospecção em campo, através de várias expedições de coleta de amostras. As demais amostras comparadas foram fornecidas pelo Professor Paulo Nogueira Neto, amostra esta originada de uma colônia de Luziânia no estado de Goiás, a qual ele transportou para São Simão, no estado de São Paulo, e pelo engenheiro agrônomo e apicultor Francisco das Chagas Ribeiro Filho (Chicão), que forneceu as amostras referentes ao estado do Piauí, coletadas em Canto do Buriti.

A captura das abelhas foi realizada com o auxílio de uma rede entomológica, e em alguns casos pôde se constatar em loco, a ação antrópica sobre as colônias de *M. quinquefasciata* (Figura 11). No entanto, em outros casos

se fez necessária além da rede entomológica (Figura 12), uma escavação do local de nidificação da colônia, para acelerar o processo de coleta, quando se tratava de colônias extremamente tímidas. Após o primeiro contato, não apresentavam fluxo de abelhas na entrada da colônia (Figura 13) e por isso se fez necessária a coleta do ninho. Após esta escavação, o túnel de acesso era reconstruído com o auxílio de varetas de madeira, medindo aproximadamente o mesmo diâmetro (cerca de 1,5 a 2,0cm) da entrada da colônia, e de comprimento aproximado ao total escavado, para que desta forma, as abelhas retomassem seu comportamento natural (Figura 13), e que o ninho fosse também preservado para futuros estudos. Após a coleta das amostras, as abelhas eram então acondicionadas em tubos tipo Falcon, contendo etanol, podendo também, na sua falta, utilizar um recipiente limpo e rosqueado contendo álcool comum. Este procedimento se fez necessário para assegurar ou minimizar a degradação do material genômico, pela ação das dnases, alterando a qualidade final do resultado do seqüenciamento. Também durante as coletas as amostras foram rotuladas, com relação ao local, georeferenciando com o auxílio de um GPS, a propriedade/cidade, e anotando horário e data de coleta, coletor e número de abelhas amostradas, já que em alguns locais a escassez de amostras foi verificada (Figuras 13 e 14). Logo após a coleta, o material foi transportado, o mais rápido possível, para o laboratório do Grupo de Pesquisas com Abelhas - UFC, sendo então tombado e depositado no Museu de Abelhas (Figura 15). Parte deste material foi conservado em geladeira, até seu uso posterior no Laboratório de Citogenética e Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, onde se procederam as fases de extração, seqüenciamento e análise do DNA.



Figura 12- Coleta da amostra de *M. quinquefasciata*, com rede entomológica na entrada do ninho.



Figura 13- Coleta de amostras, escavação e registro por GPS da colônia de *Melipona quinquefasciata*.



Figura 14- Tubo tipo Falcon, usado para transporte e armazenamento após a coleta das amostras de abelhas.

Tabela 2 – Histórico das coletas de amostras de *Melipona quinquefasciata*, nos estados do Ceará, Piauí e Goiás.

Número da amostra	Amostra	Local de Coleta	Nº de abelhas coletadas	Data da coleta	Coordenada Geográfica	Altitude (m)	Número na Coleção
1	Flona 1	Crato, CE.	8	29/10 a 04/11/2004	07°09'30,6" S 39°32'40,1" O	760	MGPA0803
2	Flona 2	Crato, CE.	18	29/10 a 04/11/2004	07°09'35,2" S 39°32'42,1" O	765	MGPA0903
3	Flona 3	Crato, CE.	12	29/10 a 04/11/2004	07°09'33,4" S 39°32'40,9" O	758	MGPA1003
4	Chapada 1	Crato, CE.	17	29/10 a 04/11/2004	07°09'44,0" S 39°32'40,5" O	790	MGPA1103
5	Chapada 2	Crato, CE.	17	29/10 a 04/11/2004	07°09'42,0" S 39°32'40,7" O	801	MGPA1203
6	Chapada 3	Crato, CE.	15	29/10 a 04/11/2004	07°09'43,0" S 39°32'40,3" O	794	MGPA1303
7	Jardim 1	Jardim, CE.	18	29/10 a 04/11/2004	07°29'44,0" S 39°21'13,5" O	815	MGPA0204
8	Jardim 2	Jardim, CE.	11	29/10 a 04/11/2004	07°29'44,1" S 39°21'13,6" O	815	MGPA0304
9*	Goiás	Luziânia, GO.	25	04/09 a 13/09/2004	16°15'09,0" S 47°57'01,0" O	930	MGPA0404
10	Ubajara	Ubajara, CE.	28	18/10 a 01/11/2004	03°50'32,0" S 41°04'48,8" O	680	MGPA0504
11	Araripe 1	Araripe, CE.	20	29/10 a 04/11/2004	07°19'55,8" S 39°54'13,6" O	885	MGPA0604
12	Araripe 2	Araripe, CE.	22	29/10 a 04/11/2004	07°19'26,3" S 39°54'16,0" O	896	MGPA0704
13	Araripe 3	Araripe, CE.	25	29/10 a 04/11/2004	07°19'24,0" S 39°54'19,0" O	891	MGPA0804
14	Araripe 4	Araripe, CE.	23	29/10 a 04/11/2004	07°19'24,6" S 39°54'14,2" O	891	MGPA0904
15	Araripe 5	Araripe, CE.	20	29/10 a 04/11/2004	07°19'23,4" S 39°54'14,8" O	885	MGPA1004

Continuação

Tabela 2 – Histórico das coletas de amostras de *Melipona quinquefasciata*, nos estados do Ceará, Piauí e Goiás.

Número da amostra	Amostra	Local de Coleta	Nº de abelhas coletadas	Data da coleta	Coordenada Geográfica	Altitude (m)	Número na Coleção
16*	Guaraciaba do Norte	Guaraciaba do Norte, CE.	9	20/09/2005	04°10'01,0" S 40°44'51,0" O	902	MGPA0105
17*	São Benedito	São Benedito, CE.	10	20/10/2005	04°02'55,0" S 40°51'54,0" O	901	MGPA0205
18*	Piauí 1	Canto do Buriti, PI.	10	10/12/2005	08°06'36,0" S 42°56'40,0" O	269	MGPA0305
19*	Piauí 2	Canto do Buriti, PI.	10	10/12/2005	08°06'36,0" S 42°56'40,0" O	269	MGPA0405
20*	Piauí 3	Canto do Buriti, PI.	10	10/12/2005	08°06'36,0" S 42°56'40,0" O	269	MGPA0505
21*	Piauí 4	Canto do Buriti, PI.	11	10/12/2005	08°06'36,0" S 42°56'40,0" O	269	MGPA0605
22*	Piauí 5	Canto do Buriti, PI.	11	10/12/2005	08°06'36,0" S 42°56'40,0" O	269	MGPA0705

\* o georeferenciamento levou em consideração a sede do município.

### 5.3. Isolamento do DNA genômico

O DNA genômico foi obtido a partir do mesossoma das abelhas coletadas, eliminando-se as asas, cabeça e metassoma. A metodologia foi baseada na técnica descrita por Murray & Thompson (1980 *apud* Sambrook *et al.*, 1989), que utiliza o reagente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), entretanto foram feitas algumas modificações para adaptar-se ao nosso material (Figura 16).

Foram utilizados em média 5 (cinco) tórax de *M. quinquefasciata*, podendo este valor ser menor devido à quantidade de amostras disponíveis para esta extração, já que em alguns locais a coleta de abelhas foi reduzido. O material foi macerado com auxílio de gral e pistilo na presença de nitrogênio líquido.

O pó obtido na maceração foi transferido para um tubo *ependorf* estéril de 2 ml contendo 500 µl do tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2% (v/v) e 2-mercaptoetanol 0,2 %) e 6,3 µL de proteinase K (a partir de uma solução estoque 20 mg/mL), já aquecido à uma temperatura de 65 °C. O extrato foi incubado a 65° C por um tempo máximo de duas horas.

Após essa etapa, foram adicionados 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (1:25:1, v/v, pH 4) ao tubo contendo o material ao qual se desejava extrair o DNA, sendo misturado por inversão. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação a 8.000 rpm, durante 18 minutos numa centrífuga MiniSpin (*Eppendorf*), para que a fase aquosa (superior) e orgânica (inferior) fossem separadas.



A fase aquosa foi transferida para um tubo limpo e foram acrescentados 500  $\mu$ L de clorofórmio:álcool isoamílico (25:1, v/v) ao tubo contendo o material ao qual se desejava extrair o DNA, sendo misturado por inversão. Posteriormente, foi realizada uma nova centrifugação a 8.000 RPM, durante 18 minutos numa centrífuga MiniSpin (*Eppendorf*), para que a fase aquosa (superior) e orgânica (inferior) fossem separadas. A fase aquosa foi transferida para um tubo limpo e foi acrescentado 1ml de etanol 95% gelado, para que ocorresse a precipitação dos ácidos nucléicos. Os tubos foram incubados a 4°C durante a noite toda. O precipitado de ácidos nucléicos obtido foi coletado por centrifugação (8.000 rpm, durante 20 minutos), o precipitado foi então lavado com etanol 70%, sendo ressuspenso em 50  $\mu$ l de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, contendo EDTA 1 mM (Tampão TE). Esta solução final tornou-se o estoque de DNA genômico da abelha.

#### **5.4. Eletroforese de DNA em gel de agarose a pH neutro**

Para constatação do sucesso do processo anterior, o DNA genômico e os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e 1%, respectivamente.

O gel de agarose foi preparado em TBE 0,5X (Tris-Borato 45mM, EDTA 1mM), contendo brometo de etídio (EtBr) 0,5  $\mu$ g/ml, 60°C, de acordo com o protocolo descrito por Sambrook et al. (1989). O tampão de corrida utilizado foi TBE 0,5X, e a corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 100V.

Em cada poço do gel foram aplicados 5µl do produto de amplificação da PCR, preparado com 2µl do tampão de amostra (glicerol 30%, TE pH 8,0, azul de bromofenol 0,25%) (Figura 17). A eletroforese foi finalizada quando o azul de bromofenol alcançou 2/3 do comprimento total do gel. Após a eletroforese, as bandas de DNA foram visualizadas com luz UV (302nm) em um transluminador MacroVue (*Pharmacia Biotech*) e o gel fotografado com máquina polaróide GelCam.

Os marcadores de pesos moleculares utilizados foram DNA  $\lambda$  digerido com *Hind* III, e DNA  $\phi$ X-174 digerido com *Hae* III (*Pharmacia Biotech* do Brasil).

### 5.5. Amplificação do gene do rRNA 18S por reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)

O fragmento de DNA correspondente à região 18S do rDNA (Figura 18) foi amplificado por PCR utilizando-se como substrato, DNA genômico previamente isolado e oligonucleotídeos (*Invitrogen*) específicos às extremidades que flanqueiam a região 18S (Tabela 3 e Figura 19).

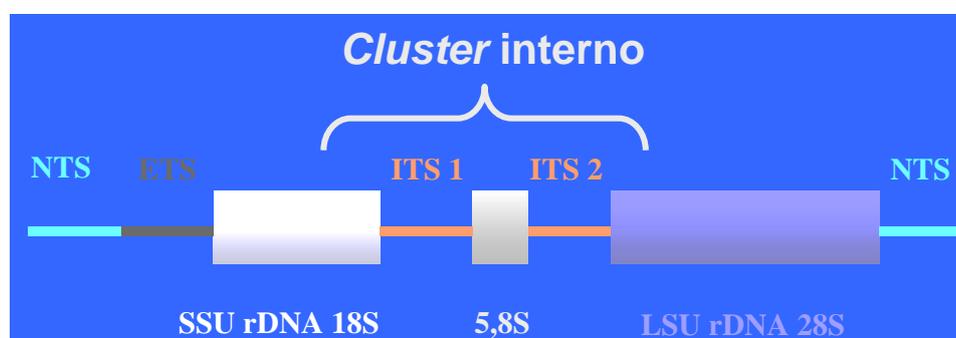


Figura 18 - Esquema da organização dos genes rDNA em eucariontes. ETS – “external transcribed spacer”, ITS – “internal transcribed spacer” e NTS – “nontranscribed spacer”.

Em um tubo *ependorf* estéril *Axygen Scientific* (EUA) foram misturados os componentes nos volumes especificados Na reação de PCR foi utilizado um controle negativo, que continha água no lugar do DNA e o restante dos componentes (Tabela 4).

O processo de amplificação ocorreu numa reação com volume final de 50  $\mu$ l no termociclador PTC-200 (*MJ Research Inc.*, EUA) utilizando o programa batizado por “abelhas” que possui nove ciclos (Tabela 5). Após o último ciclo, as amostras permaneceram estocadas a 4°C no termociclador até que fossem estocadas em freezer a 0°C. Para análise do produto da reação, uma alíquota de 5  $\mu$ l foi removida e submetida à eletroforese em gel de agarose a 1%, como descrito anteriormente.

Tabela 3- Nome, seqüência dos oligonucleotídeos e sentido do anelamento utilizados para amplificação da região-alvo rDNA 18S.

Oligonucleotídeos utilizados	Seqüência dos oligonucleotídeos	Sentido do anelamento
18SF1	GTCATATGCTTGTCTCAAAGA	5'→3'
18SR1.1	TCTAATTTTTTCAAAGTAAACGC	3'→5'
18SF2	TAATTCCAGCTCCAATAG	5'→3'
18SR2	CCACCCATAGAATCAAGA	3'→5'
18SF3	GGCACCACCAGGAGTGGA	5'→3'
18SR3	CAATGATCCTTCCGCAGG	3'→5'

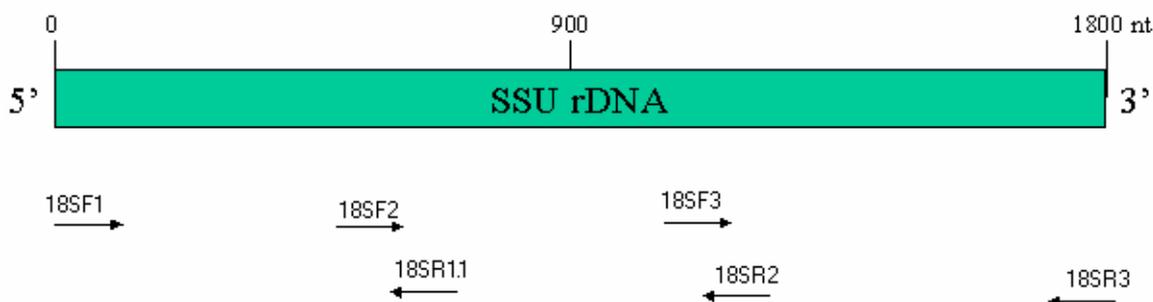


Figura 19 - Representação esquemática do anelamento dos oligonucleotídeos nas suas respectivas regiões rDNA 18S ou gene do rRNA SSU.

Tabela 4- Constituintes e volumes utilizados na preparação das reações de PCR para amplificação do seguimento do rDNA 18S.

Componentes da reação de PCR	Volume utilizado
Tampão de reação 10X*	5,0µl
Mistura de dNTP's (1,25mM cada)	10,0µl
Oligonucleotídeo 5' (5µM)	5,0µl
Oligonucleotídeo 3' (5µM)	5,0µl
DNA genômico (100ng/ml)	10,0µl
H <sub>2</sub> O miliq estéril	14,5µl
<i>Taq</i> DNA polimerase (5U/µl)	0,5µl

\* Tris-HCl 100mM pH 9,0, MgCl<sub>2</sub> 15mM e KCl 500mM

\*\* O volume de DNA genômico utilizado variou de acordo com a concentração do DNA, mantendo-se a concentração final em torno de 1000 ng por reação.

Tabela 5 – Condições de amplificação da região do rDNA 18S, programa “abelha”.

Ciclos	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1°	Desnaturação	95	3
2°	Anelamento	50	1
3°	Extensão	72	1
4°	Desnaturação	95	1
5°	Anelamento	50	1
6°	Extensão	72	1
7°	Ir para o ciclo 4°, 33 vezes	-	-
8°	Extensão	72	9
9°	Manutenção da temperatura	4	∞

### 5.6. Amplificação do gene do rRNA ITS1 parcial por reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)

O fragmento de DNA correspondente à região do rRNA ITS1 parcial foi amplificado por PCR utilizando-se como substrato, DNA genômico previamente isolado e oligonucleotídeo (*Invitrogen*) específico (Figura 18 e Tabela 6). Em um tubo *ependorf* estéril *Axygen Scientific* (EUA) foram misturados os componentes nos volumes especificados (Tabela 7). Na reação de PCR foi utilizado um controle negativo, que continha água no lugar do DNA e o restante dos componentes.

O processo de amplificação ocorreu numa reação com volume final de 50 µl no termociclador PTC-200 (MJ *Research* Inc., EUA) utilizando o programa chamado “abelha” que possui nove ciclos (Tabela 8). Após o último ciclo, as amostras permaneceram a 4°C no termociclador até que fossem estocadas em

freezer a 0°C. Para análise do produto da reação, uma alíquota de 5 µl foi removida e submetida à eletroforese em gel de agarose a 1%, como descrito anteriormente.

Tabela 6- Nome, seqüência do oligonucleotídeo e sentido do anelamento utilizado para amplificação da região-alvo rDNA ITS1.

Oligonucleotídeo utilizado	Seqüência do oligonucleotídeo	Sentido do anelamento
ITS 2	TCCTCCGCTTATTGATATGC	3'→5'
ITS 5	GCAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	5'→3'

Tabela 7- Constituintes e volumes utilizados na preparação das reações de PCR para amplificação do seguimento parcial do rDNA ITS1.

Componentes da reação de PCR	Volume utilizado
Tampão de reação 10X*	5,0µl
Mistura de dNTP's (1,25mM cada)	10,0µl
Oligonucleotídeo 3' (5µM)	10,0µl
DNA genômico (100ng/ml)	10,0µl
H <sub>2</sub> O miliq estéril	14,5µl
<i>Taq</i> DNA polimerase (5U/µl)	0,5µl

\* Tris-HCl 100mM pH 9,0, MgCl<sub>2</sub> 15mM e KCl 500mM

\*\* O volume de DNA genômico utilizado variou de acordo com a concentração do DNA, mantendo-se a concentração final em torno de 1000 ng por reação.

Tabela 8 – Condições de amplificação da região do rDNA ITS1 parcial, programa “abelha”.

Ciclos	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1°	Desnaturação	95	3
2°	Anelamento	50	1
3°	Extensão	72	1
4°	Desnaturação	95	1
5°	Anelamento	50	1
6°	Extensão	72	1
7°	Ir para o ciclo 4°, 33 vezes	-	-
8°	Extensão	72	9
9°	Manutenção da temperatura	4	∞

### 5.7. Seqüenciamento de DNA

Os produtos de PCR (fragmentos de DNA) amplificados tiveram uma diluição variando de 1:2 a 1:10, dependendo da concentração de DNA amplificado, com água destilada estéril. Logo após a diluição foram submetidos a reações de seqüenciamento pelo método da terminação da cadeia pelo didesoxinucleotídeo (SANGER, 1977, *apud* Sambrook *et al.*, 1989), em reações de 10,0µl de acordo com as especificações do fabricante do kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences). Ao término da reação de seqüenciamento, os produtos foram precipitados por centrifugação com sulfato de

amônio 7,5M e precipitados com etanol 100%, para a remoção de sais e componentes do kit não incorporados.

Para cada uma das amostras estudadas a região correspondente ao rDNA 18S e ITS1 parcial, foram seqüenciadas no mínimo quatro vezes para aumentar a confiabilidade nos resultados obtidos. Quatro dessas seqüências eram correspondentes às reações de seqüenciamento na orientação 5'-3', e as outras quatro seqüências eram correspondentes às reações na orientação 3'-5'; para a região 18S, e para região parcial do ITS1, as reações ocorreram na orientação 5'-3'.

As amostras foram submetidas a um seqüenciador automático (*MEGABACE 1000, Amersham Biosciences*) nas seguintes condições de injeção: 2 KV por 65 segundos, 2 KV por 75 segundos e 2 KV por 60 segundos.

## **5.8. Análise dos dados**

A análise dos dados obtidos do seqüenciamento foi feita de forma inicial por uma série de programas, "MEGABACE™ DNA Sequencing System" (*Amersham Biosciences*), que forneceram dois tipos principais de dados: a seqüência de nucleotídeos composta pelas quatro bases nitrogenadas (A, T, G e C), e um eletroferograma que é a representação gráfica do sinal de cada ddNTPs detectado pelo laser, representando cada nucleotídeo incorporado na seqüência. Na geração das seqüências finais, o programa excluiu as regiões que ele considerou de baixa qualidade, que seriam as regiões que possuíam sítios

nucleotídicos de baixo sinal, sendo apenas as seqüências de boa qualidade consideradas.

### **5.9. Montagem das seqüências consenso**

O processo de determinar uma seqüência a partir de dados brutos do seqüenciamento é chamado de *basecalling*. O resultado bruto do seqüenciamento é um registro das intensidades das fluorescências em cada posição em um gel de seqüenciamento (GIBAS & JAMBECK, 2001). Os dados brutos provenientes do seqüenciamento de todas as amostras foram submetidos a um pacote de programas para montagem e obtenção de seqüências consenso. O pacote de programas utilizado para a leitura dos dados brutos e montagens das seqüências consenso foi o Phred (EWING, 1998a, 1998b), e o Phrap (Phil Green, *University of Washington*). O programa Phred lê todos os dados brutos do seqüenciamento utilizando análise de Fourier, e calcula a probabilidade de erro para cada *base call*. Os escores do Phred são na forma de logaritmo negativo da probabilidade de que aquele *base call* é um erro. Portanto, quanto maior for o escore do Phred, menor é a probabilidade que um erro tenha sido cometido (BROWN, 2000; GIBAS & JAMBECK, 2001). O programa Phrap, então utiliza essas probabilidades de erro para determinar seqüências consenso altamente precisas, pela utilização da seqüência de mais alta qualidade em cada posição para construir o consenso (BROWN, 2000). As seqüências consenso montadas pelo programa Phrap, foram então visualizadas e editadas pelo programa de interface gráfica Consed (GORDON *et al.*, 1998; 2001) (Figura 20).



