

Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)

Estado da Arte da Pesquisa em Recursos Genéticos

Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)

Estado da Arte da Pesquisa em Recursos Genéticos

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2019 Os Autores
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
Editora Executiva: Prof^a Dr^a Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação: Rafael Sandrini Filho
Edição de Arte: Lorena Prestes
Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^a Dr^a Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof^a Dr^a Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof^a Dr^a Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof^a Dr^a Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof^a Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof^a Dr^a Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof^a Dr^a Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof.^a Dr.^a Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Prof.ª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof.ª Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof.ª Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
E79	Estado da arte da pesquisa em recursos genéticos [recurso eletrônico] / Organizador Benedito Rodrigues da Silva Neto. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-628-7 DOI 10.22533/at.ed.287191609 1. Genética – Pesquisa – Brasil. I. Silva Neto, Benedito Rodrigues da. CDD 575.1
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

Apresentamos o livro “Estado da Arte da Pesquisa em Recursos Genéticos”, um material rico e direcionado à todos acadêmicos e docentes da subárea da biologia denominada genética.

Sem sombra de dúvidas a genética e suas aplicações tem influenciado diversas pesquisas promissoras em todo o mundo, contribuindo de forma significativa na saúde, agricultura, economia e biotecnologia. Compreender essa ciência e suas diferentes interfaces é um dos objetivos principais do conteúdo desta obra.

A genética aliada à revolução tecnológica tem contribuído grandemente com o avanço no campo da pesquisa básica e aplicada. Da mesma forma as descobertas propiciadas pelos estudos e artigos de diversos pesquisadores possibilitaram um entendimento mais amplo desta importante área. Como sabemos a genética possui um campo vasto de aplicabilidades que podem colaborar e cooperar grandemente com os avanços científicos e entender um pouco mais da pesquisa e recursos genéticos é o enfoque desta obra.

Assim abordamos aqui assuntos relativos aos avanços e dados científicos aplicados aos recursos genéticos, oferecendo um breve panorama daquilo que tem sido feito no país. O leitor poderá se aprofundar em temas direcionados à variabilidade, diversidade genética, produtividade, variedades tradicionais, inovação, proteômica, novos protocolos, fruteiras nativas, populações, gargalo, seleção, variedade genética, produtividade, migração, criopreservação, dentre outros.

Esperamos que mais uma vez o conteúdo deste material possa somar de maneira significativa aos novos conceitos aplicados à genética, influenciando e estimulando cada vez mais a pesquisa nesta área em nosso país. Parabenizamos cada autor pela teoria bem fundamentada aliada à resultados promissores, e principalmente à Atena Editora por permitir que o conhecimento seja difundido e disponibilizado para que as novas gerações se interessem cada vez mais pelo ensino e pesquisa em genética.

Desejo à todos uma ótima leitura!
Benedito Rodrigues da Silva Neto

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
AVALIAÇÃO AGRONÔMICA DE GENÓTIPOS DE MANDIOCA EM ANGOLA	
Rosalina Esperança Da Silva Carlos	
Sandra Domingos João Afonso	
Ricardo Franco Cunha Moreira	
Elaine Costa Cerqueira-Pereira	
DOI 10.22533/at.ed.2871916091	
CAPÍTULO 2	5
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PRODUTIVO E CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS DE AMOSTRAS DE VARIEDADES DE FEIJÃO-CAUPI DO ACRE PARA DESENVOLVIMENTO DE PROGÊNIES E SELEÇÃO DE LINHAGENS	
Caroline Nascimento dos Santos	
Joões Alves da Silva Pereira	
Vanderley Borges dos Santos	
Hiuri Negreiros de Albuquerque	
Mateus Martins da Silva	
Matheus Matos do Nascimento	
Maria Rosângela da Silva Melo	
Wilson José dos Santos	
DOI 10.22533/at.ed.2871916092	
CAPÍTULO 3	11
CARACTERIZAÇÃO DE ACESSOS DE AÇUCENA (<i>Amaryllidaceae</i>) COLETADOS NO ESTADO DO CEARÁ	
Rita de Cassia Alves Pereira	
Ana Cecília Ribeiro de Castro	
Antônio Marcos Esmeraldo Bezerra	
DOI 10.22533/at.ed.2871916093	
CAPÍTULO 4	18
CONSERVAÇÃO DE TECIDOS DO APARELHO UROGENITAL DE AVES MANTIDOS EM SORO FISIOLÓGICO SOB-REFRIGERAÇÃO POR ATÉ 48 HORAS PARA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	
Tauane Catilza Lopes Fernandes	
Shaline Séfara Lopes Fernandes	
DOI 10.22533/at.ed.2871916094	
CAPÍTULO 5	26
DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Campomanesia adamantium</i> (Cambess.) O. Berg POR MEIO DE CARACTERES AGROMORFOLÓGICOS	
Diego Cerveira de Souza	
Terezinha Aparecida Teixeira	
DOI 10.22533/at.ed.2871916095	
CAPÍTULO 6	36
DIVERSIDADE GENÉTICA DO BACURIZEIRO (<i>Platonia insignis</i> MART.) UTILIZANDO O MARCADOR ISSR EM CHAPADINHA – MA	
Jonas Alves Mesquita	
Edyane Moraes dos Santos	
André Luiz Raposo Barros	
Gabriel Garcês Santos	
Claudio Adriano de Jesus Nascimento	

