

RUTE MAGALHÃES BRITO

Análise molecular e populacional
de *Partamona mulata* (Moure In Camargo, 1980)
e *Partamona helleri* (Friese, 1900)
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Tese de doutorado apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências, na área
de Biologia/Genética.

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Cristina Arias

São Paulo - SP

2005

Ficha Catalográfica

Análise molecular e populacional de *Partamona mulata* (Moure In Camargo, 1980) e *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

xiii+189 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Biologia/Genética.

1. *Partamona* 2. DNAm 3. Microssatélites 4. Genética de populações
I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Biologia/Genética.

Comissão Jul gadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dra. Maria Cristina Arias
Orientadora

Dedicatória

*Aos meus queridos pais
Ângelo e Inez,
meu porto seguro...*

Agradecimentos

- À minha orientadora, profa. Cristina Arias, por seus ensinamentos, pela abertura e diálogo;
- Ao Dr. Warwick Estevam Kerr pela generosidade;
- Às pessoas que me ajudaram nas coletas das abelhas: pela acolhida, pelo apoio logístico, pelas dicas de ninhos e pelo suor no campo. Em especial: Sr. Lauro e Prof. Geraldo Moretto (SC); Profa. Vera Lucia Imperatriz-Fonseca e Museu de Zoologia (USP) (SP); Prof. Lucio Antônio O. Campos (MG); D. Deni e Odilon Rabelo (ES); Prof. Marco A. Costa, Fafá e Júlio (BA); NIEFA (Núcleo Integrado para Estudo da Fauna – UFMT), Assis, Kleber, Waldo e Rosina (MT);
- Aos Srs. João Lousano e Jaime Martina, em nome de todos os pequenos e grandes proprietários que nos permitiram entrar em suas terras para realização das coletas;
- À Dra. Silvia Regina de Menezes Pedro da FFCLRP – USP, pela identificação dos espécimes e pela agradável colaboração;
- Aos colegas e agregados que passaram no LGEA nesses quatro anos: Christian, Christiana, Dani λ, Dani Baby, Daniela, Profa. Eliana, Favísia, Geraldo, Leila, Profa. Lyria, Pamela, Dr. Steven Sheppard e Susy, por tudo que me ensinaram de Biologia Molecular, pela convivência e principalmente pelas festas de aniversário!
- Ao Sérgio Dias Hilário pela foto da capa e pela agradável convivência;
- Ao Gabriel Melo, Beatriz Coelho e Giselle Garcia, pela persuasão!
- À Bia e Gigi pela acolhida em São Paulo e sincera amizade;
- Aos tios “paulistanos” e suas famílias, que fizeram sentir-me em casa: Tio João, Tia Miriam, Tio Sócrates e Tia Lourdes;
- Ao Flaviô pela ajuda em todas as fases do processo, desde as coletas à análise estatística, e principalmente pela alegria na minha vida!
- Aos membros da banca examinadora por sua contribuição ao trabalho;
- À FAPESP pelo auxílio financeiro;
- À minha família querida: Mamãe Inez, Papai Ângelo, Sara, Ivo, Pedro Ivo, Leda, Marcelo e Celso (Salvem as Joaninhas!!);
- A Deus, por estar viva e feliz!

Índice

1. Introdução	1
1.1. Abelhas da tribo Meliponini: aspectos gerais	1
1.2. O gênero <i>Partamona</i> Schwarz (1939)	3
1.2.1. <i>Partamona mulata</i> (Moure In Camargo, 1980) E <i>P. helleri</i> (Friese, 1900)	5
1.3. Marcadores moleculares em estudos populacionais	8
1.3.1. DNA mitocondrial animal	9
1.3.2. Microssatélites	15
1.4. DNA mitocondrial e microssatélites em estudos com abelhas	20
2. Objetivos	25
3. Material e métodos	26
3.1. Material biológico	26
3.2. DNAmt	29
3.2.1. Extração de DNA	29
3.2.2. PCR+RFLP do DNAmt	30
3.2.3. Análises estatísticas	32
3.3. Microssatélites	34
3.3.1. Extração de DNA	34
3.3.2. PCR de microssatélites	35
3.3.3. Visualização dos fragmentos	36
3.3.4. Análises estatísticas	37
3.3.5. Estudo de parentesco	38
4. Resultados e discussão	39
4.1. Amplificação de microssatélites de <i>P. mulatae</i> e <i>P. helleri</i>	39
4.2. Análises populacionais	42
4.2.1. <i>Partamona mulata</i>	42
4.2.1.1. PCR+RFLP do DNAmt	42
4.2.1.2. Microssatélites	47
4.2.2. <i>Partamona helleri</i>	67
4.2.2.1. PCR+RFLP do DNAmt	67
4.2.2.2. Microssatélites	78