Figura 20 – Visualização através do programa Consed das montagens das seqüências consenso realizadas pelo pacote de programas Phred e Phrap.

### 5.10. Alinhamento múltiplo e edição das seqüências

As seqüências consensos obtidas foram submetidas à busca por similaridade no *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) através do programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990), visando-se assim, determinar se as seqüências obtidas se referiam àquelas desejadas e determinar a similaridade destas com seqüências já depositadas no referido banco de dados. O alinhamento múltiplo de todas as seqüências foi realizado com o auxílio do programa CLUSTALX, versão 1.82 (THOMPSON *et al.*, 1997).

As edições dos alinhamentos, ou seja, as remoções ou inserções de *gaps* adicionais foram realizadas manualmente, com o auxílio do programa Bioedit, versão 5.0.9. (HALL, 1999).

Para ampliar as possibilidades de comparação, foram obtidas do *GenBank* 13 seqüências parciais da região ITS1 de *M. subnitida*, espécie pertencente ao mesmo gênero da *M. quinquefasciata*, anteriormente depositadas por CRUZ *et al.* (2005) (acessos DQ078726 ao DQ078738). Outras seqüências da Região ITS1 parcial de três Melíponas também foram agregadas ao alinhamento, são elas: *M. quadrifasciata*, *M. mandaçaia* e *M. scutellares*. Essas seqüências foram obtidas de FERNANDES-SALOMÃO (2005). Ao total o alinhamento constou de 25 seqüências da região ITS1 parcial.

### 5.11. Teste do Modelo (Model test e DAMBE)

Após o alinhamento múltiplo de todas as seqüências, a análise de saturação de substituições foi realizada com o auxílio do programa DAMBE (*Data Analysis Molecular Biology and Evolution*) versão 4.065 (XIA & XIE, 2001).

As análises de agrupamento foram realizadas tomando como partida o alinhamento múltiplo final de todas as seqüências. O primeiro teste realizado foi o teste do modelo, utilizando o programa Model Test (POSADA & CRANDALL, 1998), que é executado como uma sub-rotina do programa PAUP\* (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) (SWOFFORD, 1998). Este programa foi utilizado com o objetivo de verificar qual o modelo de substituição mais adequado aos dados obtidos.

### 5.12. Análises Filogenéticas

As análises de agrupamento envolvendo métodos de distância e de máxima parcimônia foram realizadas com o auxílio do programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) versão 2.1 (KUMAR *et al.*, 2001), utilizando distribuições  $\gamma$  (gamma), com parâmetro calculado pelo programa ModelTest. As análises de bootstrap, para testar a confiança nas topologias obtidas foram realizadas em todos os métodos utilizados. Para os métodos de distância foram realizadas 1000 repetições do conjunto de dados.

### 5.13. Teste de Mantel

A influência da distância geográfica sobre a similaridade genética das abelhas foi verificada por intermédio do teste de Mantel (SOKAL & ROHLF, 1995). Este teste realiza a aleatorização entre as matrizes. Se houver significância a 5%, concluímos que a distância geográfica está influenciando a composição das espécies em estudo, portanto o objetivo desta análise foi o de testar a autocorrelação espacial nas populações. O teste de Mantel foi realizado através do programa Mantel 2.0 (LIEDLOFF, 1999). A matriz de distância geográfica foi calculada por intermédio do programa GPS Trackmaker 11.7 (FERREIRA, 2001), a partir dos pontos georeferenciados.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Região 18S

#### 6.1.1. Extração de DNA genômico

O método de extração e isolamento de ácidos nucléicos foi baseado no reagente CTAB (Brometo de cetiltrimetilamonio), que é bastante citado na literatura como sendo um detergente capaz de extrair DNA de diversos organismos (WINNEPENNINCKZ *et al.*, 1998; STEINER & DREYER, 2002). Embora existam atualmente diversas metodologias de extração de DNA, que necessitem sofrer adequações a cada amostra coletada (LIMA, 2003; LOPES, 2004). Para amostras de abelhas esta metodologia mostrou-se eficiente no isolamento do DNA (Figura 21), corroborando as informações de ADAMKEWICZ *et al.* (1997) e FOSTER & TWELL (1996). Estes autores afirmam que a viabilidade de estudos moleculares envolvendo ácidos nucléicos depende da qualidade e quantidade do DNA extraído, considerando a extração como passo fundamental para obtenção de respostas moleculares confiáveis, já que os caracteres moleculares têm sido importantes ferramentas para resolução de problemas na sistemática moderna.

Nas extrações das abelhas utilizou-se somente o mesossoma (SILVESTRE, 2002), obtendo produtos da extração com alta qualidade (Figura 21 e Tabela 9). Em extrações piloto, nas quais foram utilizados o organismo inteiro observou-se em géis de eletroforese, a presença de um arrastado no padrão das

bandas eletroforéticas, indicando que o material genético extraído apresentava algum grau de degradação. Essa degradação pode estar vinculada à grande quantidade de enzimas encontradas no abdome das abelhas. Uma única banda, com pouca degradação, foi observada para todas as espécies estudadas. Dessa forma minimizaram-se os problemas nessa etapa que poderiam comprometer todo o processo, e estando em conformidade com BALDWIN *et al.* (1995), que cita que em estudos filogenéticos ou populacionais, a qualidade do DNA é de extrema importância devido às modificações ou degradações que ele poderá sofrer durante a sua extração e purificação.

Na eletroforese em gel de agarose a 0,8%, em presença de brometo de etídio, pode-se perceber a presença de uma única banda com tamanho de aproximadamente 23 Kb, com pouca degradação aparente (Figura 21).

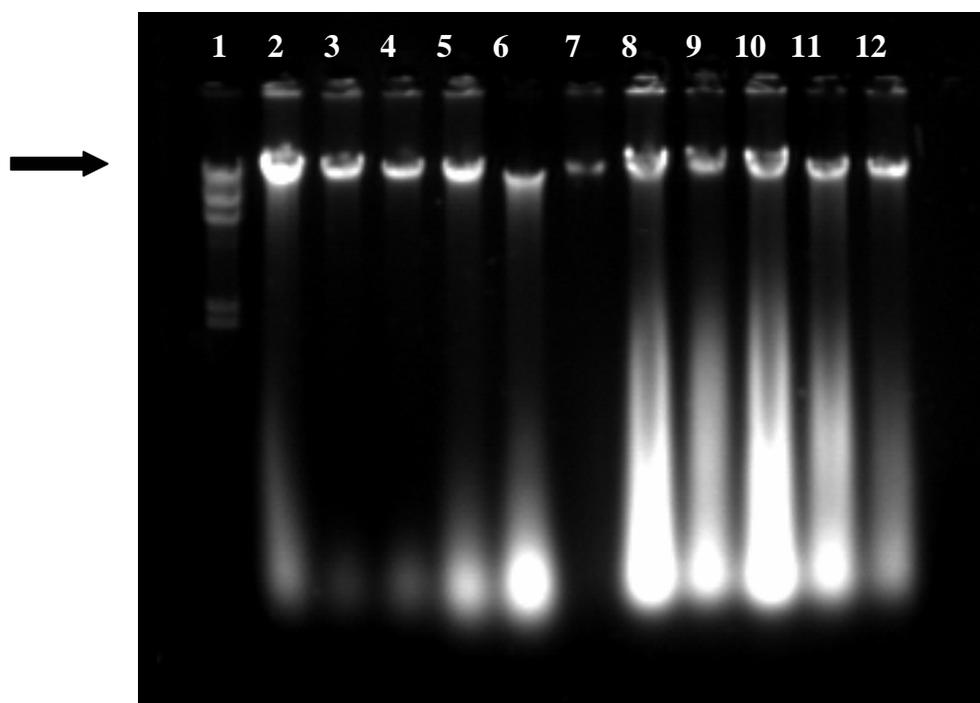


Figura 21– Eletroforese em agarose a 0,8% na presença de EtBr a 0,5 $\mu$ g/ml visualizado em UV, DNA extraído. Legenda dos poços: 1- Marcador molecular (DNA de fago  $\lambda$  digerido com Hind III Pharmacia Biotech); 2- Crato 1; 3- Crato 2; 4- Crato 3; 5- Jardim 1; 6- Goiás; 7- Ubajara; 8- Araripe 1; 9- Araripe 2; 10- Araripe 3; 11- Araripe 4; 12- Araripe 5.

Tabela 09- Concentração das amostras de DNA genômico obtidas de espécimes de *Melipona quinquefasciata* coletados em diferentes localidades dos estados do Ceará e Goiás.

Amostras	Local de coleta	Espécimes preservados em etanol 100%	A <sub>260</sub>	Concentração da solução estoque (ng/μl)
1	Flona 1	1	0,572 <sup>1</sup>	572
2	Flona 2	4	0,300 <sup>1</sup>	300
3	Flona 3	1	0,595 <sup>1</sup>	595
4	Chapada 1	5	0,432 <sup>1</sup>	432
5	Chapada 2	5	0,402 <sup>1</sup>	402
6	Chapada 3	5	-	288
7	Jardim 1	2	1,436 <sup>1</sup>	1.436
8	Jardim 2	10	1,502	1.502
9	Goiás	19	1,303 <sup>1</sup>	1.303
10	Ubajara	18	2,222 <sup>1</sup>	2.222
11	Araripe 1	21	1,522 <sup>2</sup>	3.044
12	Araripe 2	1	2,217 <sup>2</sup>	4.434
13	Araripe 3	14	2,205 <sup>2</sup>	4.410
14	Araripe 4	20	1,815 <sup>2</sup>	3.630
15	Araripe 5	6	1,193 <sup>2</sup>	2.386
16	Guaraciaba do Norte	4	1,135 <sup>2</sup>	1.135
17	São Benedito	4	2.250 <sup>1</sup>	225

<sup>1</sup>A<sub>260</sub> determinada em uma diluição 1:20 (v/v);

<sup>2</sup>A<sub>260</sub> determinada em uma diluição 1:40 (v/v)

### 6.1.2. Amplificação da região 18S do nrDNA

Foram utilizadas 6 (seis) amostras, escolhidas por localidade de coleta, levando-se em conta a representatividade, diante da proximidade geográfica, que por sua vez não afetaria a composição genética das amostras, pertencentes a mesma localidade. Utilizou-se então o parâmetro de 1 km de raio para agrupar

estas amostras. Para o caso de amostras únicas, estas foram usadas como padrão da região em estudo (Tabela 10).

Tabela 10– Dados gerais sobre as amostras escolhidas para estudo da região rDNA 18S das abelhas *Melipona quinquefasciata*.

Amostra	Local de Coleta	Coordenada Geográfica	Altitude (m)	Número na Coleção
Flona 2	Crato, CE.	07°09'35,2" S 39°32'42,1" O	765	MGPA0903
Chapada 3	Crato, CE.	07°09'43,0" S 39°32'40,3" O	794	MGPA1303
Jardim 1	Jardim, CE.	07°29'44,0" S 39°21'13,5" O	815	MGPA0204
Goiás	Luziânia, GO.	16°15'09,0" S 47°57'01,0" O	930	MGPA0404
Ubajara	Ubajara, CE.	03°50'32,0" S 41°04'48,8" O	680	MGPA0504
Araripe 3	Araripe, CE.	07°19'24,0" S 39°54'19,0" O	891	MGPA0804

Os produtos de PCR correspondentes à amplificação da região 18S do nrDNA foram visualizados a partir de uma eletroforese em gel de agarose 1%. Esta técnica é rápida, simples, e de grande sensibilidade para multiplicação *in vitro* de seqüências de DNA. Entretanto é necessário obter-se amostras de alta qualidade, isto é, pouca degradação e o menor número contaminantes, para então ocorrer a amplificação da(s) seqüência(s) alvo (GAMA, 1998). Isto foi de fato encontrado e constatado em nossos resultados, onde, a partir da análise da eletroforese em gel de agarose a 1%, a amplificação de um único fragmento de DNA correspondente a 600 pb em todas as amostras estudadas (Figura 22). As seqüências completas das amostras do nrDNA 18S estão apresentadas nos Anexos.

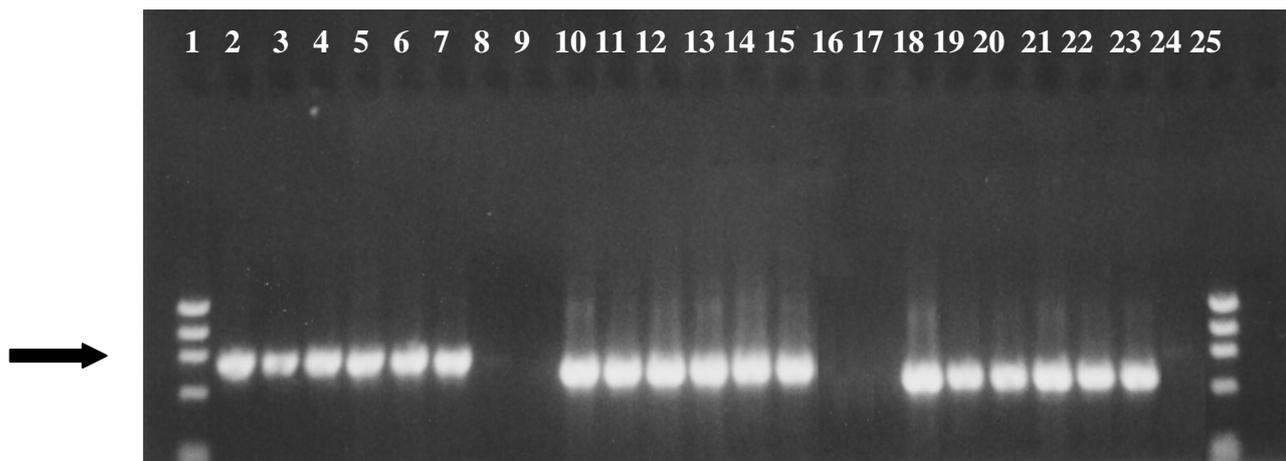


Figura 22 – Eletroforese em gel de agarose a 1% em presença de EtBr a 0,5µg/ml do produto de PCR da região 18S das amostras de *Melipona quinquefasciata*. Foram utilizados os iniciadores F1 e R1.1 nas amostras dos poços 2 a 8, iniciadores F2 e R2 nas amostras dos poços 10 a 16 e iniciadores F3 e R3 nas amostras dos poços 18 a 24. Nos poços 1 e 25 foram utilizados os marcadores moleculares de baixo peso  $\phi$ X-174 RF digerido com Hae III (Pharmacia Biotech). Legenda dos poços: 2- Crato 2; 3- Chapada 3; 4- Jardim 1; 5- Goiás; 6- Ubajara; 7- Araripe 3; 8- Amostra branco; 9- poço não aplicado; 10- Crato 2; 11- Chapada 3; 12- Jardim 1; 13- Goiás; 14- Ubajara; 15- Araripe 3; 16- Amostra branco; 17- poço não aplicado; 18- Crato 2; 19- Chapada 3; 20- Jardim 1; 21- Goiás; 22- Ubajara; 23- Araripe 3; 24- Amostra branco; 25- Marcador molecular  $\phi$ x174RF DNA/HAE III.

O seqüenciamento da região 18S do rDNA apresentou alta qualidade em todas as amostras, como era esperado. Os tamanhos das seqüências consenso obtidas pelos programas Phred, Phrap e Consed variaram de 1823 a 1869 pb para as seqüências do rDNA 18S (SSU rRNA), conforme a Tabela 11. O resultado da busca por similaridades, utilizando a ferramenta BLAST, no banco de dados do *GenBank* (NCBI – National Center for Biotechnology Information), de todas as seqüências consenso obtidas mostrou que todas elas realmente correspondiam às regiões desejadas. As maiores similaridades encontradas correspondiam às seqüências de espécies relacionadas ao grupo *Apidae*, confirmando o correto seqüenciamento das regiões desejadas.

As seqüências consenso foram comparadas, sendo obtida uma matriz com o número de diferenças (Tabela 16). Durante as análises, as amostras de *Melipona quinquefasciata* foram comparadas com a seqüência de *Melipona subnitida*, para verificação da diversidade. Conforme podia ser esperado, as

maiores diferenças nos nucleotídeos foram encontradas nas comparações inter-específicas em relação às intra-específicas.

Embora a análise do alinhamento dos nucleotídeos das amostras de *M. quinquefasciata* e *M. subnitida* tenha apresentado um número pequeno de mudanças entre todas as amostras, na análise intra-específica de *M. quinquefasciata* observou-se que as diferenças foram, na sua maioria, deleções e inserções, mudanças que ocorrem facilmente e que em pequena ocorrência como neste caso, não podem caracterizar especiações. Na comparação entre *M. subnitida* e *M. quinquefasciata*, observou-se mudanças do tipo substituições, mais características de espécies distintas.

Desta forma, as comparações entre as amostras de *Melipona quinquefasciata* de Goiás e do Ceará, demonstram tratar-se da mesma espécie, apesar do isolamento geográfico, confirmando a identificação morfológica da espécie encontrada no Ceará, por LIMA-VERDE & FREITAS (2002), como sendo de fato *M. quinquefasciata*. Outro resultado interessante obtido foi a constatação da proximidade genética verificada entre *M. quinquefasciata* e *M. subnitida*, observada basicamente no tipo, e não na quantidade, de mudanças nucleotídicas encontradas. Todavia, por se ter trabalhado com uma região muito conservada do DNA, diferenças mais significativas poderão vir a ser obtidas com estudos em seqüências mais variáveis.

A região 18S do nrDNA apresenta nas espécies da família Apidae um tamanho aproximado de 1800 pb o que dificulta a sua amplificação direta por PCR. Portanto foram utilizados três conjuntos (Tabela 3) de iniciadores específicos para determinadas regiões da seqüência-alvo, proporcionando três segmentos distintos. Os fragmentos apresentavam tamanho aproximado de 600

pb, livre de ampliações não específicas e em quantidade suficiente para o seqüenciamento.

### **6.1.3. Seqüenciamento do rDNA 18S (SSU rRNA) e obtenção das seqüências consenso**

Seqüências de alta qualidade foram obtidas a partir do produto de PCR de todas as amostras estudadas. As seqüências das amostras da região do rDNA 18S apresentaram, no processo de *basecalling* realizado com o programa Phred, uma boa qualidade.

O seqüenciamento da região do rDNA 18S realizado a partir de produtos de PCR teve como objetivo eliminar qualquer evidência de tipos divergentes, a seqüência de cada espécie estudada foi determinada 8 (oito) vezes. Os dados brutos gerados submetidos ao pacote de programas Phred/Phrap, eliminou todas as seqüências de má qualidade, identificando as seqüências de excelente qualidade para as análises de agrupamento. Seqüências de baixa qualidade podem possuir nucleotídeos inseridos incorretamente, o que poderia gerar inferências equivocadas ou até mesmo incorretas (ROKAS & HOLLAND, 2000).

O resultado da busca por similaridades, utilizando a ferramenta BLAST, no banco de dados do GenBank (NCBI – *National Center for Biotechnology Information*) das seqüências consenso obtidas mostrou que estas realmente correspondiam à região 18S do nrDNA. Os valores de E ou E *value* obtidos apresentaram-se próximos de 0 (zero), o que indica uma menor probabilidade destas seqüências terem sido obtidas por um mero acaso. Vale ressaltar que, os genes do DNA ribossômico nuclear evoluem lentamente, sendo assim, possuem

pouca variação das posições nucleotídicas entre os diversos organismos, podendo ser utilizado na reconstrução de filogenias de grupos mais distantes (COLEMAN & VACQUIER, 2002). Assim é importante enfatizar que essas foram as primeiras seqüências completas da região 18S do rDNA geradas para o gênero *Melipona*.

Tabela 11 – Relação das seqüências obtidas da região do rDNA 18S (SSU rRNA) das amostras estudadas, mostrando seus respectivos tamanhos em pares de bases e conteúdo G + C (Guanina + Citosina) e composição nucleotídica.

Amostra	Tamanho (pb)	Conteúdo G+C (%)	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)
Araripe 3	1864	49,8	25,3	22,8	24,9	27,0
Goiás	1856	49,8	25,2	22,7	24,9	27,1
Chapada 3	1823	50,3	25,0	23,0	24,7	27,3
Ubajara	1838	49,6	25,5	22,5	24,9	27,1
Jardim 1	1850	50,0	24,8	23,0	25,1	27,0
Flona 2	1869	50,1	25,1	22,9	24,8	27,2

A – Adenina, G – Guanina, C – Citosina e T – Timina.

#### 6.1.4. Alinhamento múltiplo de seqüências.

O alinhamento das seqüências consenso obtidas e as depositadas no *GenBank* revelou tanto a presença de remoções e inserções de nucleotídeos (*indels*) e de substituições de base do tipo transição e transversão. Durante o

processo de análise e edição das seqüências obtidas no laboratório e de todas as outras seqüências utilizadas, foram retiradas as extremidades da região 5' e 3' para que as seqüências ficassem aproximadamente do mesmo tamanho.

O alinhamento entre seqüências de ácidos nucleicos é, em essência, um procedimento pelo qual potenciais homologias podem ser inferidas e identificadas (PHILLIPS *et al.*, 2000; PAGE & HOLMES, 2001). Um pequena quantidade de *gaps* (espaços) foi necessária para alinhar as seqüências completas das abelhas com o grupo externo, demonstrando que as seqüências são muito conservadas.

Além disso, foram observadas no alinhamento, regiões que apresentam estrutura secundária altamente conservada correspondentes às regiões *stem* e regiões mais variáveis correspondentes ao *loop*.

#### **6.1.5. Análise do conteúdo GC**

No presente trabalho o conteúdo GC médio foi de 49,9%. A análise do conteúdo G+C é muito importante para as análises filogenéticas, pois regiões ricas em GC possuem maior estabilidade, pois possuem três pontes de hidrogênio, produzindo estruturas secundárias mais estáveis (BALDWIN *et al.*, 1995; GERNANDT & LISTON, 1999; GERNANDT *et al.*, 2001; PAGE & HOLMES, 2001) Outra hipótese indica que as diferenças na composição de bases seriam causadas por variações nos padrões de mutação (NAHUM, 2001).