Luana Corrêa Silva
Phelipe Silva de Araújo
José de Ribamar Silva Barros
DOI 10.22533/at.ed.2871916096

CAPÍTULO 7 46

ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DA ABELHA TIÚBA (*Melipona fasciculata* SMITH, 1854 - HYMENOPTERA, APIDAE) BASEADA NO MARCADOR ISSR

Diego Marques Costa Silva
Gustavo Lucas Bezerra Tinoco
Jonas Alves Mesquita
Laelson Rodrigues Ferreira e Ferreira
Hugo Almeida Ferreira
Edyane Moraes dos Santos
José de Ribamar Silva Barros

DOI 10.22533/at.ed.2871916097

CAPÍTULO 8 58

MEL DE TIÚBA: AUMENTO DA PRODUÇÃO DE MEL POR MEIO DA MELIPONICULTURA MIGRATÓRIA

Gustavo Lucas Bezerra Tinoco
Diego Marques Costa Silva
Jonas Alves Mesquita
Hugo Almeida Ferreira
Laelson Rodrigues Ferreira e Ferreira
Gabriel Garcês Santos
José De Ribamar Silva Barros

DOI 10.22533/at.ed.2871916098

CAPÍTULO 9 67

USO DE CRIOPROTETORES PARA A PRESERVAÇÃO DE COLEÇÕES MICROBIANAS MANTIDAS PARA PD&I

Eunice Ventura Barbosa
Clarissa Varajão Cardoso
Helena Magalhães *In memoriam*
Evelize Folly das Chagas
Helena Carla Castro
Máira Halfen Teixeira Liberal

DOI 10.22533/at.ed.2871916099

SOBRE O ORGANIZADOR..... 79

ÍNDICE REMISSIVO 80

ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DA ABELHA TIÚBA (*Melipona fasciculata* SMITH, 1854 - HYMENOPTERA, APIDAE) BASEADA NO MARCADOR ISSR

Diego Marques Costa Silva

Universidade Estadual do Maranhão, curso de Medicina Veterinária – Maranhão, MA

Gustavo Lucas Bezerra Tinoco

Universidade Estadual do Maranhão, curso de Medicina Veterinária – Maranhão, MA

Jonas Alves Mesquita

Universidade Estadual do Maranhão, curso de Agronomia – Maranhão, MA

Laelson Rodrigues Ferreira e Ferreira

Universidade Estadual do Maranhão, curso de Medicina Veterinária – Maranhão, MA

Hugo Almeida Ferreira

Universidade Estadual do Maranhão, curso de Medicina Veterinária – Maranhão, MA

Edyane Moraes dos Santos

Universidade Federal de São Carlos, Doutoranda em Genética Evolutiva e Biologia Molecular – São Carlos, SP

José de Ribamar Silva Barros

Universidade Estadual do Maranhão, Departamento de Química e Biologia/DQB – Maranhão, MA