4.2.3. análise geral dos dados populacionais	96
4.2.3.1. <i>Partamona mulata</i>	96
4.2.3.1.1. DNAMt	96
4.2.3.1.2. Microssatélites	99
4.2.3.2. <i>Partamona helleri</i>	104
4.2.3.2.1. DNAMt	104
4.2.3.2.2. Microssatélites	108
4.2.3.3. Comparação interespecífica	113
4.2.3.3.1. DNAMt	113
4.2.3.3.2. Microssatélites	119
4.3. Relação de parentesco	121
5. Conclusões	131
6. Resumo	133
7. Abstract	134
8. Referências bibliográficas	135
Anexo 1	155
Anexo 2	183

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Operárias e entradas de ninhos de: *Partamona mulata* (A e B); *Partamona helleri* (C e D). 7
- Figura 2.** Mapa parcial da América do Sul apresentando os locais de coleta de *P. mulata* (▲) e *P. helleri* (●) em diferentes estados brasileiros. 28
- Figura 3.** Fracionamento em gel de poliacrilamida 5,6% dos fragmentos amplificados em *Partamona mulata*. 1: Mbi28. 2: Mbi32. 3: Mbi201. 4: Mbi215. 5: Mbi218. 6: Mbi278. 7: Mbi522. 8: T3-32. M: Marcador molecular 10pb ladder (*100pb). 41
- Figura 4.** Fracionamento em gel de poliacrilamida 5,6% dos fragmentos amplificados em *Partamona helleri*. 1: Mbi11. 2: Mbi28. 3: Mbi32. 4: Mbi33. 5: Mbi201. 6: Mbi215. 7: Mbi218. 8: Mbi278. 9: T4-171. M: Marcador molecular 10pb ladder (*100pb). 41
- Figura 5.** Fracionamento em gel de agarose 2% contendo os perfis de digestão de fragmentos de DNAmT de *P. mulata*. As enzimas usadas para digestão dos fragmentos estão discriminadas por raia: D: *Dra* I; C: *Cl* I; F: *Fba* I; Ha: *Hae* III; Hd: *Hind* III; Hf: *Hinf* I. Excetuando o perfil da raia 3 (Bm), todos os perfis observados foram designados como Am (Tabela 8). n: Fragmento não digerido. M: marcador de peso molecular 100 pb ladder. O tamanho das bandas marcadoras mais fortes são apresentados à direita do gel. 43
- Figura 6.** Mapa parcial da região Centro-Oeste do Brasil apresentando a distribuição dos haplótipos mitocondriais de *P. mulata*, em proporção, em seus locais de coleta. Em verde: H01; em laranja: H02. 45
- Figura 7.** Genótipos de locos microssatélite observados em *P. mulata*. Géis de poliacrilamida 5,6% contendo fragmentos amplificados de locos microssatélite. A): 1 - Mbi28; 2 - Mbi32; 3 - Mbi201; 4 - Mbi215; 5 - Mbi218. B) 1 - Mbi201. C) 1 e 2 - Mbi522. D) 1 e 2 - Mbi278. M: marcador de peso molecular 10 pb ladder, sendo a a banda mais forte a de 100 pb. 49
- Figura 8.** Fracionamento em gel de poliacrilamida 9% de fragmentos amplificados do loco microssatélite T3-32 de *P. mulata*. A, B, C e D: alelos observados na composição dos genótipos. 1 e 3: Marcador de peso molecular 10pb ladder, sendo a banda mais forte a de 100 pb. 50
- Figura 9.** Fracionamento em gel de poliacrilamida 9% de fragmentos amplificados do loco microssatélite T4-171 de *P. mulata*. A, B, C, F e G: alelos observados na composição dos genótipos. M: marcador de peso molecular 10 pb ladder, sendo a banda mais forte a de 100 pb. 50
- Figura 10.** Proporção entre alelos microssatélites encontrados em *P. mulata* nos diferentes locos estudados. Eixo X: locais de coleta (ver Tabela 1). Eixo Y: quantidade de alelos. Locos: A) Mbi28; B) Mbi32; C) Mbi201; D) Mbi215; E) Mbi218; F) Mbi278; G) Mbi522; H) T3-32; I) T4-171. 51
- Figura 11.** Fenograma obtido pelo método de Evolução Mínima a partir dos valores de distância genética obtidos de acordo com Cavalli-Sforza e Edwards (1967) relacionando as cinco populações de *P. mulata*. Poc, Cba, Cac, Sal e Cgd. 66
- Figura 12.** Fracionamento em gel de agarose 2% contendo os perfis de digestão dos fragmentos COI-IIIF/mtD18 e mtD26/mtD30 de *P. helleri*. As enzimas usadas para digestão dos fragmentos estão discriminadas por raia: D: *Dra* I; C: *Cl* I; F: *Fba* I; Ha: *Hae* III; Hf: *Hinf* I. Os perfis de digestão observados foram denominados por letras (Ah, Bh ou Ch). n: Fragmento não digerido. M: marcador de peso molecular 100 pb ladder. Os tamanhos das bandas marcadoras mais fortes estão descritos à direita do gel. 68