### 6.1.6. Análises de agrupamento

O Teste do modelo calculado para análise dos dados das seqüências do nrDNA 18S obtidas foi o de Jukes-Cantor atribuindo o parâmetro da distribuição gamma ( $\gamma$ ). Este é capaz de incorporar heterogeneidade nas taxas de substituição nucleotídica ao longo dos sítios, pois se sabe que nem todos os sítios evoluem na mesma taxa (SCHNEIDER, 2003), e também incorporar heterogeneidade a Proporção de Sítios Invariáveis (I). (Tabelas 12 e 13). Esse modelo leva em consideração um grande número de parâmetros, atribuindo pesos maiores às transições, no entanto considerando freqüências de base iguais.

Tabela 12 – Características do alinhamento das seqüências do rDNA 18S (SSU rRNA) estudadas.

Características do Alinhamento	
Comprimento do Alinhamento	1886 pb
Divergência Média das Seqüências (Jukes-Cantor)	0,008
Nº de sítios conservados	1795
Nº de sítios variáveis	79
Nº de sítios informativos a parcimônia	34
Nº de sítios com mudança única	35
Transições (s)	10
Transversões (v)	20
Taxa de Transição / Transversão	0,5

Tabela 13 – Resultados do teste do modelo, utilizando o programa *ModelTest*, para os dados das seqüências do rDNA 18S (SSU rRNA).

Modelo selecionado:	Jukes-Cantor (+I +G)
(logaritmo da verossimilhança) $-\ln L$	3434,5190
Frequência de bases:	
Frequência de A =	0,2542
Frequência de C =	0,2254
Frequência de G =	0,2675
Frequência de T =	0,2529
Modelo de Substituição:	
Matriz de frequências:	
R(a) [A-C] =	1,0000
R(b) [A-G] =	0,7978
R(c) [A-T] =	1,0000
R(d) [C-G] =	1,0000
R(e) [C-T] =	0,5905
R(f) [G-T] =	1,0000
Variação entre Sítios:	
Proporção de sítios invariáveis (I) =	0,7841
Sítios variáveis (G)	
Parâmetro para a distribuição Gamma =	0,0952

### 6.1.7. Matriz de distância

A matriz de distâncias para a região 18S do nrDNA utilizando o modelo de Jukes-Cantor (Tabela 16), foi calculada pelo programa MEGA. A média encontrada para esta matriz de distância foi de 0,008. Nesta matriz podemos identificar que as amostras mais próximas foram Goiás e Araripe 3, com valores de 0,003, as amostras mais distantes foram Chapada 3 e Araripe 3, apresentando uma diferença genética de 0,0115. Os valores encontrados retratam um alto grau

de proximidade entre as amostras, sugerindo que todas as amostras são pertencentes à mesma espécie, tomando como parâmetro a região 18S.

Tabela 14- Matriz de distância genética (região 18S) para *Melipona quinquefasciata* coletada em seis localidades dos estados do CE, PI e GO, gerada a partir do modelo de Jukes-Cantor.

Amostra	Araripe 3	Goiás	Chapada3	Ubajara	Jardim1	Flona2
Araripe 3						
Goiás	0,0034					
Chapada 3	0,0115	0,0096				
Ubajara	0,0109	0,0077	0,0083			
Jardim 1	0,0071	0,0064	0,0096	0,0071		
Flona 2	0,0102	0,0083	0,0040	0,0089	0,0096	

### 6.1.8. Árvore filogenética

A partir da matriz de distância, a árvore filogenética foi obtida, utilizando o método de distância do vizinho próximo (*Neighbor-joining*) (Figura 23).

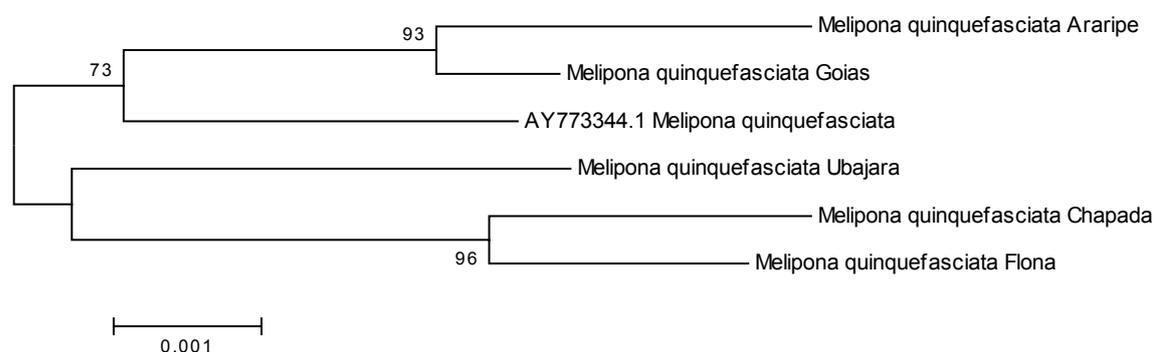


Figura 23 - Cladograma agrupando as seqüências obtidas. Árvore consenso obtida a partir do método NJ com *bootstrap* de 500 replicações.

Estes resultados da árvore gerada pelos seqüenciamentos da região 18S convergem para aceitação da hipótese de que as amostras estudadas pertencem a um clado único. Resultados como este apóiam a idéia de que, um grande número de trabalhos utilizando estudos moleculares são publicados na tentativa de propor uma melhor classificação ou melhorar a atual para os táxons constituintes do grupo das abelhas (LEYS, 2002; COSTA *et al.*, 2003). É importante ressaltar que ainda não tinha havia feito nenhum estudo com essas seqüências dentro da ordem Hymenoptera, entretanto essa região foi utilizada em estudos anteriores numa revisão do artrópodos (GIRIBET & RIBERA, 2000).

Em relação aos alinhamentos das seqüências, as substituições nucleotídicas mais freqüentes foram as mudanças de A para G e T para C. Essas são mudanças do tipo transição que normalmente ocorrem com maior freqüência e que aumentam a estabilidade da estrutura secundária. Tais mudanças têm sido identificadas em outros trabalhos, com seqüências 18S (LIMA, 2003, LOPES, 2004) como sendo as mais freqüentes.

Nas seqüências de 18S, a evolução (variações nucleotídicas) ocorrem de maneira diferente, pois pequenas mudanças, podem causar grandes alterações na estrutura do ribossomo, e é por isso que nas seqüências ribossômicas ocorrem mudanças compensatórias (MARQUES, 2004; MOUNT, 2004) para que não ocorram mudanças na estrutura. Dessa forma, é de se esperar tais taxas de substituições. A alta conservação da região do rDNA 18S também é comprovada nos resultados apresentados nas Tabelas 12 e 13, onde podemos verificar o número de sítios conservados e variáveis. No entanto, foi observado que o número de sítios variáveis aumentou do primeiro para o segundo grupo. Isto pode ser explicado pelo aumento do número de seqüências e o aumento do nível

taxonômico. Em relação ao uso da distribuição  $\lambda$  (gamma), esta é aplicada ao estudo por métodos de distância, que considera taxas de evolução diferentes para cada sítio, adicionando o parâmetro de variação de taxas no cálculo do número de substituições (RUSSO *et al.*, 2001). O parâmetro de distribuição gamma para as regiões estudadas pode ser observado nas Tabelas 12 e 13.

A árvore filogenética apresenta o mesmo clado, sugerindo a aproximação específica, tal fato é confirmado por estudos utilizando caracteres morfológicos (LEYS, 2002, SILVEIRA *et al.*, 2002)

Em relação ao clado das abelhas em estudo, pode-se observar que o grupo se mostrou monofilético, e dentro desse grupo se mantiveram, formando um clado, que foi observado nos dois cladogramas construídos utilizando o modelo sugerido pelo programa PAUP (Figura 23).

#### **6.1.9. Teste de Mantel para Região 18S**

As Tabelas 14 e 15 mostram as matrizes de distância genética e geográfica, respectivamente, para as seis áreas deste estudo. O teste de Mantel (Tabela 16) foi realizado para verificar a correlação entre distância geográfica e distância genética das abelhas. A distância geográfica não afetou a similaridade ou dissimilaridade genética entre as abelhas. Podemos concluir com 95% de probabilidade que não existem diferenças significativas entre a distância geográfica e a similaridade genética das amostras de *M. quinquefasciata* coletadas nos Estados do Ceará e Goiás. Portanto, nosso H0 (existe associação

entre distância genética e geográfica) foi rejeitado, pois o valor  $g = 0,135$  foi inferior ao valor crítico gerado pelo programa Mantel = 1,645 ( $p < 0,05$ ). Não existindo portanto autocorrelação espacial. Desta forma, as comparações entre as amostras de *Melipona quinquefasciata* de Goiás e do Ceará, sugerem ser a mesma espécie, apesar do isolamento geográfico, confirmando a identificação morfológica da espécie encontrada no Ceará, por LIMA-VERDE & FREITAS (2002), como sendo de fato *Melipona quinquefasciata*. Todavia, por se ter trabalhado com uma região muito conservada do DNA, diferenças mais significativas poderão vir a ser obtidas com estudos em seqüências mais variáveis, como também, outros fatores como vegetação e clima, necessitam ser posteriormente avaliados.

Tabela 15- Matriz de dissimilaridade da distância geográfica para *Melipona quinquefasciata* coletadas em seis localidades, valores expressos em km.

Amostra	Araripe 3	Goiás	Chapada3	Ubajara	Jardim1	Flona2
Araripe 3						
Goiás	1.320,320					
Chapada 3	43,656	1.360,015				
Ubajara	406,367	1.565,200	404,623			
Jardim 1	63,796	1.346,980	42,485	448,564		
Flona 2	43,704	1.360,160	0,248	404,383	42,720	

Tabela 16- Teste de Mantel para a comparação entre distância geográfica e dissimilaridade genética para região 18S da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata* coletada de 6 localidades das regiões Nordeste e Centro-oeste do Brasil.

Matrizes comparadas	G	r	P	n <sup>o</sup> permutações	Significância ( $p < 0,05$ )
D. genética x D. geográfica	0.135	0,0359	0,05	1000	n.s.

## **6.2. Região ITS1 parcial**

### **6.2.1. Extração de DNA genômico**

Utilizou-se o DNA estocado da extração única que ocorreu para todas as amostras (Tabela 17), o método de extração e isolamento de ácidos nucleicos foi baseado no reagente CTAB (Brometo de cetiltrimetilamonio), o mesmo utilizado para região 18S.

### **6.2.2. Amplificação da região ITS1 completa do nrDNA**

Os produtos de PCR correspondentes a amplificação da região ITS1 Parcial do nrDNA foram visualizados a partir de uma eletroforese em gel de agarose 1%. Usando a mesma técnica já descrita e utilizada com sucesso para região 18S. Os resultados mostraram o aparecimento de bandas em algumas amostras, e estas foram escolhidas para a reação de seqüenciamento, por apresentarem bom nível de amplificação, confirmado pela presença de DNA genômico no gel de agarose (Figura 24).

Tabela 17– Dados gerais sobre as amostras escolhidas para estudo da região rDNA ITS1 parcial das abelhas *Melipona quinquefasciata*.

Amostra	Local de Coleta	Coordenada Geográfica	Altitude (m)	Número na Coleção
Flona 1	Crato, CE.	07°09'30,6" S 39°32'40,1" O	760	MGPA0803
Flona 2	Crato, CE.	07°09'35,2" S 39°32'42,1" O	765	MGPA0903
Flona 3	Crato, CE.	07°09'43,0" S 39°32'40,3" O	794	MGPA1303
Jardim 1	Jardim, CE.	07°29'44,0" S 31°21'13,5 O	815	MGPA0204
Araripe 1	Araripe, CE.	07°19'55,8" S 39°54'13,6" O	885	MGPA0604
Araripe 3	Araripe, CE.	07°19'24,0" S 39°54'19,0" O	891	MGPA0804
São Benedito	São Benedito, CE.	04°02'55,0" S 40°51'54,0" O	901	MGPS0205
Goiás	Luziânia, GO.	16°15'09,0" S 47°57'01,0" O	930	MGPA0404
Piauí 1	Canto do Buriti, PI.	08°06'36,0" S 42°56'40,0" O	269	MGPA0305

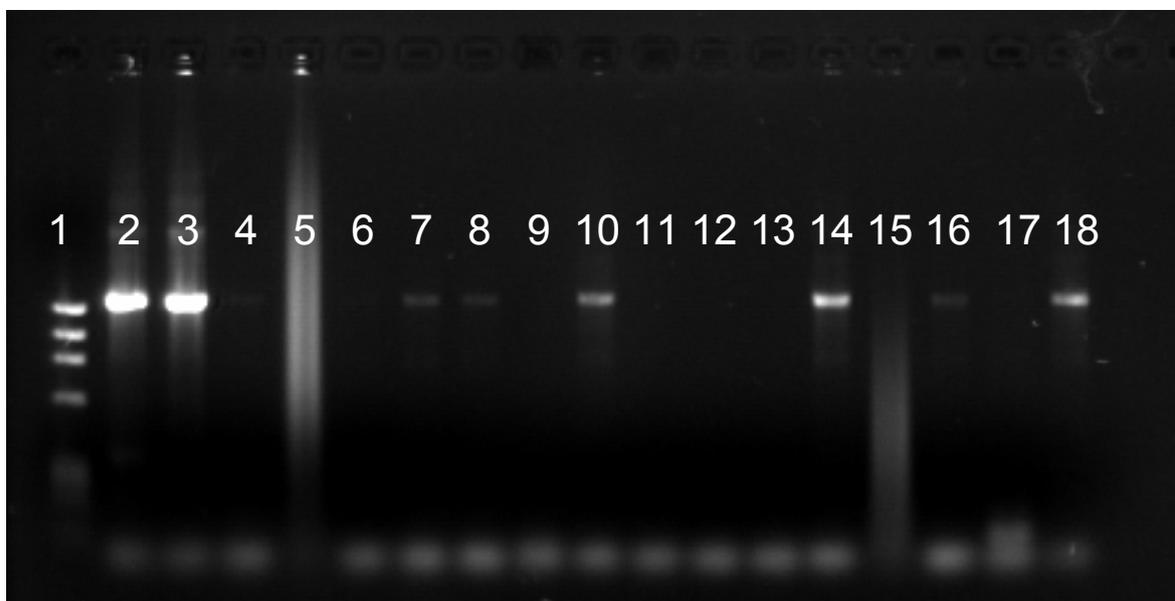


Figura 24- Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Mix 1: tampão Amersham Biosciences. Poço / Amostra de *M. quinquefasciata* : 1 / Marcador de baixo peso molecular; 2 / Flona 1; 3/Flona 2; 4/Flona 3; 5/Chapada 1; 6/Chapada 2; 7/Chapada 3; 8/Jardim 1; 9/Jardim 2; 10/Goiás; 11/Ubajara; 12/Araripe 1; 13/Araripe 2; 14/Araripe 3; 15/Araripe 4; 16/Araripe 5; 17/Guaraciaba do Norte; 18/São Benedito.

A região parcial do ITS1 do rDNA apresentou nas abelhas estudadas um tamanho aproximado de 600 pb. Foi utilizado um inicializador (primer) (Tabela 6) específico para determinada região da seqüência-alvo, proporcionando segmento distinto, correspondente às bandas visualizadas no gel de agarose a 1% (Figura 24). Os fragmentos apresentavam tamanho aproximado de 600 pb, livre de ampliações não específicas e em quantidade suficiente para o seqüenciamento.

### **6.2.3. Seqüenciamento do rDNA ITS1 parcial e obtenção das seqüências consenso**

Seqüências de alta qualidade foram obtidas a partir do produto de PCR de todas as amostras estudadas. As seqüências das amostras da região parcial do rDNA ITS1 apresentaram, no processo de *basecalling* realizado com o programa Phred, uma boa qualidade.

A região parcial do ITS1 do rDNA apresentou uma alta conservação em todas as seqüências. Os tamanhos das seqüências consenso obtidas, pelos programas Phred, Phrap e Consed variaram de 491 a 572 pb para as seqüências do rDNA ITS1 parcial, e composição nucleotídica como mostrado na Tabela 18.

O seqüenciamento da região parcial do rDNA ITS1 realizado a partir de produtos de PCR teve como objetivo eliminar qualquer evidência de tipos divergentes, a seqüência de cada espécie estudada foi determinada 8 (oito)

vezes. Os dados brutos gerados submetidos ao pacote de programas Phred/Phrap, eliminou todas as seqüências de má qualidade, identificando as seqüências de excelente qualidade para as análises de agrupamento. Seqüências de baixa qualidade podem possuir nucleotídeos inseridos incorretamente, o que poderia gerar inferências equivocadas ou até mesmo incorretas (ROKAS & HOLLAND, 2000).

O resultado da busca por similaridades, utilizando a ferramenta BLAST, no banco de dados do *GenBank* (NCBI – *National Center for Biotechnology Information*) das seqüências consenso obtidas mostrou que estas realmente correspondiam à região ITS1 do nrDNA. Os valores de E ou E *value* obtidos apresentaram-se próximos de 0 (zero), o que indica uma menor probabilidade destas seqüências terem sido obtidas por um mero acaso. Vale ressaltar que, os genes do DNA ribossômico nuclear evolui lentamente, sendo assim, possuindo pouca variação das posições nucleotídicas entre os diversos organismos, podendo ser utilizado na reconstrução de filogenias de grupos mais distantes (COLEMAN & VACQUIER, 2002). Sendo importante ressaltar que essas foram as primeiras seqüências parciais da região ITS1 do rDNA geradas para a espécie *M. quinquefasciata*.

Tabela 18– Relação das seqüências obtidas da região do rDNA ITS1 parcial das amostras estudadas, mostrando seus respectivos tamanhos em pares de bases e conteúdo G + C (Guanina + Citosina) e composição nucleotídica.

Amostra	Tamanho (pb)	Conteúdo G+C	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)
Flona 1	572	52,7	29,4	26,0	17,8	26,7
Flona 2	569	52,7	29,3	26,0	17,9	26,7
Flona 3	530	52,6	29,8	26,2	17,5	26,4
Araripe 1	570	52,8	29,3	26,1	17,9	26,7
Araripe 3	491	54,4	29,5	27,3	16,1	27,1
Jardim 1	520	53,1	31,3	25,8	15,6	27,3
São Benedito	570	52,6	29,5	26,3	17,9	26,3
Piauí 1	564	53,6	28,9	26,6	17,6	27,0
Goiás	547	53,0	30,0	26,2	17,4	26,8

A – Adenina, G – Guanina, C – Citosina e T – Timina.

#### 6.2.4. Alinhamento múltiplo de seqüências

O alinhamento das seqüências consenso obtidas e as depositadas no *GenBank* revelou tanto a presença de remoções e inserções de nucleotídeos (*indels*) e de substituições de base do tipo transição e transversão. Durante o processo de análise e edição das seqüências obtidas no laboratório e de todas as seqüências, foram retiradas as partes da região 5' e 3' para que as seqüências ficassem aproximadamente do mesmo tamanho.

O alinhamento entre seqüências de ácidos nucléicos é, em essência, um procedimento pelo qual potenciais homologias podem ser inferidas e identificadas

(PHILLIPS *et al.*, 2000; PAGE & HOLMES, 2001). Um pequena quantidade de *gaps* (espaços) foi necessária para alinhar as seqüências completas das *M. quinquemasciata* com as outras abelhas comparadas, demonstrando que as seqüências são muito conservada. Entretanto para as análises foram retiradas as extremidades 5' e 3' para uniformizar o tamanho das seqüências.

Os resultados do alinhamento mostraram uma grande quantidade de sítios semelhantes (Figura 25) e foram claramente evidenciados as diferenças entre as amostras em estudo, no que se refere a presença ou ausência das bases nitrogenadas e sua distribuição na seqüência.

Após a edição das 25 seqüências de abelhas do gênero *Melipona*, foram encontrados 522 sítios conservados, que reflete 89% do total de sítios encontrados (582), confirmando a semelhança entre as amostras, bem como a confiança nas seqüências obtidas. O número de sítios variáveis foi de 52, os informativos de parcimônia apenas 6, e os sítios de mudança única foram 46. Todos esses resultados foram utilizados pelos diversos *softwares*, aqui apresentados para confecção de matrizes e árvores filogenéticas.

O alinhamento das seqüências obtidas no seqüenciamento de todas as abelhas utilizadas nesta tese encontra-se nos Anexos.