RESUMO: A abelha *Melipona fasciculata* Smith, popularmente conhecida como Tiúba, compreende as abelhas nativas e sem ferrão, usadas principalmente para a produção de mel, com uma grande predominância da espécie no Estado do Maranhão. O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade genética antes e após o

manejo (seleção) das abelhas, com o marcador molecular ISSR. Foram coletadas abelhas das 32 colônias localizadas no meliponário na Universidade Estadual do Maranhão, antes e depois da seleção. Realizamos 64 extrações de DNA genômico das abelhas, sendo 32 antes da seleção e mais 32 após a seleção, baseada na metodologia da técnica descrita por Doyle & Doyle (1987), foi submetido a eletroforese para confirmar a presença do DNA. O material genético ele foi submetido a PCR com seis primers do marcador molecular ISSR. A diversidade genética foi de 0,17 antes seleção e 0,24 após a seleção. Na análise de variância AMOVA, foi possível verificar que a diferenciação genética ocorreu total dentro da população, o que pode ser associado ao fluxo gênico restrito desses indivíduos e o índice de fixação (F_{st}) ele se mostrou em um valor negativo de -0.0232. O agrupamento pelo o método de UPGMA permitiu a formação de quatro grupos distintos, aparecendo somente dois indivíduos geneticamente distantes. O marcador ISSR ele se mostrou de fundamental importância para o estudo da diversidade da abelha *Melipona fasciculata* nesta população.

PALAVRAS-CHAVE: Abelhas Sem Ferrão, Seleção, Variedade genética.

STUDY OF GENETIC DIVERSITY OF BEES

TIÚBA (*Melipona fasciculata* SMITH, 1854 - HYMENOPTERA, APIDAE) BASED ON ISSR MARKER

ABSTRACT: The bee *Melipona fasciculata* Smith, popularly known as Tiúba, includes native and stingless bees, mainly used for the production of honey, with a great predominance of the species in the State of Maranhão. The objective of this work was to evaluate the genetic diversity before and after the management (selection) of the bees, with molecular marker ISSR. Bees were collected from the 32 colonies located at the meliponário at the State University of Maranhão, before and after the selection. We performed 64 extractions of genomic DNA from the bees, 32 before selection and 32 after selection, based on the technique methodology described by Doyle & Doyle (1987), was submitted to electrophoresis to confirm the presence of DNA. The genetic material was subjected to PCR with six primers of molecular marker ISSR. The genetic diversity was 0.17 before selection and 0.24 after selection. In the analysis of variance AMOVA, it was possible to verify that the genetic differentiation occurred totally within the population, which can be associated to the restricted gene flow of these individuals and the fixation index (F_{st}) it was shown in a negative value of -0.0232. Grouping by the UPGMA method allowed the formation of four distinct groups, appearing only two genetically distant individuals. The ISSR marker was shown to be of fundamental importance for the study of the diversity of the bee *Melipona fasciculata* in this population.

KEYWORDS: Bees without stingers; selection; genetic variety.

1 | INTRODUÇÃO

Os meliponíneos, popularmente conhecidos como abelhas sem ferrão, assumem um papel importante nos ecossistemas por meio da polinização (MORGADO et al., 2002). Estão agrupados na Classe Insecta, Ordem Hymenoptera, Superfamília Apoidea, Família Apidae, Subfamília Meliponinae, existindo duas tribos: Meliponini e Trigonini. Os meliponíneos são abelhas sociais que vivem em áreas tropicais e subtropicais de todo o mundo (CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 2006).

Kerr e Vencovsky (1982), descreveram sobre a quantidade mínima de ninhos de uma mesma espécie para evitar o endocruzamento e conseqüentemente perda da variabilidade genética, devido a produção de machos diplóides. A queda cada vez maior no número de alelos heterozigotos em função da endogamia, é um dos fatores que ocorrem, e eles são influenciados pelo fluxo gênico restrito, uma vez que populações distintas são interrompidas em cruzar genes entre si. Por conseqüência, isso aumenta a taxa de fixação de genes, amplia o nível de estruturação genético-populacional e torna alguns alelos raros por ocasião da deriva genética (SILVA et al., 2014).

Os marcadores moleculares vêm sendo empregados como uma importante ferramenta na conservação de espécies selvagens e/ou de interesse econômico por fornecerem dados importantes aos estudos populacionais, como: estimativas referentes

ao grau de variabilidade genética, grau de endogamia, diferenças entre populações, fluxo gênico entre populações, determinação do tamanho efetivo da população, dentre outros (SILVA et al., 2014).