- Figura 13.** Fracionamento em gel de agarose 2% contendo os perfis de digestão dos fragmentos mtD19/Seq11 e 5612R/tPheF de *P. helleri*. As enzimas usadas para digestão dos fragmentos estão discriminadas por raia: D: *Dra* I; Hd: *Hind* III; Hf: *Hinf* I. Os perfis de digestão observados foram denominados por letras (Ah, Bh, Ch, Dh). **n**: Fragmento não digerido. **M**: marcador de peso molecular 100 pb *ladder*. Tamanho das bandas marcadas com asterisco em pares de bases: **M**: 600 e **M**₂: 500. 68
- Figura 14.** Mapa parcial da costa do Brasil apresentando a distribuição dos haplótipos mitocondriais de *P. helleri*, em proporção, em seus locais de coleta. Na legenda cada cor representa um dos haplótipos referidos na tabela 25. 71
- Figura 15.** Fenograma obtido pelo método de Evolução Mínima a partir de *d*, relacionando todos os haplótipos obtidos nas cinco populações de *Partamona helleri*. Haplótipos na cor **rosa**: Santa Catarina; **vermelho**: São Paulo; **azul**: Minas Gerais; **verde**: Bahia. **Cinza**: MG, ES, SP; **violeta**: MG e SC; **preto**: SP, ES. 73
- Figura 16.** Rede de inter-relações entre haplótipos de *P. helleri*. Ramos lisos indicam um sítio diferente entre haplótipos. Barras indicam número de diferenças entre os padrões de bandas observados. Haplótipos na cor **rosa**: SC; **vermelho**: SP; **azul**: MG; **verde**: BA; **cinza**: MG, ES e SP; **violeta**: MG e SC; **preto**: SP e ES. 74
- Figura 17.** Fenogramas obtidos pelo método de Evolução Mínima relacionando as cinco populações de *P. helleri*, SC, SP, MG, ES, BA. **A**: Fenograma a partir dos valores de δ . **B**: Fenograma a partir dos valores de F_{ST} . 76
- Figura 18.** Fracionamento em gel de poliacrilamida 5,6% de microssatélites amplificados de *P. helleri* correspondentes aos locos 1: **Mbi28**, 2: **Mbi201**, 3: **Mbi33**, 4: **Mbi215**. **M**: Marcador molecular 10pb *ladder* (*: 100pb). Os genótipos correspondentes às bandas observadas estão descritos acima das mesmas. 79
- Figura 19.** Fracionamento em gel de poliacrilamida 9% de microssatélites amplificados de *P. helleri*. A) **Mbi32**; B) **Mbi278**; C) **Mbi522**; D) **T4-171**. **M**: Marcador molecular 10pb *ladder*. (*: 100pb). Genótipos correspondentes às bandas observadas estão descritos acima das mesmas. (Na figura A, as bandas acima da barra são inespecíficas). 79
- Figura 20.** Proporção entre alelos microssatélites encontrados em *P. helleri* nos diferentes locos estudados. Eixo X: locais de coleta (ver Tabela 1). Eixo Y: quantidade de alelos. Locos: A) Mbi28; B) Mbi 32; C) Mbi 33; D) Mbi 201 E) Mbi 218; F) Mbi 522; G) Mbi 215; H) Mbi 278; I) T4-171. 80
- Figura 21.** Fenograma obtido pelo método de Evolução Mínima, a partir dos valores de distância genética obtidos de acordo com Cavalli-Sforza e Edwards (1967), relacionando as cinco populações de *P. helleri*: **S C, SP, MG, ES e BA**. 95
- Figura 22.** Fenograma obtido pelo método de Evolução Mínima a partir de valores de *d*, relacionando todos os haplótipos obtidos nas 10 populações de *Partamona*. **H**: haplótipos de *P. helleri*; **M**: haplótipos de *P. mulata*. 115
- Figura 23.** Mapa parcial da América do Sul apresentando parte dos componentes biogeográficos que integram a região Neotropical (Revisado por Camargo e Pedro, 2003). **NW**: noroeste da América do Sul; **SE**: Sudeste da América do Sul. **SWAm**: sudoeste da Amazônia; **Chocó-CA**: noroeste dos Andes até o Panamá; **NAm**: norte dos rios Negro e Amazonas – cráton Brasil/Guianas; **SEAm**: região ao sul dos rios Madeira/Amazonas, incluindo todo o Brasil central e nordeste, até o noroeste da Argentina; **Atl**: região atlântica, Bahia ao Paraná. Linhas pontilhadas apresentam principais eventos de vicariância postulados como possíveis responsáveis pelas disjunções observadas entre os grupos de *Partamona*, em ordem crescente do mais antigo para o mais recente segundo Camargo e Pedro (2003). **Elipses**: Traçados biogeográficos principais da América do Sul. **NW**: traçado noroeste; **SE**: traçado sudeste. 117