BioEdit Sequence Alignment Editor - [C:\Júlio Otávio\Doutorado\Tese\Melipona quinq TOTAL 100306\alinhamento\Alinhamento todas 2.fas]

File Edit Sequence Alignment View Accessory Application RNA World Wide Web Options Window Help

25 total sequences shade threshold 10%

Mode: Select / Slide Selection: 0 Position: Sequence Mask: None Numbering Mask: None Start ruler at: 1

Scroll speed slow fast

	100	110	120	130	140	150	160	170								
M quadrifasciata	TTT	CTA	ATTTT	CC	GGT	GAAAA	TCC	GTT	GGAGGAGGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	GTTTT	CTC
M mandacaiá	TTT	CTA	ATTTT	CC	GGT	GAAAA	TCC	GTT	GGAGGAGGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	GTTTT	CTC
M scutellaris			TTTT	GGT	GAAAA	TCC	GTT	GGAGGAGGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	GTTTT	CTC	ATG
M quinefasciata Flona1	G	CT	C	GAAAA	TCC	TCC	GTT	GGAGAT	GGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	TTTTTTTTTT	CTC
M quinefasciata Flona2	G	CT	C	GAAAA	TCC	TCC	GTT	GGAGAT	GGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	TTTTTTTTTT	CTC
M quinefasciata Flona3	G	CT	C	GAAAA	TCC	TCC	GTT	GGAGAT	GGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	TTTTTTTTTT	CTC
M quinefasciata Araripe1	G	CT	C	GAAAA	TCC	TCC	GTT	GGAGAT	GGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	TTTTTTTTTT	CTC
M quinefasciata Araripe3	G	CT	C	GAAAA	TCC	TCC	GTT	GGAGAT	GGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	TTTTTTTTTT	CTC
M quinefasciata Jardim1	G	CT	C	GAAAA	TCC	TCC	GTT	GGAGAT	GGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	TTTTTTTTTT	CTC
M quinefasciata SaoBenedito	G	CT	C	GAAAA	TCC	TCC	GTT	GGAGAT	GGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	TTTTTTTTTT	CTC
M quinefasciata Piaui1	G	CT	C	GAAAA	TCC	TCC	GTT	GGAGAT	GGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	TTTTTTTTTT	CTC
M quinefasciata Goias	G	CT	C	GAAAA	TCC	TCC	GTT	GGAGAT	GGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	TTTTTTTTTT	CTC
DQ078738 M subnitida	TTT	CTA	ATTTT	CC	GGT	GAAAA	TCC	GTT	GGAGGAGGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	GTTTT	CTC
DQ078737 M subnitida	TTT	CTA	ATTTT	CC	GGT	GAAAA	TCC	GTT	GGAGGAGGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	GTTTT	CTC
DQ078736 M subnitida	TTT	CTA	ATTTT	CC	GGT	GAAAA	TCC	GTT	GGAGGAGGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	GTTTT	CTC
DQ078735 M subnitida	TTT	CTA	ATTTT	CC	GGT	GAAAA	TCC	GTT	GGAGGAGGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	GTTTT	CTC
DQ078734 M subnitida	TTT	CTA	ATTTT	CC	GGT	GAAAA	TCC	GTT	GGAGGAGGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	GTTTT	CTC
DQ078733 M subnitida	TTT	CTA	ATTTT	CC	GGT	GAAAA	TCC	GTT	GGAGGAGGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	GTTTT	CTC
DQ078732 M subnitida	TTT	CTA	ATTTT	CC	GGT	GAAAA	TCC	GTT	GGAGGAGGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	GTTTT	CTC
DQ078731 M subnitida	TTT	CTA	ATTTT	CC	GGT	GAAAA	TCC	GTT	GGAGGAGGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	GTTTT	CTC
DQ078730 M subnitida	TTT	CTA	ATTTT	CC	GGT	GAAAA	TCC	GTT	GGAGGAGGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	GTTTT	CTC
DQ078729 M subnitida	TTT	CTA	ATTTT	CC	GGT	GAAAA	TCC	GTT	GGAGGAGGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	GTTTT	CTC
DQ078728 M subnitida	TTT	CTA	ATTTT	CC	GGT	GAAAA	TCC	GTT	GGAGGAGGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	GTTTT	CTC
DQ078727 M subnitida	TTT	CTA	ATTTT	CC	GGT	GAAAA	TCC	GTT	GGAGGAGGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	GTTTT	CTC
DQ078726 M subnitida	TTT	CTA	ATTTT	CC	GGT	GAAAA	TCC	GTT	GGAGGAGGA	CC	GG	AG	AG	CCCC	GTTTT	CTC

Figura 25 – Edição das seqüências de *Melipona*, com o auxílio do programa BioEdit, visão das posições 92 a 174.

### 6.2.5. Análise do conteúdo GC

No presente trabalho o conteúdo GC médio foi de 52,48%. A análise do conteúdo G+C é muito importante para as análises filogenéticas, pois regiões ricas em GC possuem maior estabilidade, pois possuem três pontes de hidrogênio, produzindo estruturas secundárias mais estáveis (BALDWIN *et al.*, 1995; GERNANDT & LISTON, 1999; GERNANDT *et al.*, 2001; PAGE & HOLMES, 2001) Outra hipótese indica que as diferenças na composição de bases seriam causadas por variações nos padrões de mutação (NAHUM, 2001), nos nossos resultados não visualizados, já que nosso conteúdo GC médio passou de 50%.

### 6.2.6. Análises de agrupamento

O Teste do modelo calculado para análise dos dados das seqüências do nrDNA ITS1 obtidas foi o de Jukes-Cantor atribuindo o parâmetro da distribuição gama ( $\gamma$ ) e a proporção de sítios invariáveis (I), este é capaz de incorporar heterogeneidade nas taxas de substituição nucleotídica ao longo dos sítios, pois se sabe que nem todos os sítios evoluem na mesma taxa (SCHNEIDER, 2003). O modelo Jukes-Cantor leva em consideração um grande número de parâmetros, atribuindo pesos maiores às transições, mas considerando freqüências de base iguais (Tabelas 19 e 20).

Tabela 19 – Características do alinhamento das seqüências obtidas do rDNA ITS1 parcial estudadas.

Características do Alinhamento	
Comprimento do Alinhamento	582 pb
Divergência Média das Seqüências (Jukes-Cantor)	0,015
Nº de sítios conservados	522
Nº de sítios variáveis	52
Nº de sítios informativos a parcimônia	6
Nº de sítios de mudança única	46
Transições (s)	4
Transversões (v)	8
Taxa de Transição / Transversão	0,5

Tabela 20 – Resultados do teste do modelo, utilizando o programa *ModelTest*, para os dados das seqüências do rDNA ITS1.

Modelo selecionado:	HKY (+G)
(logaritmo da verossimilhança) –lnL	2888,2053
Frequência de bases:	
Frequência de A =	0,4009
Frequência de C =	0,2060
Frequência de G =	0,1059
Frequência de T =	0,2872
Modelo de Substituição:	
Matriz de frequências:	
R(a) [A-C] =	1,0000
R(b) [A-G] =	1,0000
R(c) [A-T] =	1,0000
R(d) [C-G] =	1,0000
R(e) [C-T] =	1,0000
R(f) [G-T] =	1,0000
Variação entre Sítios:	
Proporção de sítios invariáveis (I) =	0
Sítios variáveis (G)	
Parâmetro para a distribuição Gamma =	0,4337

### 6.2.7. Matriz de distância genética e identidade genética das amostras seqüenciadas

A matriz de distâncias para a região ITS1 parcial do nrDNA (Tabela 21) foi calculada pelo modelo de Jukes-Cantor, e gerada pelo programa MEGA. Já a Matriz de identidade (Tabela 22) foi gerada pelo programa BioEdit.

Tabela 21 - Matriz de distância genética (região ITS1 parcial) para *Melipona quinquefasciata* coletada em nove locais, gerada pelo método de Jukes-Cantor.

Amostras	Flona 1	Flona 2	Flona 3	Araripe 1	Araripe 3	Jardim 1	São Benedito	Piauí 1	Goiás
Flona 1									
Flona 2	0,002								
Flona 3	0,002	0,000							
Araripe 1	0,002	0,000	0,000						
Araripe 3	0,013	0,010	0,010	0,010					
Jardim 1	0,019	0,017	0,017	0,017	0,021				
S. Benedito	0,006	0,004	0,004	0,004	0,015	0,021			
Piauí 1	0,004	0,002	0,002	0,002	0,013	0,019	0,002		
Goiás	0,035	0,033	0,033	0,033	0,045	0,047	0,031	0,031	

Tabela 22- Matriz de Identidade genética (região ITS1 parcial) para *Melipona quinquefasciata* coletada em nove locais.

Amostras	Flona 1	Flona 2	Flona 3	Araripe 1	Araripe 3	Jardim 1	São Benedito	Piauí 1	Goiás
Flona 1									
Flona 2	0,979								
Flona 3	0,918	0,928							
Araripe 1	0,984	0,973	0,916						
Araripe 3	0,844	0,850	0,909	0,849					
Jardim 1	0,864	0,870	0,885	0,869	0,921				
S. Benedito	0,986	0,975	0,919	0,985	0,845	0,867			
Piauí 1	0,954	0,944	0,887	0,958	0,856	0,883	0,956		
Goiás	0,912	0,922	0,928	0,917	0,854	0,878	0,919	0,889	

A Matriz de diferença genética entre as amostras, foi gerada para auxílio ao cálculo de correlação com a distância geográfica, no programa Mantel. Essa matriz proporcionou a seguinte média: 0,015. Neste cálculo não foram considerados *gaps*, inserções e deleções, realizadas durante o processo de alinhamento, sugerindo um maior grau de certeza de resposta.

A leitura de matriz de identidade genética revela a menor divergência entre as amostras coletadas em Araripe 1 e São Benedito, e maior entre as amostras de Flona 1 e Araripe 3. A média de identidade genética entre as amostras estudadas ficou em 0,906 de identidade. Vale ressaltar que essa matriz considera em seu cálculo, todas as variáveis dispostas no alinhamento, ou seja, *gaps*, inserções, deleções, transversões e outros, efetuados durante a edição das seqüências.

### 6.2.8. Árvore filogenética

A partir das matrizes de distância, as árvores filogenéticas foram obtidas utilizando-se o método de distância do vizinho próximo (*Neighbor-joining*) (Figura 26).

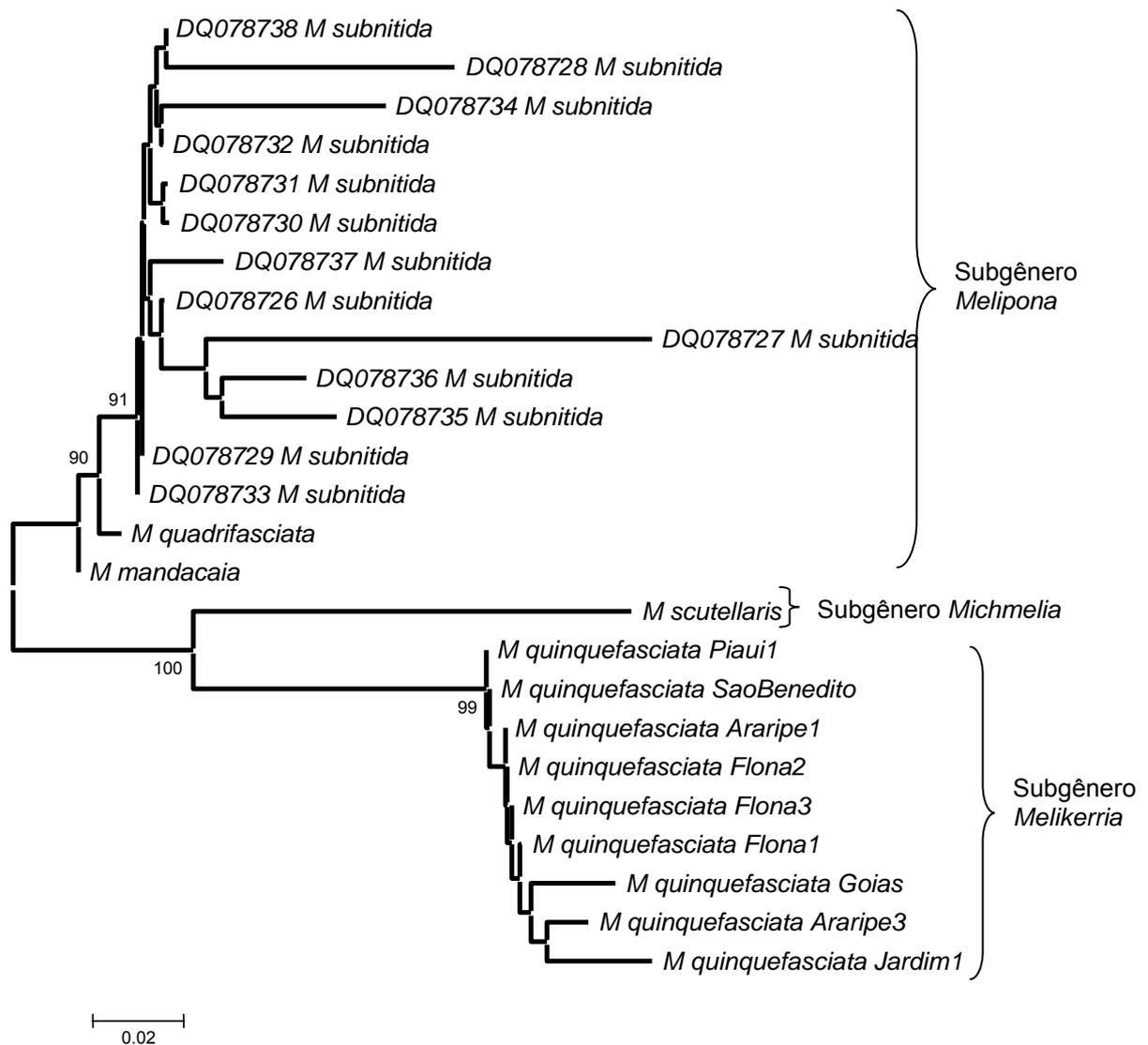


Figura 26 – Cladograma agrupando as seqüências obtidas no laboratório com as seqüências obtidas no *GenBank* e em FERNANDES-SALOMÃO (2005). Árvore original obtida a partir do método NJ com *bootstrap* de 1000 replicações.

Estudos recentes convergem para formulação de uma hipótese evolucionária a partir do grande volume de dados gerados e dos modelos evolutivos que têm sido aperfeiçoados. Sendo assim a família Apidae tem passado por algumas modificações. Contudo, ainda existem táxons que continuam não resolvidos ou sujeitos à interpretações conflituosas. Principalmente quando se trabalha em níveis inferiores, com espécies em que existem muitas dúvidas, quanto a classificação em gênero, espécie, subespécie. Desta forma, um grande número de trabalhos utilizando estudos moleculares tem sido publicado na tentativa de propor uma melhor classificação ou melhorar a atual para os grupos constituintes deste grupo (LEYS *et al.*, 2002; COSTA, 2003). Entretanto, um dos problemas encontrados foi a falta de seqüências ITS1 parcial, do gênero *Melipona*, onde, ate o presente momento existem apenas seqüências parciais de *M. subnitida* depositadas no *GenBank* e outras três publicadas por FERNANDES-SALOMÃO (2005). Nesta tese fizemos o uso dessas seqüências acima descritas, para proporcionar um confronto das seqüências de ITS1 parcial. É importante enfatizar que ainda não havia sido conduzido nenhum estudo com essa seqüência de *M. quinquefasciata*, entretanto seqüências desta mesma região (ITS1) em outros insetos já foram utilizadas em estudos anteriores numa revisão de *Arthropoda* (GIRIBET, & RIBERA, 2000).

Em relação aos alinhamentos das seqüências, estes foram gerados para obtenção das árvores filogenéticas. Foi verificado que as substituições nucleotídicas mais freqüentes foram as mudanças de A para G e T para C, que são mudanças do tipo transição, que normalmente ocorrem com maior freqüência e que aumentam a estabilidade da estrutura secundária. Tais mudanças têm sido

identificadas em outros trabalhos (LIMA, 2003, LOPES, 2004) como sendo as mais freqüentes.

Nas seqüências de ITS1 a evolução (variações nucleotídicas) ocorrem de maneira diferente, pois pequenas mudanças podem causar grandes alterações na estrutura do ribossomo, causando mudanças compensatórias (MARQUES, 2004; MOUNT, 2004). Estas mudanças acontecem para que não ocorra uma mudança na estrutura, e assim é de se esperar tais taxas de substituições. A alta conservação da região do rDNA ITS1 também é comprovada nas Tabelas 21 e 22, onde podemos verificar o número de sítios conservados e variáveis. Em relação ao uso da distribuição  $\lambda$  (gamma), ela é aplicada ao estudo por métodos de distância, que considera taxas de evolução diferente para cada sítio, adicionando o parâmetro de variação de taxas no cálculo do número de substituições (RUSSO et al., 2001). O parâmetro de distribuição gamma para as regiões estudadas pode ser observado na Tabela 20.

A árvore filogenética apresentou três clados para as amostras. Agrupando num primeiro momento todas as abelhas *M. subnitida* com *M. quadrifasciata* e *M. mandaçaia*, em outro clado agrupou todas as *M. quinquefasciata*, e noutro em separado a *M. scutellaris*. Este estudo confirma assim sua taxonomia, realizada com base em dados morfológicos quando identificamos estas abelhas por Subgênero, como descrito por SILVEIRA *et al.* (2002). Ou seja, as amostras compreendidas pelas abelhas das espécies *M. subnitida*, *M. quadrifasciata* e *M. mandaçaia*, pertencem ao subgênero *Melipona*, já *M. scutellaris* apresentou-se em separado das demais, sendo considerada como pertencente ao subgênero *Michmelia*. Por fim, todas as *M. quinquefasciata* ficaram agrupadas, dentro do subgênero *Melikerria*.

Os resultados visualizados na árvore filogenética, expressam e apóiam a hipótese de que as *M. quinquefasciata*, coletadas nos estados do Ceará e do Piauí, pertencem ao mesmo clado que aquelas coletada em Goiás, e diferenciam-se de todas as outras amostras.

#### **6.2.9. Teste de Mantel para Região ITS1 parcial**

As Tabelas 21 e 23 mostram as matrizes de distância genética e distância geográfica, respectivamente, para as nove áreas deste estudo. O teste de Mantel (Tabela 24) foi realizado para verificar a correlação entre distância geográfica com a distância genética das abelhas. A distância geográfica afetou a similaridade ou dissimilaridade genética entre as abelhas. Podemos concluir com 95% de probabilidade que existem diferenças significativas entre a distância geográfica e a similaridade genética das amostras de *Melipona quinquefasciata* coletadas no Ceará, Piauí e Goiás. Já que, o  $H_0$  (não existe associação entre distância genética e geográfica) formulado pelo programa Mantel, foi rejeitado, quando o valor  $g = 3,4966$  foi superior ao valor crítico gerado pelo programa Mantel=1,645 ( $p < 0,05$ ). Existindo portanto autocorrelação espacial. Desta forma, as comparações entre as amostras de *Melipona quinquefasciata* de Goiás, do Ceará e do Piauí, demonstram pelas análises anteriores que se trata da mesma espécie, com um pequeno grau de dissimilaridade. Entretanto, o isolamento geográfico pode proporcionar, no decorrer do tempo, a elevação no grau de diversidade entre as populações distantes. Desta forma, aceita-se que a

identificação morfológica da espécie encontrada no Ceará, por LIMA-VERDE & FREITAS (2002), é realmente *M. quinquefasciata*. Todavia, por se ter trabalhado com uma região conservada do DNA e de forma parcial, diferenças mais significativas poderão vir a ser obtidas com estudos em seqüências mais variáveis, como também, outros fatores como vegetação e clima, necessitam ser posteriormente avaliados. Outro fator não avaliado neste estudo, porém, com provável participação neste resultado, foi a altitude dos locais onde as colônias de *M. quinquefasciata* nidificam. Apenas a amostra do Piauí, possui abelhas que nidificam a 269m acima do nível do mar, enquanto as demais, oscilam entre 760 a 902m.

Tabela 23- Matriz de dissimilaridade da distância geográfica para *Melipona quinquefasciata* coletadas em nove locais, valores expressos em km.

Amostras	Flona 1	Flona 2	Flona 3	Araripe 1	Araripe 3	Jardim 1	São Benedito	Piauí 1	Goiás
Flona 1									
Flona 2	0,7								
Flona 3	0,7	0,7							
Araripe 1	44,0	43,9	43,7						
Araripe 3	43,8	43,7	43,7	1,3					
Jardim 1	42,8	42,7	42,7	63,3	63,7				
S.Benedito	373,7	374,0	374,0	377,4	377,4	416,3			
Piauí 1	389,6	389,5	389,5	346,2	346,2	402,8	504,6		
Goiás	1360,3	1360,0	1360,1	1319,6	1320,3	1346,9	1556,7	1052,5	

Tabela 24 - Teste de Mantel para a comparação entre distância geográfica e dissimilaridade genética para região ITS-1 de *Melipona quinquefasciata* coletada em 9 localidades das regiões Nordeste e Centro-oeste do Brasil.

Matrizes comparadas	G	r	P	n <sup>o</sup> permutações	Significância (p<0,05)
D. genética x D. geográfica	3,4966	0,5926	0,05	1000	s.

## 7. CONCLUSÕES

- 1- As abelhas amostradas nos estados do Ceará e Piauí são indistinguíveis em termos moleculares das abelhas do estado de Goiás, sugerindo serem a mesma espécie, embora apresentando algum nível de variabilidade entre as populações.
- 2- Os resultados encontrados confirmam a taxonomia baseada em dados morfológicos, para a espécie *M. quinquefasciata*.
- 3- O distanciamento geográfico sugeriu algum grau de alteração no genoma das abelhas que habitam nos três estados.
- 4- A região ITS-1 parcial do DNA ribossômico nuclear, mesmo em pequenas amostragens de abelhas, pode ajudar a resolver dúvidas taxonômicas ao nível de subgêneros, em *Melipona*.

## 8. SUGESTÕES PARA NOVAS PESQUISAS

- 1- Se faz necessário o estudo aprofundado das estruturas secundárias das seqüências de ITS1 parcial e 18S, a fim de se confirmar ainda mais a proximidade entre essas populações estudadas.
- 2- O uso da clonagem em plasmídios, para as seqüências parciais de ITS1, proporcionará a leitura de toda a região ITS1, que nesta espécie, verificou-se ser muito grande, cerca de 1.800 pares de bases.
- 3- Ampliar o número de amostras de *M. quinquefasciata*, com coletas em todos os estados, onde essa abelha foi relatada, proporcionará uma visão de sua diversidade entre populações distantes.
- 4- As pesquisas a nível molecular de espécies de abelhas sem ferrão nativas do Brasil, devem ser incentivadas e intensificadas, pois as publicações encontradas, principalmente para as regiões ITS1 e 18S são mínimas.
- 5- Agregar informações sobre vegetação, clima, hidrologia, relevo e ação antrópica dentre outras, somadas às informações apresentadas neste trabalho, ampliarão as discussões sobre a ocorrência desta espécie em locais até então desconhecidos.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMKEWICZ, S. L.; HARASEWYCH, M. G.; BLAKE, J.; SAUDEK, D. & BULT, C.J. A molecular phylogeny of the Bivalve Mollusks. **Molecular Biology Evolution**. v. 14, n.6, p. 619-629. 1997.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal Molecular Biology**. v. 215, p. 403-410. 1990.