Apesar da existência de poucos estudos genéticos relacionados às abelhas sem ferrão, tem sido recentemente demonstrado que os marcadores ISSR podem ser úteis na análise de populações de abelhas naturais, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias de manejo desses importantes recursos genéticos (NASCIMENTO et al., 2010; TAVARES et al., 2013).

Os marcadores moleculares, fenótipos moleculares de polimorfismos específicos na sequência do DNA, apresentam-se em abundância ao longo do genoma dos seres eucariontes, sendo intensamente utilizados em estudos genéticos populacionais. Dentre estes estudos, destaca-se principalmente a caracterização de níveis e organização de variabilidade genética dentro e entre espécies afins, subpopulações e grupos de reprodução e progênies. Assim, atuam na amplificação de uma sequência de DNA delimitada por duas regiões microssatélites invertidas (BENZAQUEM et al., 2009).

A necessidade de um programa afim de conservar e obter produtividade é crucial para os meliponicultores, baseado principalmente na sua biologia comportamental e genética, gerando maior expectativa econômica e, conseqüentemente, preservando a biodiversidade e os recursos naturais necessários ao desenvolvimento (SILVA et al., 2014).

A presença da *Melipona fasciculata* está distribuída principalmente nos Estados do Pará e Maranhão (nordeste da Região Amazônica), encontradas principalmente nos mangues, devido a presença de árvores ocas. No Maranhão é conhecida popularmente como tiúba, é uma abelha com hábitos bastante higiênicos, caracterizando um mel de excelente qualidade e com um alto poder de produção (VENTURIERI et al, 2003).

O crescente interesse econômico pelos agricultores é devido a produção de pólen, geoprópolis, mas principalmente para obter o mel, que tem alcançado um alto valor aquisitivo no mercado. Dentro das instituições de ensino e pesquisa, essa tarefa também tem sido estimulada, com o objetivo de elucidar dúvidas quanto a genética, biologia, manejo, polinização e evolução das diferentes espécies, com a finalidade de aumentar o poder de produção, alinhado a conservação desses animais (BRITO, 2013).

Dessa forma, este trabalho teve como principal proposta o estudo da *Melipona fasciculata* através da análise da diversidade genética, com estudo do polimorfismo através do marcador ISSR que foi utilizado para caracterizar a estrutura populacional de colônias de um meliponário, localizado na Universidade Estadual do Maranhão, afim de verificar a estruturação genética antes e após técnicas de manejo, utilizando a abordagem PCR-ISSR.

2 | METODOLOGIA

2.1 Local das coletas

O meliponário está situado no Norte do Estado do Maranhão (Figura 1), limita-se com os municípios de Paço do Lumiar, São José de Ribamar, Raposa e com o oceano Atlântico ($44W 12' 45''$, $02S 35' 33''$). A cidade de São Luís está localizada numa área de encontro de duas floras: a flora da Amazônia e a flora nordestina.