Figura 24. Fracionamento em gel de poliacrilamida 9% de fragmentos amplificados do loco **T4-171** de *P. helleri*, colônia Ph01. **M:** marcador de peso molecular 10 pb *ladder*. (*: 100pb). Os genótipos correspondentes às bandas observadas estão descritos acima das mesmas. 122

Figura 25. Alinhamento, obtido através do *software* MultiAlign (Corpet, 1988), entre seqüências de *Partamona mulata* e *P. helleri* localizadas entre os *primers* COI-IIF/mtD18 do DNAmT de ambas espécies. **1 a 263:** região 3' do gene COI; **264 a 268:** região espaçadora; **269 a 334:** tRNA Leu; **335 a 929:** região 5' do gene COII. Região marcada em amarelo: duplo códon de parada em *P. mulata* e incompleto de *P. helleri* Região marcada em azul: seqüência do tRNA^{Leu}. Substituições de bases estão destacadas em azul (bases C e A) e preto (bases T e G). 180

Figura 26. Alinhamento, obtido através do *software* MultiAlign (Corpet, 1988), entre seqüências de *Partamona mulata* e *Melipona bicolor* (Silvestre, 2002) localizadas entre os *primers* COI-IIF/mtD18 do DNAmT de ambas espécies. **1 a 265:** região 3' do gene COI; **265 a 269:** região espaçadora; **270 a 336:** tRNA^{Leu}; **337 a 931:** região 5' do gene COII. Região marcada em azul: seqüência do tRNA^{Leu}. Substituições de bases estão destacadas em azul. 181

Figura 27. Alinhamento, obtido através do *software* MultiAlign (Corpet, 1988), entre seqüências de *Partamona helleri* e *Melipona bicolor* (Silvestre, 2002) localizadas entre os *primers* COI-IIF/mtD18 do DNAmT de ambas espécies. **1 a 267:** região 3' do gene COI; **268 a 325:** tRNA^{Leu}; **326 a 929:** região 5' do gene COII. Região marcada em azul: seqüência do tRNA^{Leu}. Substituições de bases estão destacadas em azul. 182



Figura 28. Comparação entre os tRNAs da Leucina (L2) de A) *Melipona bicolor*; B) *Partamona mulata* e C) *P. helleri*. **I**  **C**el; **M**  **ç**ação. 183