AMORIM, D. S. Elementos básicos de sistemática filogenética. 2ª. ed. Ribeirão Preto: **Holos**, 276 p. 1997.

ARIAS, M.C.; FRANCISCO, F.O. & SILVESTRE, D. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. *In* MELO,G.A.R & ALVES-DOS-SANTOS, I. **Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. Editora **UNESC**, Criciúma. 2003.

BALDWIN, B. G.; SANDERSON, M. J.; PORTER, J. N.; WOJCIECHOWSKI, M. F.; CAMPBELL, C. S. & DONOGHUE, M. J. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. **Ann. Missouri Botanic Garden**. v. 92, p. 247-277. 1995.

BARGUES, M.D. & MAS-COMA, S. Phylogenetic Analysis of Lymnaeid Snails Based on 18s rDNA Sequences. **Molecular Biology Evolution**. v. 14, n. 2, p. 569-577. 1997.

BROCCHIERI, L. Phylogenetics Inference from Molecular Sequences: Review and critique. **Theoretical Population Biology** v. 59, p. 27-40. 2001.

BROWN, J. K. M. Bootstrap hypothesis tests for evolutionary trees and other dendograms. **Proceedings National Academy Science**. v. 91, p. 12293-12297. 1994.

BROWN, S. M. Bioinformatics: a biologist's guide to biocomputing and the internet. Natick : **Eaton Publishing**. 188 p. 2000.

CAMARGO J. M. F. & PEDRO S. R. M. Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a minireview. **Apidologie**. v. 23, p. 509–522. 1992.

CATERINO, M. S.; CHO, S. & SPERLING F. A. H. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. **Ann. Rev. Entomol.** v. 45, p.1-54. 2000.

COLEMAN, A. W. & VACQUIER, V. D. Exploring the Phylogeny of ITS sequences for animals: a test case for Abalone (*Haliotis*). **Journal of Molecular Evolution**. v. 54, p.246-257. 2002.

CORPET, F. & CHEVALET, C. Analyse informatique des données moléculaires. In: BIDÉ, B.; DUCOS, A.; GILLET, P.; ROY, P. L.; MANFREDI, E.; MULSANT, P.; LAAN, M. H. P. V. D.; ROGEL-GAILLARD, C.; SELLIER, VAIMAN, D.; YERLE, M. (Eds). Génétique moléculaire: principes et application aux populations animales. Cap. 6. Versailles: **INRA Editions**, p. 187-195. 2000.

COSTA, M. A.; DEL LAMA, M. A.; MELO, G. A. R. & SHEPPARD, W. S. Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. **Apidologie**. v. 34, p. 73-84. 2003.

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 of the nuclear ribosomal DNA in *Melipona subnitida* (Hymenoptera, Apidae), an endemic stingless bee from northeastern Brazil. **Apidologie**, aceito, 2005.

DOYLE, J. J. Variation at DNA level: Uses and Potential in Legume Systematics. *In*: STIRTON, C. H. (eds.) Advances in Legume Systematics Part 3. p. 1-30. Royal **Botanical Gardens, Kew**. 466p. 1987.

DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. v.12, p.13-15. 1990.

DUCKE, A. Himenópteros. Enumeração dos Espécimes Coligidos pela Comissão e Revisão das Espécies de Abelhas do Brasil. Publicação nº 35 da Comissão de Linhas Telegráficas Estratégicas de Mato-Grosso ao Amazonas (“**Comissão Rondon**”). 1916.

EWING, B. & GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research** v. 8, p. 186-194. 1998b.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C. & GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research** v. 8, p.175-185. 1998a.

FERNANDES-SALOMÃO, T.M.; MURO-ABAD, J.I.; CAMPOS, L.A.O. & ARAÚJO, E.F. Mitochondrial and nuclear DNA characterization in *Melipona* species (Hymenoptera, Meliponini) by RFLP analysis. **Hereditas**. v.137, p. 299-233. 2002.

FERNANDES-SALOMÃO, T.M.; ROCHA, R.B.; CAMPOS, L.A.O. & ARAÚJO, 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.

FERREIRA JR., O. **GPS Trackmaker for Windows 11.7**. Belo Horizonte, MG (<http://www.gpstm.com/>), 2001.

FOSTER, G. & TWELL, D. Plant Gene Isolation. Principles and practice. **John Wiley & Sons**. England. 426p. 1996.

FRANCISCO, F.O. Diversidade genética de populações da abelha sem ferrão *Plebeia remota*: análise do DNA mitocondrial e microssatélites. Universidade de São Paulo, **Dissertação de Mestrado**. 140 p. 2002.

FRANCISCO, F.O.; SILVESTRE, D. & ARIAS, M.C. Mitochondrial DNA characterization of five species of *Plebeia* (Apidae: Meliponini): RFLP and restriction maps. **Apidologie**. v. 32, p. 323-332. 2001.

GAMA, M. I. C. Identificação de plantas transgênicas por PCR. In: BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. C. (eds.). **Manual de transformação genética de plantas**. EMBRAPA. Brasília, DF. p. 179 – 189. 1998.

GERNANDT, D. S. & LISTON, A. Internal transcribed spacer region evolution in *Larix* and *Pseudotsuga* (Pinaceae). **American Journal of Botany**. v.86, n. 5 p. 711 - 723. 1999.

GERNANDT, D. S.; LISTON, A. & PINERO, D. Variation in the nrDNA ITS of *Pinus* subsection Cembroides: implications for molecular systematic studies of pine species complexes. **Molecular Phylogenetics and Evolution** v. 21, n. 3, p. 449 - 467. 2001.

GIBAS, C. & JAMBECK, P. Developing Bioinformatics Computer Skills. **O'Reilly & Associates, Inc.** USA. 2001.

GIRIBET, G., RIBERA, C. A review of arthropod phylogeny: new data based on ribosomal DNA sequences and direct character optimization. **Cladistics**. v. 16, p. 204–231. 2000.

GONÇALVES, J.A. Ocorrência e abundância de abelhas indígenas no Estado do Ceará. Brasil. **Boletim Cearense Agrônômico**. v.14, p.1-13. 1973.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; & GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research** v. 8, p. 195-202. 1998.

GORDON, D.; DESMARAIS, C.; & GREEN, P. Automated Finishing with Autofinish. **Genome Research** v. 11, n. 4, p. 614-625. 2001.

GRAUR, D. & LI, W. H. Fundamentals of Molecular Evolution. 2<sup>a</sup> edição. **Sinauer Press**, Sunderland, Massachusetts. 481p. 2000.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** v. 41, p. 95-98. 1999.

IMAI, I. T., TAYLOR, R.W., CROSLAND, M.W.J. & CROZIER, R.I. Modes of spontaneous evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. **Japon Journal Genetic.** v. 63, p.159-185. 1988.

IPLANCE. **Anuário Estatístico do Ceará.** Fortaleza: Governo do Estado do Ceará. CD-Rom. 2004.

KERR, W.E. Estudos sobre a genética de *Melipona*. **Tese de Doutorado.** ESALQ. Piracicaba, 276p. 1948.

KERR, W.E.; CARVALHO, G.A.; COLETTTO da SILVA, A.; PAIVA de ASSIS, M.G. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica - Biodiversidade, pesquisa e desenvolvimento na Amazônia. **Parcerias estratégicas.** n. 12. p.22. 2001.

KUMAR, S.; TAMURA, K. & NEI, M. MEGA: molecular evolutionary genetics analyses, version 2.1. **Pennsylvania: University Park,** 2001.

LEYS, R., COOPER, S. J. B. & SCHWARZ, M. P. Molecular phylogeny and historical biogeography of the large carpenter bees, genus *Xylocopa* (Hymenoptera: Apidae). **Biol. J. Linn. Soc.** v.77, p.249-266. 2002.

LI, W. H. Molecular Evolution. **Sinauer Associates, Inc.,** Sunderland, MA. 1997.

LIEDLOFF, A. **Mantel 2.0. Mantel nonparametric test calculator.** Shareware <http://www.sci.qut.edu.au/nrs/mantel.htm>). 1999.

LIMA, J. P. M. S. Estudos taxonômicos moleculares no táxon Phaseoleae DC. (Leguminosae, Papilionoideae) utilizando seqüências de DNA ribossômico (rDNA). **Dissertação (Mestrado em Bioquímica Vegetal)** Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 136 p. 2003.

LIMA-VERDE, L.W. & FREITAS, B.M. Occurrence and biogeographic aspects of *Melipona quinquefasciata* in NE Brazil (Hymenoptera, Apidae). **Brazilian Journal Biology**. v. 62(3), p.479-486. 2002.

LOPES, D. P. Filogenia molecular dos táxons Caenogastropoda e Neritimorpha (Mollusca: Gastropoda) baseada em seqüências do DNA ribossômico nuclear (rnDNA). **Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas)**. Centro de Ciências. Universidade Federal do Ceará. 87p. 2004.

MAI, J. C. & COLEMAN, A. W. Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness. **Journal of Molecular Evolution**. v. 45, n. 2, p. 168 -177. 1997.

MARIANO-FILHO, J. Ensaio sobre os meliponidas do Brasil. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 140p. 1911.

MARQUES, F. P. L. Introdução à sistemática molecular. **Apostila do curso do CBAB de Evolução Molecular**. 2004.

MATIOLI, S. R. Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: **Holos**, 202p. 2001.

MEIDANIS, J., SETÚBAL, J. C., Uma introdução à biologia computacional. **Catálogo impressa na publicação elaborada pela biblioteca de informática da UFPE**. Recife. 131p. 1994.

MELO, G. A. R. Phylogenetic relationships and classification of the major lineages of Apoidea (Hymenoptera), with emphasis on the crabronid wasps. **Scientific Papers of the Natural History Museum of University of Kansas**. v.14, p.1-55. 1999.

MEYER, D. Análise filogenética de seqüências de DNA. In: AMORIM, D.S. Elementos básicos de sistemática filogenética. 2ª. ed. Ribeirão Preto: **Holos**, cap. 14, p.187-208. 1997.

MICHENER, C. D. Comparative external morphology, phylogeny, and a classification of bees (Hymenoptera). **Bulletin of the American Museum of Natural History** v.82, p.151-326. 1944.

MICHENER, C. D. The Social Behavior of the Bees – A Comparative Study. Cambridge, **Belknap**. 404p.1974

MICHENER, C. D. The Bees of the World. Baltimore. **Johns Hopkins**. 2000.

MICHENER, C.D. Classification of the Apidae (Hymenoptera). **Univ. Kansas Sci. Bull.** v. 54, p. 75-164. 1990.

MOUNT, D W. Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis, 2nd Edition, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 692 p. 2004.

MOURE, J.S. Estudando as Abelhas do Brasil (pareceres de sistemática). **Chacaras e Quintais**, v. 77, p. 339-341. 1948.

MOURE J.S. Notas sobre Meliponinae (Hymenoptera, Apoidea), **Dusenía**. v.2, p. 25-50. 1951.

MOURE J. S. A preliminary supra-specific classification of the old world Meliponinae bees (Hymenoptera, Apidae), **Studia Entomol.** v. 4, p.181-242. 1961.

MOURE, J.S. & KERR, W.E. Sugestões para a modificação de sistemática do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apidae). **Dusenía**. v.2, p.105-131. 1950.

MOURE, J.S., Notas sobre a espécie de *Melipona* descritas por Lepeletier em 1836. **Revista Brasileira de Biologia**. v. 35, p. 615-623. 1975.

MOURE, J.S. *Melikerría* e *Eomelipona*, dois subgêneros novos em *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera, Apidae). **Naturalia (UNESP)** (nº especial em homenagem aos 70 anos do prof. Kerr). p. 32-38. 1992.

NAHUM, L. A. Evolução dos genomas. In: MATIOLI, S. R. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: **Holos**, c. 8, p.82-96. 2001.

NEI, M. & KUMAR, S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. **Oxford University Press, Inc.** 333p. 2001.

NOGUEIRA-NETO, P. *Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão*. Editora **Nogueirapis**. São Paulo. 445p. 1997.

NOMURA, H. *Vultos da Zoologia Brasileira*. Vol. 6. coleção Mossoroense, série C, v. 861. Mossoró, **Fundação Vingt-Um Rosado**. 139p. 1995.

OLIVEIRA, M. C. Filogenia de *Porphyra* spp. (Rhodophyta): Seqüenciamento do gene nuclear para o RNA da subunidade pequena do ribossomo (rDNA 18S) e estudos morfológicos da fase conchocelis. **Tese de Doutorado**, Depto. Botânica, IB –USP. 160p. 1993.

OLIVERIO, M., CERVELLI, M. & MARIOTINNI, P. ITS2 rRNA evolution and its congruence with the phylogeny of muricid neogastropods (Caenogastropoda, Muricoida). **Molecular Biology and Evolution**. vol. 25, p. 63-69. 2002.

PAGE, R. D. M. & HOLMES, E. C. Molecular Evolution: A phylogenetic approach. **Blackwell Science**. 346 p. 2001.

PERTSEMLIDIS, A., FONDON III, J. W. Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLASTphemy). **Genome Biology**. v.2, n.10, p. 1-10. 2001.

PHILLIPS, A., JANIES, D. & WHEELER, W. Multiple Sequence Alignment in Phylogenetic Analysis. **Molecular Phylogenetics and Evolution** v.16, n.3, p. 317- 330. 2000.

POSADA, D. & CRANDALL, K. A. ModelTest: Testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics** v. 14, n. 9, p. 817-818. 1998.

PROSDOCIMI, F.; CERQUEIRA, G.C.; BINNECK, E.; SILVA, A. F.; REIS, A.N.; JUNQUEIRA, A. C. M.; SANTOS, A. C. F.; JUNIOR, A.N.; WUST, C. I.; FILHO, F. C.; KESSEDJAN, J. L.; PETRETSKI, J. H.; CAMARGO, L. P.; FERREIRA, R. G. M.; LIMA, R. P.; PEREIRA, R. M.; JARDIM, S.; SAMPAIO, V. S. & FOLGUERAS-FLATSCHART, A. V. Bioinformática: manual do usuário. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 29, p. 12-25. 2002.

ROCHA, M.P. Análises citogenéticas em abelhas do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Meliponinae). **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas. São Paulo. 2002.

ROCHA, M.P.; CRUZ, M.P.; FERNANDES, A.; WALDSCHMIDT, A.M.; SILVA-JÚNIOR, J.C. & POMPOLO, S.G. Longitudinal differentiation in *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Meliponini) cromossomes. **Hereditas**. v.138, p. 133-137. 2003.

ROKAS, A. & HOLLAND, P. W. Rare genomic changes as a tool for phylogenetics. **Trends in Ecology and Evolution** v. 5, n. 11, p. 454 - 459. 2000.

RUSSO, C. A. M, MIYAKI, C. Y. & PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética: métodos geométricos In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: **Holos**. c. 10, p. 108-116. 2001.

RUSSO, C. A. M. Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: **Holos**, c. 12, p. 130-136. 2001.

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

SCHNEIDER, H. Métodos de análise filogenética: Um guia prático. 2ª ed. Ribeirão Preto: **Holos**. 114p. 2003.

SCHROTTKY, C. Ensaio sobre as abelhas solitárias do Brasil. **Revista do Museu Paulista**. v.5, p. 330-613. 1902.

SCHWARZ, H.F. The genus *Melipona*. The type genus of Meliponidae or stingless bees. **Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.** v.63, p. 231-459. 1932.

SILVEIRA, F. A., MELO, G. A., ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação**. 1<sup>a</sup>. ed. Belo Horizonte. 253p. 2002.

SILVESTRE, D. Seqüenciamento e análise do genoma mitocondrial de *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biociências - USP. 2002.

SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**. New York, Freeman. 887 p. 1995.

STEINER, G., DREYER, H. Molecular phylogeny of Scaphopoda (Mollusca) inferred from 18S rDNA sequences: support for a Scaphopoda-Cephalopoda clad. **Zoologica Scripta**. vl. 32, p. 343-356. 2002.

SWOFFORD, D. L. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4.0 b. **Sinauer Associates**, Sunderland Massachusetts. 1998.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research** v. 24, p. 4876 – 4882. 1997.

VAN NUES, R. W., VENEMA, J., RIENTJES, J. M. J., DIRKS-MULDER, A. & RAUE, H. A. Processing of eukaryotic pre-rRNA: the role of the transcribed spacers. **Biochem. Cell Biol.** v.73, p. 789-801. 1995.

VARELA, E.S. Filogenia Molecular da Subtribo Diocleinae Benth. (Leguminosa, Papilonoideae, Phaseoleae) baseada em seqüências dos espaçadores transcritos internos (ITS 1 e ITS 2) do DNA ribossômico nuclear (nrDNA). Monografia (**Bacharelado em Ciências Biológicas**). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

VIANA, L.S. & MELO, G.A.R. Conservação de abelhas. **Informativo Agropecuário**. v.13, n.149, p. 23-26. 1987.

WALDSCHMIDT, A.M., MARCO-JÚNIOR, P., BARROS, E.G. & CAMPOS, L.A.O. Genetic analysis of *Melipona quadrifasciata* LEP. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) with RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology**. v.62, n. 4B, p. 923-928. 2002.

WALDSCHMIDT, A.M., SALOMÃO, T.M.F., BARROS, E.G. & CAMPOS, L.A.O. Methodology: Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Brazilian Journal of Genetics**. v.20, n.3, p.421-423. 1997.

WEINLICH, R.; FRANCISCO, F.O. & ARIAS, M.C. Mitochondrial DNA restriction and genomic maps of seven species of *Melipona* (Apidae: Meliponini). **Apidologie**. 2004.

WILLE, A. & MICHENER, C. D. **The nest architecture of stingless bees with special reference to those of Costa Rica (Hymenoptera, Apidae)**. 1973.

WINNEPENNINCKX, B., STEINER, G., BACKELJAU, T., WACHTER, R. Details of Gastropod phylogeny inferred from 18SrRNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 9, n. 1, p. 55-63. 1998.

XIA, X. & XIE. Z., DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**. v. 92, p. 371-373. 2001.

YOKOTA, Y., KAWATA, T., IIDA, Y., KATO, A. & TANIFUJI, S. Nucleotide sequences of the 5,8S rRNA and transcribed spacer regions in carrot and broad bean ribosomal DNA. **Journal of Molecular Evolution**. v. 29, p. 294-301. 1989.

ZHANG De-X, SZYMURA J.M. & HEWITT G.M. Evolution and structural conservation of the control region of insect mitochondrial DNA. **Journal Molecular Evolution**. v.40, p. 382-391. 1995.

## 10. ANEXOS

### 10.1. Seqüências consenso da região 18S

#### *Melipona quinquefasciata* – amostra Araripe 3, Ceará

TTGTTCAATTAAGGCTGTATGATTATGAAACCGGAATGGCTCATTAATCA  
 GTTATGGTTTCTTAGATCGTACCCACATTTACTTGGATAACTGTGGTAAT  
 TCTAGAGCTAATACATGCAAACGAAGTTCTCTCAGAGATGGGAGGAATG  
 CTTTTATTAGATCAAACCAATCGGTGGCGGATGGCTCGCTGTCCGTCCA  
 TCGTTTGCTTTGGTGACTCTGAATAACTTTATGCCGATCGCATGGTCATC  
 AAGCACCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCTTATCAACTGTTCGATGG  
 TAGGTTCTGCGCCTACCATGGTTGTAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTC  
 GATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACAGCTACCACATCCAAGGAAGGCAG  
 CAGGCGCGCAAATTACCCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGACGAAAAAT  
 AACGATACGGGACTCATCCGAGGCCCGTAATCGGAATGAGTACACTTTA  
 AATCCTTTAACGAGGACCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC  
 GGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCGGTTAAAAAGC  
 TCGTAGTTGAATCTGTGTGTCACAGTGTTCGGTTCACCGCTCGCGGTGTTT  
 AACTGGCATTATGTGATACGTCCTATCGGTGGGCTTAGCTCCTTGTGGGC  
 GGTCCAATAATCTCCCATCGCGGTGCTCTTCACTGAGTGTTCGAGGTGGG  
 CCGATACGTTTACTTTGAACAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCTACCTTC  
 GCCTGAATACTGTGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTT  
 TGTTGGTTTTTCGGAGCCCCGAGGTAATGATTAATAGGGACAGATGGGGGC  
 ATTCGTATTGCGACGTTAGAGGTGAAATTCTTGGATCGTCGCAAGACGGA  
 CAGAAGCGAAAGCATTTGCCAAAAATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAG  
 TTAGAGGTTTCGAAGGCGATCAGATAACGCCCTAGTTCTAACCATAAACGA  
 TGCCAGCCAGCGATCCGCCGAAGTTCCTCAGATGACTCGGCGGGCAGCTT  
 CCGGAAACCAAAGCTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTG  
 AAACCTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGC  
 TTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCAAGGCCCGGACACCCGGAA  
 GGATTGACCAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTTCGGTGGGTGGTGGTTCGCA  
 TGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCCGATAACGA  
 ACGAGACTCTAGCCTGCTAAATAGACGTAACCTTATGGTATCTCGAAGGCC  
 CCCGGCTTCGGTTCGGTGGGTTTTTACTACCAACGTACAGACAAATCTTCT  
 TAGAGGAACAGGCGGCTTCTAGCCGCACGAGATTGAGCAATAACAGGTCT  
 GTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGAAGGAATC  
 AGCGTGTTTTCCCTGGCCGAAAGGCCCGGGTAACCCGCTGAACCTCCTTC  
 GTGCTAGGGATTGGGGCTTGCAATTATTCCCATGAACGAGGAATCCCA  
 GTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTGTACA  
 CACCGCCCGTTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAGTGAGGTCTTCGGACT  
 GGTGCGCGGCCAGTGCCTCGGCATGCCGATATTACCGGGAAGATGACCAA  
 AACTTGATCATTTAGAGGGAAGTAAAGTCGTACCAGGGTTTTCCCGTAGG  
 TAAACTCGAGATTC