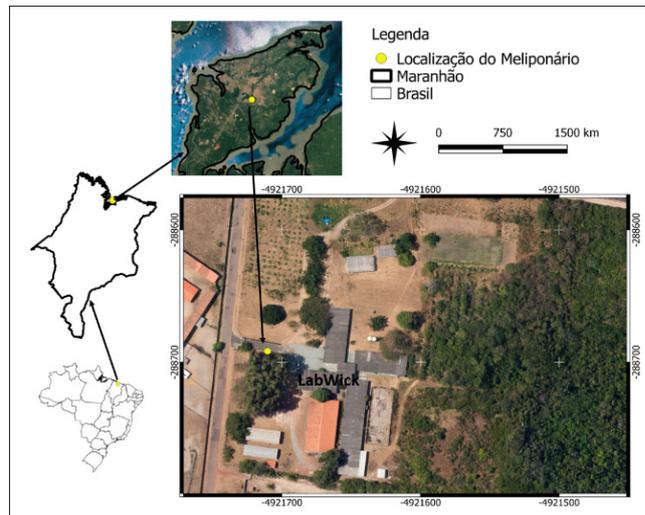


Figura 1. Mapa da Ilha de São Luís, com o ponto de localização do meliponário

2.2 Manejo das abelhas

As coletas foram realizadas no meliponário localizado na Universidade Estadual do Maranhão, que passaram por processo de seleção e manejo. Foi realizado uma coleta amostras de operárias de 32 colônias antes da seleção e outra após a seleção. Realizamos a primeira coleta antes da seleção das rainhas, no mês de fevereiro de 2017. Em seguida, no mês de março, fizemos a seleção das abelhas rainhas baseadas no método de melhoramento proposto por Vencovsky e Kerr (1982), que usa o parâmetro de tempo de coleta de operárias. Esperamos até outubro para poder realizar a segunda coleta (pós-seleção), totalizando um período de 7 meses da seleção até a segunda coleta.

2.3 Extração do DNA e amplificação via PCR

A extração de DNA genômico das abelhas foi baseada na metodologia da técnica descrita por Doyle & Doyle (1987), que utiliza CTAB, onde o DNA genômico foi obtido a partir do mesossoma das abelhas coletadas, eliminando-se as asas, cabeça e metassoma, utilizando-se 1 (um) tórax de *M. fasciculata*. Para a extração de DNA e análise molecular foi utilizada uma (01) abelha por colmeia, sendo no total 64 extrações (total de abelhas do antes e pós seleção).

Após todo o procedimento de extração submetemos o DNA a eletroforese

em gel de agarose 1% para a visualização do material genético e confirmação de sua extração, análise de sua integridade e estimativa de sua concentração. Após o término da corrida em eletroforese (duração de 30 minutos), visualizamos em aparelho transiluminador de UV que permitiu a visualização do DNA corado com brometo de etídio, sob as condições de 80 V e 90 mA.

Após a extração de DNA e corrida em eletroforese, o material genético foi submetido à técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase - “*Polymerase Chain Reaction*”) segundo a metodologia de Mullis e Faloona (1987); Saiki *et al.* (1985) para a amplificação da região específica a ser investigada nesse projeto. A reação de PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima *Taq* polimerase, isolada da bactéria *Thermus aquaticus*, que é capaz de sintetizar polinucleotídeos em elevadas temperaturas.

Seis primers de ISSR e as condições de amplificação da PCR foram previamente selecionados do trabalho de Dias (2008), mas não foi obtido sucesso na amplificação com as mesmas temperaturas de anelamento em nosso trabalho com *Melipona fasciculata*, sendo assim necessário padronizar para cada um dos primers a temperatura de anelamento. Em um tubo de eppendorf estéril Axygen Scientific foram realizados para cada primer, quantidades diferentes de alguns dos constituintes do mix da PCR, em um volume total de 20 μ l para cada eppendorf (Tabela 2).

O programa de amplificação consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 95° por 10 minutos, seguido de 25 ciclos de amplificação a 95° por 1 minuto, por 45 segundos a temperatura de pareamento do primer (que variou de acordo com o primer utilizado) e 72° por 2 minutos na extensão e para finalizar, mais 12 ciclos de 95° por um minuto na desnaturação, 45 segundos no anelamento (que variou novamente dependendo do primer), 2 minutos de 72° e finalizou o processo com 4° ao infinito para conservar a reação após o termino. Os primers utilizados foram os UBC 807, UBC 808, UBC 809, UBC 810, UBC 811 e UBC 826 e suas temperaturas de anelamento foram respectivamente 51-55°C, 53-50°C, 53-54°C, 53-50°C, 50-54°C e 55-58°C.

Componentes da reação de PCR	Primer 807	Primer 808	Primer 809	Primer 810	Primer 811	Primer 826
Tampão	2,0 μ l					
dNTPs	1,5 μ l					
DNA	1,3 μ l	1,2 μ l	1,3 μ l	1,3 μ l	1,3 μ l	1,4 μ l
Primers	3,0 μ l	3,5 μ l	3,5 μ l	3,0 μ l	3,5 μ l	3,5 μ l
Taq	0,2 μ l					
MgCl ₂	1,7 μ l	1,2 μ l	1,7 μ l	1,7 μ l	1,2 μ l	1,3 μ l
Água	10,4 μ l					

Tabela 2. Constituintes e volumes utilizados na preparação da PCR para amplificação com cada primer do marcador ISSR.