Figura 29. Seqüências de locos microssatélites amplificados de *Partamona*. Os números indicam os tamanhos das seqüências em pares de bases. Em cinza: *primers*. Em azul e vermelho: repetições microssatélites. Em verde: estrutura semelhante à repetição de *M. bicolor*. As seqüências foram depositadas no GenBank sob os números de acesso, respectivamente: AY866506; AY866507; AY866508; AY866509; AY866510; AY866511; AY866512; AY866513; AY866514; AY866515; AY866516. 189

Lista de tabelas

Tabela 1. Locais de coleta, procedência e número de colônias amostradas de <i>P. mulata</i> e <i>P. helleri</i>	27
Tabela 2. Condições de PCR e pares de <i>primers</i> usados para amplificação do DNAm de <i>Partamona</i> para o PCR+RFLP. São mostrados: Conteúdo gênico por região; (Cf) Comprimento do fragmento em pares de bases; (Ta) Temperatura de anelamento em °C e enzimas utilizadas para digestão dos fragmentos.	32
Tabela 3. <i>Primers</i> derivados de <i>Apis mellifera</i> (A), <i>Bombus terrestris</i> (B), <i>Melipona bicolor</i> (Mbi) e <i>Scaptotrigona postica</i> (T), testados para a amplificação de locos microsatélites em <i>P. mulata</i> e <i>P. helleri</i> , respectiva repetição e referência. Cf: comprimento do fragmento.	36
Tabela 4. Locos de microsatélites amplificados nas espécies <i>P. mulata</i> e <i>P. helleri</i> Ta: Temperatura de hibridação dos <i>primers</i> (com número de ciclos entre parêntesis); Cfe: Comprimento esperado do fragmento (pares de bases) de acordo com a literatura; Cfo: comprimento do fragmento (pares de bases) observado. Pm: <i>P. mulata</i> ; Ph: <i>P. helleri</i> (-): Não houve amplificação.	40
Tabela 5. Fragmentos obtidos, em pares de bases, por meio de PCR+RFLP de regiões mitocondriais amplificadas de <i>P. mulata</i> , codificados como presença (1) ou ausência (0). Enzimas usadas: I - <i>Dra</i> I; II - <i>Hinf</i> I; III - <i>Cla</i> I; <i>Fba</i> I; <i>Hae</i> III; <i>Hind</i> III. (Frag.: Fragmentos).	44
Tabela 6. Haplótipos mitocondriais de <i>P. mulata</i> obtidos pela composição de perfis de digestão de fragmentos amplificados.	44
Tabela 7. Valores de divergência de seqüência de nucleotídeos (δ) (acima da diagonal) e estimativa de F_{ST} (abaixo da diagonal), entre pares de populações estudadas de <i>P. mulata</i> .	47
Tabela 8. Resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) em <i>Partamona mulata</i> . <i>P.</i> probabilidade de se obter um valor de ϕ maior do que o observado.	47
Tabela 9. Freqüências alélicas e taxas de heterozigose observada (<i>Ho</i>), esperada sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg (<i>He</i>) e não tendenciosa (<i>Hn</i>) por loco e por par de populações de <i>Partamona mulata</i> . n = número de alelos amostrados por loco e por população.	53
Tabela 10. Genótipos encontrados por loco analisado de <i>P. mulata</i> . N = número total de indivíduos analisados por localidade.	54
Tabela 11. Resumo da variação genética para cada população de <i>P. mulata</i> . N: número amostral médio, A: número médio de alelos por locos. PLP: porcentagem de locos polimórficos. (número entre parêntesis: erro padrão).	55
Tabela 12. Teste de probabilidade para a verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos locos e populações. G.L.: Graus de liberdade. (Erro padrão entre parêntesis).	56
Tabela 13. Teste para verificação de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg por deficiência de heterozigotos (Rousset e Raymond, 1995). (Erro padrão entre parêntesis).	57
Tabela 14. Valores de <i>P</i> para verificação de desequilíbrio de ligação entre pares de locos em cada população. Valores entre parêntesis: erros padrão.	58
Tabela 15. Valores de <i>P</i> para cada par de locos para todas populações para teste de verificação de desequilíbrio de ligação (Método de Fisher). G.L.: graus de liberdade.	58
Tabela 16. Estimativa de F_{ST} , entre pares de populações estudadas de <i>P. mulata</i> .	59

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