***Melipona quinquefasciata* – amostra Luziânia, Goiás**

TTGTCAAGTAAGGCTGTTGTATTTGAAACCCGCGAATGGCTCATTAAATC  
AGTTATGGTTTCTTAGATCGTACCCACATTTACTTGGATAACTGTGGTAA  
TTCTAGAGCTAATACATGCAAACGAAGTTCCTCTCAGAGATGGGAGGAAT  
GCTTTTATTAGATCAAAACCAATCGGTGGCGGATGGCTCGCTGTCCGTCC  
ATCGTTTGGCTTGGTGACTCTGAATAACTTTATGCCGATCGCATGGTCAT  
CAAGCACCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCTTATCAACTGTTCGATG  
GTAGGTTCTGCGCCTACCATGGTTGTAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTT  
CGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACAGCTACCACATCCAAGGAAGGCA  
GCAGGCGCGCAAATTACCCACTCCCAGGACGGGGAGGTAGTGACGAAAAA  
TAACGATACGGGACTCATCCGAGGCCCGTAATCGGAATGAGTACACTTT  
AAATCCTTTAACGAGGACCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCG  
CGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCGGTTAAAAAG  
CTCGTAGTTGAATCTGTGTGTACAGTGTTCGGTTCACCGCTCGCGGTGTT  
TAACTGGCATTATGTGATACGTCTTATCGGTGGGCTTAGCTCCTTGTGGG  
CGGTCCAATAATCTCCCATCGCGGTGCTTCTACTGAGTGTTCGAGGTGG  
GCCGATACGTTTACTTTGAACAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCTACCTT  
CGCCTGAATACTGTGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATT  
TTGTTGGTTTTTCGGAGCCCCGAGGTAATGATTAATAGGGACAGATGGGGG  
CATTTCGTATTGCGACGTTAGAGGTGAAATTCTTGGATCGTCGCAAGACGG  
ACAGAAGCGAAAGCATTTGCCAAAAATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAA  
GTTAGAGGTTGGAAGGCGATCAGATACCGCCCTAGTTCTAACCATAAACG  
ATGCCAGCCAGCGATCCGCCGAAGTTCCTCAGATGACTCGGCCGGCAGCT  
TCCGGGAAACCAAAGCTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCT  
GAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACACCAGGAGTGGAGCCTGCGG  
CTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCAGGCCCGGACACCGGAAGG  
ATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTTCGGTGGGTGGTGGTGCATGGC  
CGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCGGATAACGAACGA  
GACTCTAGCCTGCTAAATAGACGTAACCTTATGGTATCTCGAAGGCCCCCG  
GCTTCGGTTCGGTGGGTTTTTACTACCAACGTACAGACAAATCTTCTTAGA  
GGAACAGGCGGCTTCTAGCCGCACGAGATTGAGCAATAACAGGTCTGTGA  
TGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCTACACTGAAGGAATCAGCG  
TGTTTTCCCTGGCCGAAAGGCCCGGTAACCCGCTGAACCTCCTTCGTGC  
TAGGGATTGGGGCTTGCAATTATTCCTCATGAACGAGGAATTCCCAGTAA  
GCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACC  
GCCCCGCTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAGTGAGGTCTTCGGACTGGTG  
CGCGGCCAGTGCCTCGGCATGCCGATGTTACCGGGAAGATGACCAAACCTT  
GATCATAAAGAGGAAGTAAAAGTCGTACCAGGTTCCGTAGGTAACCTGCG  
AGATTC

***Melipona quinquefasciata* – amostra Chapada 3, Ceará**

CGCGATGGCTCATCATCAGTGTGGTTCTTAGATCGTACCACATTTACTT  
GGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCAAACGAAGTTCCTCTC  
AGAGATGGGAGGAATGCTTTTATTAGATCAAAACCAATCGGTGGCGGATG  
GCTCGCTGTCCGTCCATCGTTTGGTTTGGTGAATCTGAATAACTTTATGC  
CGATCGCATGGTTCATCAAGCACCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCT  
TATCAACTGTTCGATGGTAGGTTCTGCGCCTACCATGGTTGTAACGGGTAA  
CGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACAGCTACCA  
CATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCACTCCCGGCACGGGGA  
GGTAGTGACGAAAAATAACGATACGGGACTCATCCGAGGCCCGTAATCG  
GAATGAGTACACTTTAAATCCTTTAACGAGGACCAATTGGAGGGCAAGTC  
TGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTT  
GTTGCGGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATCTGTGTGTACAGTGTCCGGTTC  
ACCGCTCGCGGTGTTTAACTGGCATTATGTGATACGTCTTATCGGTGGGC  
TTAGCTCCTTGTGGGCGGTCCAATACTCTCCATCGCGGTGCTCTTAC  
TGAGTGTTCGAGGTGGGCCGATACGTTTACTTTGAACAAATTAGAGTGCTT  
AAAGCAGGCTACCTTCGCCTGAATACTGTGTGCATGGAATAATGGAATAG  
GACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTCGGAGCCCCGAGGTAATGATTAAT  
AGGGACAGATGGGGGCATTTCGTATTGCGACGTTAGAGGTGAAATTCCTGG  
ATCGTTCGCAAGACGGACAGAAGCGAAAGCATTTCGCAAAAATGTTTTCAT  
TAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGTTCAAGGCGATCAGATACCGCCCTAG  
TTCTAACCATAAACGATGCCAGCCAGCGATCCGCCGAAGTTCTTCAGATG  
ACTCGGCGGGCAGCTTCCGGGAAACCAAAGCTTTTGGGTTCGGGGGAAG  
TATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACACCAG  
GAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCAGGC  
CCGGACACCGGAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCGGTGG  
GTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAAT  
TCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTGCTAAATAGACGTAACCTTATGGTA  
TCTCGAAGGCCCCCCGGCTTCGGTTCGGTGGGTTTTTACTACCAACGTACAG  
ACAAATCTTCTTAGAGGAACAGGCGGCTTCTAGCCGCACGAGATTGAGCA  
ATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACA  
CTGAAGGAATCAGCGTGTTCCTGCGCCGAAAGGCCCGGGTAACCCGCT  
GAACCTCCTTCGTGCTAGGGATTGGGGCTTGCAATTATTCCCATGAACG  
AGGAATTCCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTG  
CCCTTTGTACACACCGCCGTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAGTGAG  
GTCTTCGGACTGGTGCAGCGGCCAGTGCCTCGGCATGCCGATGTTACCGGG  
AAGATGACCAAACATGATCATTAAGAGGAAGGAAAGTCTGGAAACCCGCT  
GAACCTCCTTCGTGCTAGGGATT

***Melipona quinquefasciata* – amostra Ubajara, Ceará**

TTAAACTGTTGATTTGAAACGCGAATGGCTCATAACATCAGTTTGTGTTCT  
TAGATCGTACCCACATTTACTTGTGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAA  
TACATGCAAACGAAGTTCCTCTCAGAGATGGGAGGAATGCTTTTATTAGA  
TCAAACCAATCGGTGGCGGATGGCTCGCTGTCCGTCCATCGTTTGCTTT  
GGTGA CTCTGAATAACTTTATGCCGATCGCATGGTCATCAAGCACCGGCG  
ACGCATCTTTCAAATGTCTGCCTTATCAACTGTTCGATGGTAGGTTCTGCG  
CCTACCATGGTTGTAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGA  
GGGAGCCTGAGAAACAGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA  
ATTACCCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACGATACGGG  
ACTCATCCGAGGCCCGTAATCGGAATGAGTACACTTTAAATCCTTTAAC  
GAGGACCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAG  
CTCCAATAGCGTATATTAAGTGTGTTGCGGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAA  
TCTGTGTGTCACAGTGTCCGTTCCACCGCTCGCGGTGTTAACTGGCATT  
TGTGATACGTCTATCGGTGGGCTTAGCTCCTTGTGGGCGGTCCAACATA  
TCTCCCATCGCGGTGCTCTTCACTGAGTGTTCGAGGTGGGCGGATACGTTT  
ACTTTGAACAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCTACCTTCGCCTGAATACT  
GTGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGTTGTTTC  
GGAGCCCCGAGGTAATGATTAATAGGGACAGATGGGGGCATTGTTATTGC  
GACGTTAGAGGTGAAATTTCTTGGATCGTCGCAAGACGGACAGAAGCGAAA  
GCATTTGCCAAAAATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGTTTCG  
AAGGCGATCAGATACCGCCCTAGTTCTAACCATAAACGATGCCAGCCAGC  
GATCCGCCGAAGTTCTTTCAGATGACTCGGCGGGCAGCTTCCGGGAAACCA  
AAGCTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGG  
AATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACT  
CAACACGGGAAACCTCACCAGGCCCGGACACCGGAAGGATTGACAGATTG  
ATAGCTCTTCTTGATTCGGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTACTTAGTTGG  
TGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTTCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTGC  
TAAATAGACGTAACCTTATGGTATCTCGAAGGCCCGGCTTCCGGTCCGGTG  
GGTTTTTACTACCAACGTACAGACAAATCTTCTTAGAGGAACAGGCGGCT  
TCTAGCCGCACGAGATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGT  
TCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGTTTTCCCTGGC  
CGAAAGGCCCGGTAACCCGCTGAACCTCCTTCGTGCTAGGGATTGGGGC  
TTGCAATTATTTCCCATGAACGAGGAATTTCCAGTAAGCGCGAGTCATAA  
GCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTTCGCTACT  
ACCGATTGAATGATTTAGTGAGGTCTTCCGACTGGTGGCGGCGCCAGTGCC  
TCGGCATTGCCGATGTTACCGGGAAGATGACCAAACCTGATCATAAGAGGA  
AGTTAAGTCTAAAAGTGATTCGTGTGTCCGGTGTGTGTT

***Melipona quinquefasciata* – AY773344.1 - amostra Jardim 1, Ceará**

CAAGTTACCACCATGGTCCAGACCAGGCCGTATAAAAAGTGAACCGCGAAT  
GGCTCATTAAATCAGTTATGGTTTCTTAGATCGTACCCACATTTACTTGG  
ATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCAAACGAAGTTCCTCTCAG  
AGATGGGAGGAATGCTTTTATTAGATCAAACCAATCGGTGGCGGATGGC  
TCGCTGTCCGTCCATCGTTTGCTTTGGTGACTCTGAATAACTTTATGCCG  
ATCGCATGGTCATCAAGCACCGGCGACGCATCTTCAAATGTCTGCCTTA  
TCAACTGTCGATGGTAGGTTCTGCGCCTACCATGGTTGTAACGGGTAACG  
GGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACAGCTACCACA  
TCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCACTCCCGGCACGGGGGAG  
GTAGTGACGAAAAATAACGATACGGGACTCATCCGAGGCCCGTAATCGG  
AATGAGTACACTTTAAATCCTTTAACGAGGACCAATTGGAGGGCAAGTCT  
GGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTG  
TTGCGGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATCTGTGTGTACAGTGTGGTTCA  
CCGCTCGCGGTGTTTAACTGGCATTATGTGATACGTCCTATCGGTGGGCT  
TAGCTCCTTGTGGGCGGTCCAATACTCCCATCGCGGTGCTCTTCACT  
GAGTGTGAGGTGGGCCGATACGTTTACTTTGAACAAATTAGAGTGCTTA  
AAGCAGGCTACCTTCGCCTGAATACTGTGTGCATGGAATAATGGAATAGG  
ACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGGAGCCCCGAGGTAATGATTAATA  
GGGACAGATGGGGGCATTTCGTATTGCGACGTTAGAGGTGAAATTCCTGGA  
TCGTGCAAGACGGACAGAAGCGAAAGCATTTGCCAAAAATGTTTTTCATT  
AATCAAGAACGAAAGTTAGAGGTTTGAAGGCGATCAGATACCGCCCTAGT  
TCTAACCATAAACGATGCCAGCCAGCGATCCGCCGAAGTCTTCAGATGA  
CTCGGCGGGCAGCTTCCGGGAAACCAAAGCTTTTGGGTTCCGGGGGAAGT  
ATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGCACCACCAGGA  
GTGGAGCCTGCGGCATAATTGACTCAACACGGAAACCTCACCAGGCCCGG  
ACACCGGAAGGACTTGACAGATTGATAGCTCTTCTTGATTCCGGTGGGTG  
GTGGTGCATGGCCGTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCCG  
ATAACGAACGAGACTCTAGCCTGCTAAATAGACGTAACCTTATGGTATCTC  
GAAGGCCCCCGCTTCGGTCCGTGGGTTTTTACTACCAACGTACAGACAA  
ATCTTCTTAGAGGAACAGGCGGCTTCTAGCCGCACGAGATTGAGCAATAA  
CAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGA  
AGGAATCAGCGTGTTTTCCCTGGCCGAAAGGCCCGGTAACCCGCTGAAC  
CTCCTTCGTGCTAGGGATTGGGGCTTGCAATTATTCCCATGAACGAGGA  
ATTCCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCT  
TTGTACACACCGCCCGTTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAGTGAGGTCT  
TCGGACTGGTGCAGCGCCAGTGCCTCGGCATTGCCGATGTACCGGGAAGA  
TGACCAAACCTTGATCATTTAAGGAAGGAAAGTCTAACAGTTCGTAGCTGG

***Melipona quinquefasciata* – amostra Flona 2, Ceará**

TCGGCAGATAACCAGCAGTTCAGTACAGCTGTATAAAGTGAACCGCGAATG  
GCTCATTAATCAGTTATGGTTTCTTAGATCGTACCCACATTTACTTGGGA  
TAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCAAACGAAGTTCCTCTCAGA  
GATGGGAGGAATGCTTTTATTAGATCAAAACCAATCGGTGGCGGATGGCT  
CGCTGTCCGTCCATCGTTTGGCTTTGGTGACTCTGAATAACTTTATGCCGA  
TCGCATGGTCATCAAGCACCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCTTAT  
CAACTGTTCGATGGTAGGTTCTGCGCCTACCATGGTTGTAACGGGTAACGG  
GGAATCAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACAGCTACCACAT  
CCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTAACCACTCCCGGCACGGGGAGGT  
AGTGACGAAAAATAACGATACGGGACTCATCCGAGGCCCGTAATCGGAA  
TGAGTACACTTTAAATCCTTTAACGAGGACCAATTGGAGGGCAAGTCTGG  
TGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTT  
GCGGTTAAAAGCTCGTAGTTGAATCTGTGTGTCACAGTGTTCGGTTCACC  
GCTCGCGGTGTTTAACTGGCATTATGTGATACGTCCTATCGGTGGGCTTA  
GCTCCTTGTGGGCGGTCCAATAATCTCCCATCGCGGTGCTCTTCACTGA  
GTGTTCGAGGTGGGCCGATACGTTTACTTTGAACAAATTAGAGTGC'TTAAA  
GCAGGCTACCTTCGCCTGAATACTGTGTGCATGGAATAATGGAATAGGAC  
CTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGGAGCCCCGAGGTAATGATTAATAGG  
GACAGATGGGGGCATTCGTATTGCGACGTTAGAGGTGAAATTCTTGGATC  
GTCGCAAGACGGACAGAAGCGAAAGCATTGTCGCAAAAATGTTTTATTAA  
TCAAGAACGAAAGTTAGAGGTTTCGAAGGCGATCAGATAACCGCCCTAGTTC  
TAACCATAAACGATGCCAGCCAGCGATCCGCCGAAGTTCCTTCAGATGACT  
CGGCGGGCAGCTTCCGGGAAACCAAAGCTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTAT  
GGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAG  
TGGAGCCTGCGGGTTAATTTGACTCAACACGGGAACCTCACCAGGCCCGG  
ACACCGGAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTTCGGTGGGTGG  
TGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCG  
ATAACGAACGAGACTCTAGCCTGCTAAATAGACGTAACCTTATGGTATCTC  
GAAGGCCCCCGCTTCGGTCGGTGGGTTTTTACTACCAACGTACAGACAA  
ATCTTCTTAGAGGAACAGGCGGCTTCTAGCCGCACGAGATTGAGCAATAA  
CAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGA  
AGGAATCAGCGTGTTTTCCCTGGCCGAAAGGCCCGGGTAACCCGCTGAAC  
CTCCTTCGTGCTAGGGATTGGGGCTTGCAATTATTCCCATGAACGAGGA  
ATTCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCT  
TTGTACACACCGCCCGTTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAGTGAGGTCT  
TCGGACTGGTGCAGCGCCAGTGCCTCGGCATTGCCGATGTTACCGGGAAG  
ATGACCAAACCTTGATCATTTAGAGGAAGTAAGTCGGGTAACCCGCTGAAC  
CTCCTTCGTGCTAGGGATT

## 10.2. Sequências consenso da região ITS1 parcial

### *Melipona quinquefasciata* – amostra Flona 1, Ceará

CTCTCCGGGTAACCTGGAACCCATGTTGCAATGTGTGGAATGTGCGCCCGTTTCGTGCGCT  
 TCTCGTCGAAATTTTGCTCGAAAATTCCTTCGTTTCGGAGATGGACCGGCTGTGCAGCCCT  
 TTTTTTTTTTCTCGAACTCCAACCTGCCTTTCTCGAAAGGCATCTTCGGGGCCGGCTGTGC  
 GTCCCTCGATCGAACTATTCGATCCGAACGTGTGTGTGTTTCGTCCTTACCTCGAACGTGC  
 CCGTTCGGTGAGGTGAAAGCGCGCGGGCCAGCCACGGCGCAATGGTTCGCGAGATCGTGC  
 GTAGAACAGGATTCAGTAACGGACGAATCACTTCCCGTCGTTTCCTTACGTTCCGCGATT  
 CTCGTTGGTTATATTAATGAACTTTACGCCCCGTCGTCGTTGACGGATTTTCGTCTC  
 GAACAGACTCTTGTGTCGTCAATCGGTACCGCGTCTGCGGTGTGCGTGTATGGCGACGCG  
 CCGCACCTTCGTTTACCCGTTGGGCGATGGTGTGCGGTGTGCGATTCTTTTTTCGACCGAG  
 TAATTAAGAATTTATGCCAACAGTAATGAATA

### *Melipona quinquefasciata* – amostra Flona 2, Ceará

CCGGGTAACCCTGGGACCCATGTTGCAATGTGTGGAATGTGCGCCCGTTTCGTGCGCTTCT  
 CGTCGAAATTTTGCTCGAAAATTCCTTCGTTTCGGAGATGGACCGGCTGTGCAGCCCTTTT  
 TTTTTTTTCTCGAACTCCAACCTGCCTTTCTCGAAAGGCATCTTCGGGGCCGGCTGTGCGTC  
 CTCGATCGAACTATTCGATCCGAACGTGTGTGTGTTTCGTCCTTACCTCGAACGTGCGCG  
 TTCGGTGAGGTGAAAGCGCGCGGGCCAGCCACGGCGCAATGGTTCGCGAGATCGTGCGTA  
 GAACAGGATTCAGTAACGGACGAATCACTTCCCGTCGTTTCCTTACGTTCCGCGATTCTC  
 GTTGGTTATATTAATGAACTTTACGCCCCGTCGTCGTTGACGGATTTTCGTCTCGAA  
 CAGACTCTTGTGTCGTCAATCGGTACCGCGTCTGCGGTGTGCGTGTATGGCGACGCCCCG  
 ACCTTCGTTTACCCGTTGGGCGATGGTGTGCGGTTTCGGATTCTTTTTTCGAACCGAGTAA  
 TTAAGAATTTATGCCAACAGTAATGAATA

### *Melipona quinquefasciata* – amostra Flona 3, Ceará

TGCGCCCGTTTCGTGCGCTTCTCGTCGAAATTTTGCTCGAAAATTCCTTCGTTTCGGAGATG  
 GACCGGCTGTGCAGCCCTTTTTTTTTTTTCTCGAACTCCAACCTGCCTTTCTCGAAAGGCAT  
 CTTCGGGGCCGGCTGTGCGTCCTCGATCGAACTATTCGATCCGAACGTGTGTGTGTTTCG  
 TCCTTACCTCGAACGTGCGCCGTTTCGGTGAGGTGAAAGCGCGCGGGCCAGCCACGGCGCAA  
 TGGTTCGCGAGATCGTGCGTAGAACAGGATTCAGTAACGGACGAATCACTTCCCGTCGTT  
 TCCTTACGTTCCGCGATTCTCGTTGGTTATATTAATGAACTTTACGCCCCGTCGTCGTC  
 GTTACGGATTTTCGTCTCGAACAGACTCTTGTGTCGTCAATCGGTACCGCGTCTGCGGTG  
 TGGCGTGTATGGCGACGCCCCGACCTTCGTTTACCCGTTGGGCGATGGTGTGCGGTTTCG  
 GATTCTTTTTTCGAACCGAGTAATTAAGATTTATGCCAACAGTAATGAATA

***Melipona quinquefasciata* – amostra Araripe 1, Ceará**

CTCTCCGGGTAACCTGGAACCCATGTTGCAATGTGTGGAATGTGCGCCCGTTTCGTGCT  
 TCTCGTCGAAATTTTGTCTCGAAAATTCCTTCGTTTCGGAGATGGACCGGCTGTGCAGCCCT  
 TTTTTTTTTTCTCGAACTCCAACCTGCCTTTCTCGAAAGGCATCTTCGGGGCCGGCTGTGC  
 GTCCTCGATCGAACTATTCGATCCGAACGTGTGTGTGTTTCGTCCTTACCTCGAACGTGC  
 CCGTTCGGTGAGGTGAAAGCGCGCGGGCCAGCCACGGCGCAATGGTTCGCGAGATCGTGC  
 GTAGAACAGGATTCAGTAACGGACGAATCACTTCCCGTCGTTTCCTTACGTTCCGCGATT  
 CTCGTTGGTTATATTAATGAACTTTACGCCCCGTCCGTCGTCGTTGACGGATTTTCGTCTC  
 GAACAGACTCTTGTGTCGTCAATCGGTACCGCGTCTGCGGTGTGCGTGTATGGCGACGCC  
 CGCACCTTCGTTTACCCGTTGGGCGATGGTGTGCGGTTTCGGATTCTTTTTTCGAACCGAG  
 TAATTAAGATTATGCCTACAGTAAAGAAAG

***Melipona quinquefasciata* – amostra Araripe 3, Ceará**

GTGCGCCCGTTTCGTGCTTCTCGTCGAAATTTTGTCTCGAAAATTCCTTCGTTTCGGAGAT  
 GGACCGGCTGTGCAGCCCTTTTTTTTTTTTCTCGAACTCCAACCTGCCTTTCTCGAAAGGCA  
 TCTTCGGGGCCGGCTGTGCGTCTCGATCGAACTATTCGATCCGAACGTGTGTGTGTTTC  
 GTCCTTACCTCGAACGTCGCCGTTTCGGTGAGGTGAAAGCGCGCGGGCCAGCCACGGCGCA  
 ATGGTTCGCGAGATCGTGCGTAGAACAGGATTCAGTAACGGACGAATCACTTCCCGTCGT  
 TTCCTTACGTTCCGCGATTCTCGTTGGTTATATTAATGAACTTTACGCCCCGTCCGTCGT  
 CGTTGACGGATTTTCGTCTCGAACAGACTCTTGTGTCGTCAATCGGTACCGCGTCTGCGGT  
 GTGCGTGTATGGCGACGCCCGCACCTTCGTTTACCCGTTGGGCAGATGGTCTCGTTTTCG  
 GATGATCTATG

***Melipona quinquefasciata* – amostra Jardim 1, Ceará**

TTTCTATTTTGTGAATGTGCGCCCGTTTGTGCTTTTTCTCGTCGAAATTTTGTCTCGTAAA  
 TTCCTTCGTTTCGGAGATGGACCGGCTGTGCAGCCCTTTTTTTTTTTTCTCGAACTCCTACT  
 GCCTTTCTCGAAAGGCATCTTCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGAACTATTCGATCC  
 GAACGTGTGTGTGTTTCGTCCTTACCTCGAACGTCGCCGTTTCGGTGAGGTGAAAGCGCGC  
 GGGCCAGCCACGGCGCAATGGTTCGCGAGATCGTGCGTAGAACAGGATTCAGTAACGGAC  
 GAATCACTTCCCGTCGTTTCCTTACGTTCCGCGATTCTCGTTGGTTATATTAATGAACT  
 TTACGCCCCGTCCGTCGTGTTGACGGATTTTCGTCTCGAACAGACTCTTGTGTCGTCAATC  
 GGTACCGCGTCTGCGGTGTGCGTGTATGGCGACGCCCGCACCTTCGTTTACCCGTTGGGC  
 GATGGTGTGAGGTTTCGGATGTATTTGTGCTCCGAGAGT

***Melipona quinquefasciata* – amostra São Benedito, Ceará**

CTCTCCGGGTAACCTGGAACCCATGTTGCAATTTGTGGAATGTGCGCCCGTTTCGTTCGCT  
 TCTCGTCGAAATTTTGCTCGAAAATCCTTCGTTTCGGAGATGGACCGGCTGTGCAGCCCC  
 TTTTTTTTTTCTCGAACTCCAACCTGCCTTTCTCGAAAGGCATCTTCGGGGCCGGCTGTGC  
 GTCCTCGATCGAACTATTCGATCCGAACGTGTGTGTGTTTCGTTCCTTACCTCGAACGTGC  
 CCGTTCGGTGAGGTGAAAGCGCGCGGGCCAGCCACGGCGCAATGGTTCGCGAGATCGTGC  
 GTAGAACAGGATTCAGTAACGGACGAATCACTTCCCGTCGTTTCCTTACGTTCCGCGATT  
 CTCGTTGGTTATATTAATGAACTTTACGCCCCGTCGTCGTTGACGGATTTTCGTCTC  
 GAACAGACTCTTGTGTCGTCAATCGGTACCGCGTCTGCGGTGTGCGTGTATGGCGACGCC  
 CGCACCTTCGTTTACCCGTTGGGCGATGGTGTGCGGTTTCGGATTCTTTTTTCGAACCGAG  
 TAATTAAGATTTATGCCACAGTAATGAATA

***Melipona quinquefasciata* – amostra Piauí 1, Piauí**

CTCTCCGGGTAACCTGGAACCAATGTTGCAATGTGTGGAATGTGCGCCCGTTTCGTTCGCT  
 TCTCGTCGAAATTTTGCTCGAAAATCCTTCGTTTCGGAGATGGACCGGCTGTGCAGCCCC  
 TTTTTTTTTTCTCGAACTCCAACCTGCCTTTCTCGAAAGGCATCTTCGGGGCCGGCTGTGC  
 GTCCTCGATCGAACTATTCGATCCGAACGTGTGTGTGTTTCGTTCCTTACCTCGAACGTGC  
 CCGTTCGGTGAGGTGAAAGCGCGCGGGCCAGCCACGGCGCAATGGTTCGCGAGATCGTGC  
 GTAGAACAGGATTCAGTAACGGACGAATCACTTCCCGTCGTTTCCTTACGTTCCGCGATT  
 CTCGTTGGTTATATTAATGAACTTTACGCCCCGTCGTCGTTGACGGATTTTCGTCTC  
 GAACAGACTCTTGTGTCGTCAATCGGTACCGCGTCTGCGGTGTGCGTGTATGGCGACGCC  
 CGCACCTTCGTTTACCCGTTGGGCGATGGTGTGCGGTTTCGGATTCTTTTTGTGCGATACC  
 GAGTAAATAAGGACATAATGCCAG

***Melipona quinquefasciata* – amostra Goiás, Goiás**

GTCGCTATGTGTGGAATGTGCCCCCGTTTTGTTCGTTTCTTGGCGATATTTGTCTCGAATA  
 CTCCTTC'TTTGGGAGATGGACCGGCTGTGCAGCCCC'TTTTTTTTTTCTCGAACTCCAACCT  
 GCCTTTCTCGAAAGGCATCTTCGGGGCCGGCTGTGCGTTCCTCGATCGAACTATTCGATCC  
 GAACGTTTGTGTGTTTCGTTCCTTACCTCGAACGTCGCCGTTTCGGTGAGGTGAAAGCGCGC  
 GGGCCAGCCACGGCGCAATGGTTCGCGAGATCGTGCGTAGAACAGGATTCAGTAACGGAC  
 GAATCACTTCCCGTCGTTTCCTTACGTTCCGCGATTCTCGTTGGTTATATTAATGAACT  
 TTACGCCCGTCCGTTCGTCGTTGACGGATTTTCGTCTCGAACAGACTCTTGTGTCGTCAATC  
 GGCACCGCGTCTGCGGTGTGCGTGTATGGCGACGCCCGCACCATTCGTTACCCGTTGGGC  
 GATGGTGTGCGGTTTCGGATTCTTTTTTCGAACCGAGTAATTAAGAATTATGCCGACAGTA  
 ATGAAAA



490 500 510 520 530 540  
**M. quinquefasciata** Araripe3  
**M. quinquefasciata** Goias  
**M. quinquefasciata** Chapada3  
**M. quinquefasciata** Ubajara  
**AY773344** *M. quinquefasciata* Jardim1  
**M. quinquefasciata** Flona2

550 560 570 580 590 600  
**M. quinquefasciata** Araripe3  
**M. quinquefasciata** Goias  
**M. quinquefasciata** Chapada3  
**M. quinquefasciata** Ubajara  
**AY773344** *M. quinquefasciata* Jardim1  
**M. quinquefasciata** Flona2

610 620 630 640 650 660  
**M. quinquefasciata** Araripe3  
**M. quinquefasciata** Goias  
**M. quinquefasciata** Chapada3  
**M. quinquefasciata** Ubajara  
**AY773344** *M. quinquefasciata* Jardim1  
**M. quinquefasciata** Flona2

670 680 690 700 710 720  
**M. quinquefasciata** Araripe3  
**M. quinquefasciata** Goias  
**M. quinquefasciata** Chapada3  
**M. quinquefasciata** Ubajara  
**AY773344** *M. quinquefasciata* Jardim1  
**M. quinquefasciata** Flona2

730 740 750 760 770 780  
**M. quinquefasciata** Araripe3  
**M. quinquefasciata** Goias  
**M. quinquefasciata** Chapada3  
**M. quinquefasciata** Ubajara  
**AY773344** *M. quinquefasciata* Jardim1  
**M. quinquefasciata** Flona2

790 800 810 820 830 840  
**M. quinquefasciata** Araripe3  
**M. quinquefasciata** Goias  
**M. quinquefasciata** Chapada3  
**M. quinquefasciata** Ubajara  
**AY773344** *M. quinquefasciata* Jardim1  
**M. quinquefasciata** Flona2

850 860 870 880 890 900  
**M. quinquefasciata** Araripe3  
**M. quinquefasciata** Goias  
**M. quinquefasciata** Chapada3  
**M. quinquefasciata** Ubajara  
**AY773344** *M. quinquefasciata* Jardim1  
**M. quinquefasciata** Flona2

910 920 930 940 950 960  
**M. quinquefasciata** Araripe3  
**M. quinquefasciata** Goias  
**M. quinquefasciata** Chapada3  
**M. quinquefasciata** Ubajara  
**AY773344** *M. quinquefasciata* Jardim1  
**M. quinquefasciata** Flona2



1450 1460 1470 1480 1490 1500

M. quinquefasciata\_Araripe3  
M. quinquefasciata\_Goias  
M. quinquefasciata\_Chapada3  
M. quinquefasciata\_Ubajara  
AY773344\_M. quinquefasciata\_Jardim1  
M. quinquefasciata\_Flona2

```

TTTACTACCAACGTACAGACAAATCTTCTTAGAGGAACAGGCGGCTTCTAGCCGCACGAG
TTTACTACCAACGTACAGACAAATCTTCTTAGAGGAACAGGCGGCTTCTAGCCGCACGAG
TTTACTACCAACGTACAGACAAATCTTCTTAGAGGAACAGGCGGCTTCTAGCCGCACGAG
TTTACTACCAACGTACAGACAAATCTTCTTAGAGGAACAGGCGGCTTCTAGCCGCACGAG
TTTACTACCAACGTACAGACAAATCTTCTTAGAGGAACAGGCGGCTTCTAGCCGCACGAG
TTTACTACCAACGTACAGACAAATCTTCTTAGAGGAACAGGCGGCTTCTAGCCGCACGAG

```

1510 1520 1530 1540 1550 1560

M. quinquefasciata\_Araripe3  
M. quinquefasciata\_Goias  
M. quinquefasciata\_Chapada3  
M. quinquefasciata\_Ubajara  
AY773344\_M. quinquefasciata\_Jardim1  
M. quinquefasciata\_Flona2

```

ATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCGCACGCGCGCTACACT
ATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCGCACGCGCGCTACACT
ATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCGCACGCGCGCTACACT
ATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCGCACGCGCGCTACACT
ATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCGCACGCGCGCTACACT
ATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCGCACGCGCGCTACACT

```

1570 1580 1590 1600 1610 1620

M. quinquefasciata\_Araripe3  
M. quinquefasciata\_Goias  
M. quinquefasciata\_Chapada3  
M. quinquefasciata\_Ubajara  
AY773344\_M. quinquefasciata\_Jardim1  
M. quinquefasciata\_Flona2

```

GAAGGAATCAGCGTGTTCCTGGCCGAAAAGGCCGGGTAACCCGCTGAACCTCCTTCG
GAAGGAATCAGCGTGTTCCTGGCCGAAAAGGCCGGGTAACCCGCTGAACCTCCTTCG
GAAGGAATCAGCGTGTTCCTGGCCGAAAAGGCCGGGTAACCCGCTGAACCTCCTTCG
GAAGGAATCAGCGTGTTCCTGGCCGAAAAGGCCGGGTAACCCGCTGAACCTCCTTCG
GAAGGAATCAGCGTGTTCCTGGCCGAAAAGGCCGGGTAACCCGCTGAACCTCCTTCG
GAAGGAATCAGCGTGTTCCTGGCCGAAAAGGCCGGGTAACCCGCTGAACCTCCTTCG

```

1630 1640 1650 1660 1670 1680

M. quinquefasciata\_Araripe3  
M. quinquefasciata\_Goias  
M. quinquefasciata\_Chapada3  
M. quinquefasciata\_Ubajara  
AY773344\_M. quinquefasciata\_Jardim1  
M. quinquefasciata\_Flona2

```

TGCTAGGGATTGGGGCTTGCAATTATTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGGAG
TGCTAGGGATTGGGGCTTGCAATTATTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGGAG
TGCTAGGGATTGGGGCTTGCAATTATTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGGAG
TGCTAGGGATTGGGGCTTGCAATTATTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGGAG
TGCTAGGGATTGGGGCTTGCAATTATTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGGAG
TGCTAGGGATTGGGGCTTGCAATTATTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGGAG

```

1690 1700 1710 1720 1730 1740

M. quinquefasciata\_Araripe3  
M. quinquefasciata\_Goias  
M. quinquefasciata\_Chapada3  
M. quinquefasciata\_Ubajara  
AY773344\_M. quinquefasciata\_Jardim1  
M. quinquefasciata\_Flona2

```

TCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCTACTACCG
TCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCTACTACCG
TCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCTACTACCG
TCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCTACTACCG
TCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCTACTACCG
TCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCTACTACCG

```

1750 1760 1770 1780 1790 1800

M. quinquefasciata\_Araripe3  
M. quinquefasciata\_Goias  
M. quinquefasciata\_Chapada3  
M. quinquefasciata\_Ubajara  
AY773344\_M. quinquefasciata\_Jardim1  
M. quinquefasciata\_Flona2

```

ATTGAATGATTTAGTGAGGTCTTCGGACTGGTGCGCGGCCAGTGCCCTCGGCATGCCCAGT
ATTGAATGATTTAGTGAGGTCTTCGGACTGGTGCGCGGCCAGTGCCCTCGGCATGCCCAGT
ATTGAATGATTTAGTGAGGTCTTCGGACTGGTGCGCGGCCAGTGCCCTCGGCATGCCCAGT
ATTGAATGATTTAGTGAGGTCTTCGGACTGGTGCGCGGCCAGTGCCCTCGGCATGCCCAGT
ATTGAATGATTTAGTGAGGTCTTCGGACTGGTGCGCGGCCAGTGCCCTCGGCATGCCCAGT
ATTGAATGATTTAGTGAGGTCTTCGGACTGGTGCGCGGCCAGTGCCCTCGGCATGCCCAGT

```

1810 1820 1830 1840 1850 1860

M. quinquefasciata\_Araripe3  
M. quinquefasciata\_Goias  
M. quinquefasciata\_Chapada3  
M. quinquefasciata\_Ubajara  
AY773344\_M. quinquefasciata\_Jardim1  
M. quinquefasciata\_Flona2

```

ATTACCGGGAAGATGACCAAACTTGGATCATTAGAGGAAAGTAAAGTCGTACCAGGCT
GTTACCGGGAAGATGACCAAACTTGGATCATTAGAGGAAAGTAAAGTCGTACCAGGCT
GTTACCGGGAAGATGACCAAACTTGGATCATTAGAGGAAAGTAAAGTCGTACCAGGCT
GTTACCGGGAAGATGACCAAACTTGGATCATTAGAGGAAAGTAAAGTCGTACCAGGCT
GTTACCGGGAAGATGACCAAACTTGGATCATTAGAGGAAAGTAAAGTCGTACCAGGCT
GTTACCGGGAAGATGACCAAACTTGGATCATTAGAGGAAAGTAAAGTCGTACCAGGCT

```

1870 1880

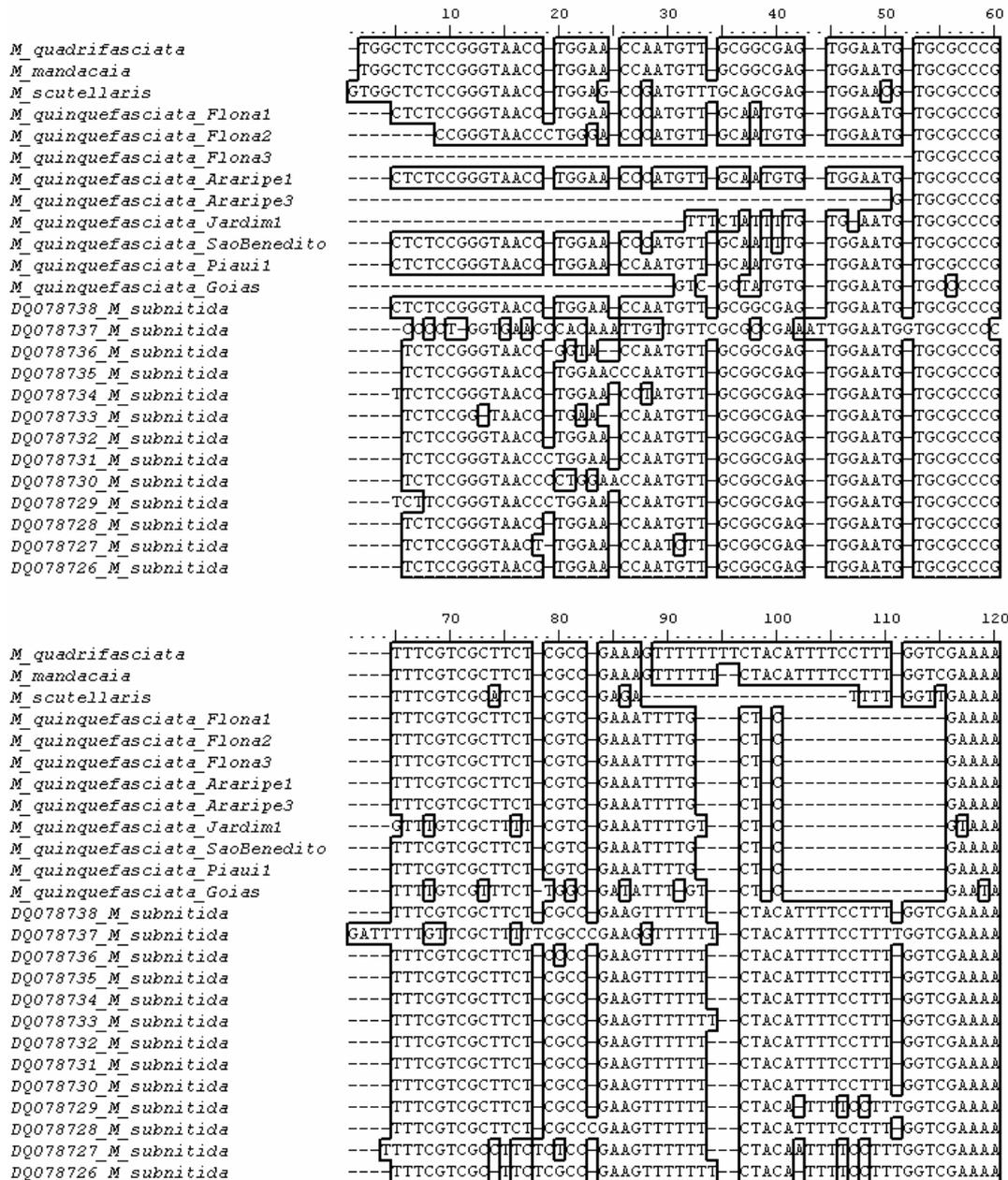
M. quinquefasciata\_Araripe3  
M. quinquefasciata\_Goias  
M. quinquefasciata\_Chapada3  
M. quinquefasciata\_Ubajara  
AY773344\_M. quinquefasciata\_Jardim1  
M. quinquefasciata\_Flona2

```

TTCCCGTAGGTAACTCTGAGATTCT
TTCCCGTAGGTAACTCTGAGATTCT
CTGAACCTCCTTCGTGCTAGGGATT
CTGAGCTCTGCTGCTAGGGATT
CTGAACCTCCTTCGTGCTAGGGATT

```

## 10.4. Alinhamento das seqüências obtidas para região ITS1 parcial



	130	140	150	160	170	180
<i>M_quadrifasciata</i>	TCCGTT	CGGAGGAGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	GTTTT	CTCGAACTC
<i>M_mandacaiia</i>	TCCGTT	CGGAGGAGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	GTTTT	CTCGAACTC
<i>M_scutellaris</i>	TCCGTT	CGGAGGAGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	GTTTT	CTCGAACTC
<i>M_quinquefasciata_Flona1</i>	TTCCCTTCGTT	TCGGAGATGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	TTTTTTTTTT	CTCGAACTC
<i>M_quinquefasciata_Flona2</i>	TTCCCTTCGTT	TCGGAGATGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	TTTTTTTTTT	CTCGAACTC
<i>M_quinquefasciata_Flona3</i>	TTCCCTTCGTT	TCGGAGATGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	TTTTTTTTTT	CTCGAACTC
<i>M_quinquefasciata_Araripe1</i>	TTCCCTTCGTT	TCGGAGATGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	TTTTTTTTTT	CTCGAACTC
<i>M_quinquefasciata_Araripe3</i>	TTCCCTTCGTT	TCGGAGATGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	TTTTTTTTTT	CTCGAACTC
<i>M_quinquefasciata_Jardimi</i>	TTCCCTTCGTT	TCGGAGATGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	TTTTTTTTTT	CTCGAACTC
<i>M_quinquefasciata_SaoBenedito</i>	TTCCCTTCGTT	TCGGAGATGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	TTTTTTTTTT	CTCGAACTC
<i>M_quinquefasciata_Piauui</i>	TTCCCTTCGTT	TCGGAGATGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	TTTTTTTTTT	CTCGAACTC
<i>M_quinquefasciata_Goias</i>	TTCCCTTCGTT	TCGGAGATGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	TTTTTTTTTT	CTCGAACTC
<i>DQ078738_M_subnitida</i>	TCCGTT	CGGAGGAGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	GTTTT	CTCGAACTC
<i>DQ078737_M_subnitida</i>	TCCGTT	CGGAGGAGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	GTTTT	CTCGAACTC
<i>DQ078736_M_subnitida</i>	TCCGTT	CGGAGGAGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	GTTTT	CTCGAACTC
<i>DQ078735_M_subnitida</i>	TCCGTT	CGGAGGAGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	GTTTT	CTCGAACTC
<i>DQ078734_M_subnitida</i>	TCCGTT	CGGAGGAGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	GTTTT	CTCGAACTC
<i>DQ078733_M_subnitida</i>	TCCGTT	CGGAGGAGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	GTTTT	CTCGAACTC
<i>DQ078732_M_subnitida</i>	TCCGTT	CGGAGGAGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	GTTTT	CTCGAACTC
<i>DQ078731_M_subnitida</i>	TCCGTT	CGGAGGAGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	GTTTT	CTCGAACTC
<i>DQ078730_M_subnitida</i>	TCCGTT	CGGAGGAGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	GTTTT	CTCGAACTC
<i>DQ078729_M_subnitida</i>	TCCGTT	CGGAGGAGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	GTTTT	CTCGAACTC
<i>DQ078728_M_subnitida</i>	TCCGTT	CGGAGGAGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	GTTTT	CTCGAACTC
<i>DQ078727_M_subnitida</i>	TCCGTT	CGGAGGAGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	GTTTT	CTCGAACTC
<i>DQ078726_M_subnitida</i>	TCCGTT	CGGAGGAGGACC	GGC	TGTGCAGCCCC	GTTTT	CTCGAACTC

	190	200	210	220	230	240
<i>M_quadrifasciata</i>	TAAACCGTCCTTCT	CGC	GAAGGACCGC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA		
<i>M_mandacaiia</i>	TAAACCGTCCTTCT	CGC	GAAGGACCGC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA		
<i>M_scutellaris</i>	TAAACCGTCCTTCT	CGC	GAAGGACCGC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA		
<i>M_quinquefasciata_Flona1</i>	CAA	CTG	CCTTT	CTC	AAAAGGCATC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA
<i>M_quinquefasciata_Flona2</i>	CAA	CTG	CCTTT	CTC	AAAAGGCATC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA
<i>M_quinquefasciata_Flona3</i>	CAA	CTG	CCTTT	CTC	AAAAGGCATC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA
<i>M_quinquefasciata_Araripe1</i>	CAA	CTG	CCTTT	CTC	AAAAGGCATC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA
<i>M_quinquefasciata_Araripe3</i>	CAA	CTG	CCTTT	CTC	AAAAGGCATC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA
<i>M_quinquefasciata_Jardimi</i>	CAA	CTG	CCTTT	CTC	AAAAGGCATC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA
<i>M_quinquefasciata_SaoBenedito</i>	CAA	CTG	CCTTT	CTC	AAAAGGCATC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA
<i>M_quinquefasciata_Piauui</i>	CAA	CTG	CCTTT	CTC	AAAAGGCATC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA
<i>M_quinquefasciata_Goias</i>	CAA	CTG	CCTTT	CTC	AAAAGGCATC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA
<i>DQ078738_M_subnitida</i>	TAAACCGTCCTTCT	CGC	GAAGGACCGC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA		
<i>DQ078737_M_subnitida</i>	TAAACCGTCCTTCT	CGC	GAAGGACCGC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA		
<i>DQ078736_M_subnitida</i>	TAAACCGTCCTTCT	CGC	GAAGGACCGC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA		
<i>DQ078735_M_subnitida</i>	TAAACCGTCCTTCT	CGC	GAAGGACCGC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA		
<i>DQ078734_M_subnitida</i>	TAAACCGTCCTTCT	CGC	GAAGGACCGC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA		
<i>DQ078733_M_subnitida</i>	TAAACCGTCCTTCT	CGC	GAAGGACCGC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA		
<i>DQ078732_M_subnitida</i>	TAAACCGTCCTTCT	CGC	GAAGGACCGC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA		
<i>DQ078731_M_subnitida</i>	TAAACCGTCCTTCT	CGC	GAAGGACCGC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA		
<i>DQ078730_M_subnitida</i>	TAAACCGTCCTTCT	CGC	GAAGGACCGC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA		
<i>DQ078729_M_subnitida</i>	TAAACCGTCCTTCT	CGC	GAAGGACCGC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA		
<i>DQ078728_M_subnitida</i>	TAAACCGTCCTTCT	CGC	GAAGGACCGC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA		
<i>DQ078727_M_subnitida</i>	TAAACCGTCCTTCT	CGC	GAAGGACCGC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA		
<i>DQ078726_M_subnitida</i>	TAAACCGTCCTTCT	CGC	GAAGGACCGC	TTCCGGGGCCGGCTGTGCGTCTTCGATCGA		



	370	380	390	400	410	420
<i>M_quadrifasciata</i>	GAACAGGATTCGGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	STCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>M_mandacaiia</i>	GAACAGGATTCGGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>M_scutellaris</i>	GAACAGGATTCAGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>M_quinquefasciata_Flona1</i>	GAACAGGATTCAGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>M_quinquefasciata_Flona2</i>	GAACAGGATTCAGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>M_quinquefasciata_Flona3</i>	GAACAGGATTCAGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>M_quinquefasciata_Araripe1</i>	GAACAGGATTCAGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>M_quinquefasciata_Araripe3</i>	GAACAGGATTCAGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>M_quinquefasciata_Jardim1</i>	GAACAGGATTCAGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>M_quinquefasciata_SaoBenedito</i>	GAACAGGATTCAGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>M_quinquefasciata_Piau1</i>	GAACAGGATTCAGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>M_quinquefasciata_Goias</i>	GAACAGGATTCAGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>DQ078738_M_subnitida</i>	GAACAGGATTCGGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>DQ078737_M_subnitida</i>	GAACAGGATTCGGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>DQ078736_M_subnitida</i>	GAACAGGATTCGGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>DQ078735_M_subnitida</i>	GAACAGGATTCGGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>DQ078734_M_subnitida</i>	GAACAGGATTCGGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>DQ078733_M_subnitida</i>	GAACAGGATTCGGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>DQ078732_M_subnitida</i>	GAACAGGATTCGGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>DQ078731_M_subnitida</i>	GAACAGGATTCGGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>DQ078730_M_subnitida</i>	GAACAGGATTCGGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>DQ078729_M_subnitida</i>	GAACAGGATTCGGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>DQ078728_M_subnitida</i>	GAACAGGATTCGGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>DQ078727_M_subnitida</i>	GAACAGGATTCGGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA
<i>DQ078726_M_subnitida</i>	GAACAGGATTCGGTAACGGG	TGAATCACTTCCC	GTCGCTTCC	TTA	CGTT	CCGCGA

	430	440	450	460	470	480
<i>M_quadrifasciata</i>	TTCT	CGATGGTTATT	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTCGACGGAT
<i>M_mandacaiia</i>	TTCT	CGATGGTTATT	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTCGACGGAT
<i>M_scutellaris</i>	TTCT	CGATGGTTATT	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTCGACGGAT
<i>M_quinquefasciata_Flona1</i>	TTCT	CGTTGGTTATA	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTTGACGGAT
<i>M_quinquefasciata_Flona2</i>	TTCT	CGTTGGTTATA	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTTGACGGAT
<i>M_quinquefasciata_Flona3</i>	TTCT	CGTTGGTTATA	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTTGACGGAT
<i>M_quinquefasciata_Araripe1</i>	TTCT	CGTTGGTTATA	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTTGACGGAT
<i>M_quinquefasciata_Araripe3</i>	TTCT	CGTTGGTTATA	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTTGACGGAT
<i>M_quinquefasciata_Jardim1</i>	TTCT	CGTTGGTTATA	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTTGACGGAT
<i>M_quinquefasciata_SaoBenedito</i>	TTCT	CGTTGGTTATA	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTTGACGGAT
<i>M_quinquefasciata_Piau1</i>	TTCT	CGTTGGTTATA	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTTGACGGAT
<i>M_quinquefasciata_Goias</i>	TTCT	CGTTGGTTATA	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTTGACGGAT
<i>DQ078738_M_subnitida</i>	TTCT	CGATGGTTATT	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTCGACGGAT
<i>DQ078737_M_subnitida</i>	TTCT	CGATGGTTATT	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTCGACGGAT
<i>DQ078736_M_subnitida</i>	TTCT	CGATGGTTATT	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTCGACGGAT
<i>DQ078735_M_subnitida</i>	TTCT	CGATGGTTATT	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTCGACGGAT
<i>DQ078734_M_subnitida</i>	TTCT	CGATGGTTATT	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTCGACGGAT
<i>DQ078733_M_subnitida</i>	TTCT	CGATGGTTATT	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTCGACGGAT
<i>DQ078732_M_subnitida</i>	TTCT	CGATGGTTATT	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTCGACGGAT
<i>DQ078731_M_subnitida</i>	TTCT	CGATGGTTATT	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTCGACGGAT
<i>DQ078730_M_subnitida</i>	TTCT	CGATGGTTATT	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTCGACGGAT
<i>DQ078729_M_subnitida</i>	TTCT	CGATGGTTATT	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTCGACGGAT
<i>DQ078728_M_subnitida</i>	TTCT	CGATGGTTATT	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTCGACGGAT
<i>DQ078727_M_subnitida</i>	TTCT	CGATGGTTATT	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTCGACGGAT
<i>DQ078726_M_subnitida</i>	TTCT	CGATGGTTATT	TTAAATGAACTTTA	CGCCCGTCCG	TCGTC	GTCGACGGAT

	490	500	510	520	530	540
<i>M. quadrifasciata</i>	TTTCGTCTCGAACACACACACACAC	CTGTGTCGTCGGTCC	CA	AGCGCG	TCGGCGG	
<i>M. mandacaiá</i>	TTTCGTCTCGAACACACACACACAC	CTGTGTCGTCGGTCC				
<i>M. scutellaris</i>	TTTCGTCTCGAACACACACACAC	CTGTGTCGTCAGTCC	CA	AGCGCG	TCGGCGG	
<i>M. quinquefasciata Flona1</i>	TTTCGTCTCGAACACAGACTC	TTGTGTCGTC	CAATCGGTA	CCGCGT	CTGCGG	
<i>M. quinquefasciata Flona2</i>	TTTCGTCTCGAACACAGACTC	TTGTGTCGTC	CAATCGGTA	CCGCGT	CTGCGG	
<i>M. quinquefasciata Flona3</i>	TTTCGTCTCGAACACAGACTC	TTGTGTCGTC	CAATCGGTA	CCGCGT	CTGCGG	
<i>M. quinquefasciata Araripe1</i>	TTTCGTCTCGAACACAGACTC	TTGTGTCGTC	CAATCGGTA	CCGCGT	CTGCGG	
<i>M. quinquefasciata Araripe3</i>	TTTCGTCTCGAACACAGACTC	TTGTGTCGTC	CAATCGGTA	CCGCGT	CTGCGG	
<i>M. quinquefasciata Jardim1</i>	TTTCGTCTCGAACACAGACTC	TTGTGTCGTC	CAATCGGTA	CCGCGT	CTGCGG	
<i>M. quinquefasciata SaoBenedito</i>	TTTCGTCTCGAACACAGACTC	TTGTGTCGTC	CAATCGGTA	CCGCGT	CTGCGG	
<i>M. quinquefasciata Piaui1</i>	TTTCGTCTCGAACACAGACTC	TTGTGTCGTC	CAATCGGTA	CCGCGT	CTGCGG	
<i>M. quinquefasciata Goias</i>	TTTCGTCTCGAACACAGACTC	TTGTGTCGTC	CAATCGGTA	CCGCGT	CTGCGG	
<i>DQ078738_M subnitida</i>	TTTCGTCTCGAACACACACACACAC	CTGTGTCGTCGGGCC	CA	ACCCGG	TCGGCGG	
<i>DQ078737_M subnitida</i>	TTTCGTCTCGAACACACACACACAC	CTGTGTCGTCGGGCC	GCA	ACCCGGT	TCGGCGG	
<i>DQ078736_M subnitida</i>	TTTCGTCTCGAACACACACACACAC	CTGTGTCGTCGGGCC	CA	ACCCGGT	TCGGCGG	
<i>DQ078735_M subnitida</i>	TTTCGTCTCGAACACACACACACAC	CTGTGTCGTCGGGCC	CA	ACCCGGT	TCGGCGG	
<i>DQ078734_M subnitida</i>	TTTCGTCTCGAACACACACACACAC	CTGTGTCGTCGGGCC	CA	ACCCGGT	TCGGCGG	
<i>DQ078733_M subnitida</i>	TTTCGTCTCGAACACACACACACAC	CTGTGTCGTCGGGCC	CA	ACCCGGT	TCGGCGG	
<i>DQ078732_M subnitida</i>	TTTCGTCTCGAACACACACACACAC	CTGTGTCGTCGGGCC	CA	ACCCGGT	TCGGCGG	
<i>DQ078731_M subnitida</i>	TTTCGTCTCGAACACACACACACAC	CTGTGTCGTCGGGCC	CA	ACCCGGT	TCGGCGG	
<i>DQ078730_M subnitida</i>	TTTCGTCTCGAACACACACACACAC	CTGTGTCGTCGGGCC	CA	ACCCGGT	TCGGCGG	
<i>DQ078729_M subnitida</i>	TTTCGTCTCGAACACACACACACAC	CTGTGTCGTCGGGCC	CA	ACCCGGT	TCGGCGG	
<i>DQ078728_M subnitida</i>	TTTCGTCTCGAACACACACACACAC	CTGTGTCGTCGGGCC	CA	ACCCGGT	TCGGCGG	
<i>DQ078727_M subnitida</i>	TTTCGTCTCGAACACACACACACAC	CTGTGTCGTCGGGCC	CA	ACCCGGT	TCGGCGG	
<i>DQ078726_M subnitida</i>	TTTCGTCTCGAACACACACACACAC	CTGTGTCGTCGGGCC	CA	ACCCGGT	TCGGCGG	

	550	560	570	580	590	600
<i>M. quadrifasciata</i>	TTT GCG TGCCTGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>M. mandacaiá</i>	TTT GCG TGCCTGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>M. scutellaris</i>	GTT GCG TGCATGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>M. quinquefasciata Flona1</i>	TGT GCG TGTATGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>M. quinquefasciata Flona2</i>	TGT GCG TGTATGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>M. quinquefasciata Flona3</i>	TGT GCG TGTATGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>M. quinquefasciata Araripe1</i>	TGT GCG TGTATGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>M. quinquefasciata Araripe3</i>	TGT GCG TGTATGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>M. quinquefasciata Jardim1</i>	TGT GCG TGTATGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>M. quinquefasciata SaoBenedito</i>	TGT GCG TGTATGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>M. quinquefasciata Piaui1</i>	TGT GCG TGTATGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>M. quinquefasciata Goias</i>	TGT GCG TGTATGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>DQ078738_M subnitida</i>	TTT GCG TGCCTGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>DQ078737_M subnitida</i>	TTT GCG TGCCTGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>DQ078736_M subnitida</i>	TTT GCG TGCCTGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>DQ078735_M subnitida</i>	TTT GCG TGCCTGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>DQ078734_M subnitida</i>	TTT GCG TGCCTGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>DQ078733_M subnitida</i>	TTT GCG TGCCTGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>DQ078732_M subnitida</i>	TTT GCG TGCCTGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>DQ078731_M subnitida</i>	TTT GCG TGCCTGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>DQ078730_M subnitida</i>	TTT GCG TGCCTGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>DQ078729_M subnitida</i>	TTT GCG TGCCTGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>DQ078728_M subnitida</i>	TTT GCG TGCCTGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>DQ078727_M subnitida</i>	TTT GCG TGCCTGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT
<i>DQ078726_M subnitida</i>	TTT GCG TGCCTGGCC	ACGCC CGCA	CC	TTCGTTTAC	CCGTTGGGC	GATGGT

610 620 630 640 650 660

```

M_quadrifasciata G TCGGGT CTCGGC TTCCTCTT TCGAA CCGAGTATCTTC CGAGTA CTTAAGA
M_mandacaiia G TCGGGT CTCGGC TTCCTCTT TCGAA CCGAGTACTTTC CGAGTA CTTAAGA
M_scutellaris G TCGGGT CTCGGC TTCCTCTT TCGAA CCGAGTATCTTC CGAGTA CTTAAGA
M_quinquefasciata_Flona1 G TCGGGT CTCGGC TTCCTCTT TCGAA CCGAGTAA TT AAGA
M_quinquefasciata_Flona2 G TCGGGT CTCGGC TTCCTCTT TCGAA CCGAGTAA TT AAGA
M_quinquefasciata_Flona3 G TCGGGT CTCGGC TTCCTCTT TCGAA CCGAGTAA TT AAGA
M_quinquefasciata_Araripe1 G TCGGGT CTCGGC TTCCTCTT TCGAA CCGAGTAA TT AAGA
M_quinquefasciata_Araripe3 C TCGGGT CTCGGC TTCCTCTT TCGAA CCGAGTAA TT AAGA
M_quinquefasciata_Jardim1 G TCGGGT CTCGGC TTCCTCTT TCGAA CCGAGTAA TT AAGA
M_quinquefasciata_SaoBenedito G TCGGGT CTCGGC TTCCTCTT TCGAA CCGAGTAA TT AAGA
M_quinquefasciata_Piau1 GCTCGGGT CTCGGC TTCCTCTT TCGAA CCGAGTAA TT AAGA
M_quinquefasciata_Goias G TCGGGT CTCGGC TTCCTCTT TCGAA CCGAGTAA TT AAGA
DQ078738_M_subnitida G TCGGGTCTC GGC TTCCTCTT TCGAAC CCGAGTATCTTC CGAGTA CTTAAGA
DQ078737_M_subnitida G TCGGGTCTC GGC TTCCTCTT TCGAAC CCGAGTATCTTC CGAGTA CTTAAGA
DQ078736_M_subnitida G TCGGGTCTC GGC TTCCTCTT TCGAAC CCGAGTATCTTC CGAGTA CTTAAGA
DQ078735_M_subnitida G TCGGGTCTC GGC TTCCTCTT TCGAAC CCGAGTATCTTC CGAGTA CTTAAGA
DQ078734_M_subnitida G TCGGGTCTC GGC TTCCTCTT TCGAAC CCGAGTATCTTC CGAGTA CTTAAGA
DQ078733_M_subnitida G TCGGGTCTC GGC TTCCTCTT TCGAAC CCGAGTATCTTC CGAGTA CTTAAGA
DQ078732_M_subnitida G TCGGGTCTC GGC TTCCTCTT TCGAAC CCGAGTATCTTC CGAGTA CTTAAGA
DQ078731_M_subnitida G TCGGGTCTC GGC TTCCTCTT TCGAAC CCGAGTATCTTC CGAGTA CTTAAGA
DQ078730_M_subnitida G TCGGGTCTC GGC TTCCTCTT TCGAAC CCGAGTATCTTC CGAGTA CTTAAGA
DQ078729_M_subnitida G TCGGGTCTC GGC TTCCTCTT TCGAAC CCGAGTATCTTC CGAGTA CTTAAGA
DQ078728_M_subnitida G TCGGGTCTC GGC TTCCTCTT TCGAAC CCGAGTATCTTC CGAGTA CTTAAGA
DQ078727_M_subnitida G TCGGGTCTC GGC TTCCTCTT TCGAAC CCGAGTATCTTC CGAGTA CTTAAGA
DQ078726_M_subnitida G TCGGGTCTC GGC TTCCTCTT TCGAAC CCGAGTATCTTC CGAGTA CTTAAGA

```

670 680 690 700 710 720

```

M_quadrifasciata AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
M_mandacaiia AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
M_scutellaris GTTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
M_quinquefasciata_Flona1 AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
M_quinquefasciata_Flona2 AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
M_quinquefasciata_Flona3 AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
M_quinquefasciata_Araripe1 AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
M_quinquefasciata_Araripe3 AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
M_quinquefasciata_Jardim1 AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
M_quinquefasciata_SaoBenedito AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
M_quinquefasciata_Piau1 AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
M_quinquefasciata_Goias AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
DQ078738_M_subnitida AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
DQ078737_M_subnitida AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
DQ078736_M_subnitida AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
DQ078735_M_subnitida AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
DQ078734_M_subnitida AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
DQ078733_M_subnitida AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
DQ078732_M_subnitida AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
DQ078731_M_subnitida AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
DQ078730_M_subnitida AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
DQ078729_M_subnitida AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
DQ078728_M_subnitida AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
DQ078727_M_subnitida AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC
DQ078726_M_subnitida AT TTTATGAAAAGA TTACAGAATA ATACGATTACCCTGAACGGTGGATCAGTTGGCTC

```

	730	740	
<i>M_quadrifasciata</i>	GTGGGTCGATGAAGAACGCAGCT		AGCT
<i>M_mandacaiá</i>	GTGGGTCGATGAAGAACGCAGCC		AGCT
<i>M_scutellaris</i>	GTGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC		
<i>M_quinquefasciata_Flona1</i>	-----		
<i>M_quinquefasciata_Flona2</i>	-----		
<i>M_quinquefasciata_Flona3</i>	-----		
<i>M_quinquefasciata_Araripé1</i>	-----		
<i>M_quinquefasciata_Araripé3</i>	-----		
<i>M_quinquefasciata_Jardim1</i>	-----		
<i>M_quinquefasciata_SaoBenedito</i>	-----		
<i>M_quinquefasciata_Piauí1</i>	-----		
<i>M_quinquefasciata_Goias</i>	-----		
<i>DQ078738_M_subnitida</i>	-----		
<i>DQ078737_M_subnitida</i>	-----		
<i>DQ078736_M_subnitida</i>	-----		
<i>DQ078735_M_subnitida</i>	-----		
<i>DQ078734_M_subnitida</i>	-----		
<i>DQ078733_M_subnitida</i>	-----		
<i>DQ078732_M_subnitida</i>	-----		
<i>DQ078731_M_subnitida</i>	-----		
<i>DQ078730_M_subnitida</i>	-----		
<i>DQ078729_M_subnitida</i>	-----		
<i>DQ078728_M_subnitida</i>	-----		
<i>DQ078727_M_subnitida</i>	-----		
<i>DQ078726_M_subnitida</i>	-----		