Os produtos das ampliações foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% por 50 – 100 minutos e corados com brometo de etídio. Em seguida, visualizados em transiluminador UV e fotodocumentados caso acontecesse à amplificação (Figura 2).

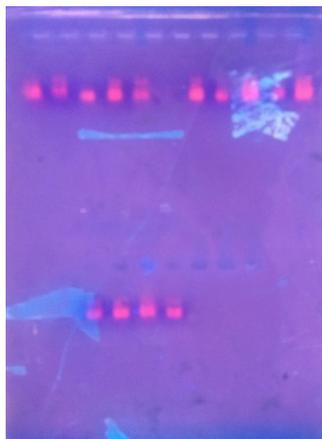


Figura 2. Eletroforese após PCR-ISSR para visualização do material genético

2.4 Análises genéticas dos marcadores ISSR

As análises foram realizadas diretamente no gel de agarose da amplificação da PCR. Os produtos amplificados foram designados como um único caráter, no qual a presença foi representada por “1” e a ausência por “0”. Os marcadores ISSR foram então convertidos em uma matriz binominal (0/1) no excel. A relação genética entre os genótipos foi estimada utilizando-se o coeficiente de distância de Jacard, resultando em uma matriz. O dendrograma foi obtido pelo método da ligação média não ponderada (UPGMA) para ilustrar as relações entre as caixas coletadas, com auxílio do software PAST 1.34 (Hammer et al., 2001). A similaridade genética será estimada entre as duas populações e calculada a partir do coeficiente de similaridade de Jaccard.

O estudo de estruturação genética e do nível de variabilidade das populações (heterozigosidade - H_e) e diferenciação genética entre as populações (F_{ST}) (WEIR e COCKERHAM, 1984), foi analisado utilizando o programa Arlequin 3.11 (Excoffier et al, 2005). As populações foram agrupadas por subpopulações e as estatísticas de F de Wright (WRIGHT, 1978) foram utilizadas para analisar a estrutura genética das populações através de desvios entre as frequências alélicas das subpopulações (F_{st}). Uma outra medida de diversidade usada é o índice de Shannon, analisado pelo programa FAM - Fingerprint Analysis with Missing Data 1.31 (SCHLÜTER, 2013). A análise de variância molecular (AMOVA) foi também utilizada para revelar a distribuição da diversidade genética dentro e entre as populações com o auxílio do programa Arlequin e também pelo software FAM.

Todas as etapas de análises da diversidade genética da abelha tíuba foram realizadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular- LabWick, na Universidade Estadual do Maranhão.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PCR-ISSR

Por meio do programa Arlequin a H_e antes da seleção foi de 0,17 e pós seleção de (0,24) (Tabela 3), estes valores são bem parecidos com os trabalhos de Nascimento (2018), que encontrou o valor de 0,18 para a espécie *Melipona quadrifascilata* e Nogueira (2009) de 0,19 em *Melipona fasciculata*, os dois com o marcador molecular ISSR. No trabalho de Silva (2007) também é possível observar um baixo valor de H_e , que foi de 0.086, mas utilizando marcador molecular microssatélites para a espécie *Melipona quadrisfasciata*, o que torna um valor realmente muito baixo.

Locus	Nº de indivíduos	He antes	He depois
1	32	0.12097	0.17540
2	32	0.17540	0.22581
3	32	0.22581	0.27218
4	32	0.17540	0.27218
5	32	0.22581	0.27218
6	32	0.12097	0.22581
Média	32.000	0.17406	0.24059
s.d.	-	0.04690	0.03919

Tabela 5. Valores de H_e antes e após seleção.

As hipóteses para explicar os baixos níveis de variabilidade genética na ordem Hymenoptera podem ser explicados pela a reprodução (sistema haplodiploide), a sociabilidade e características ecológicas quem envolvem o ambiente (NASCIMENTO, 2008). E apesar do valor obtido neste trabalho corroborar com outros estudos, o ISSR é um marcador universal, e para que tenhamos um valor sempre mais próximo do real, é necessário aumentar o número de loci.

Quanto ao sistema de reprodução das abelhas, as fêmeas são geradas a partir de ovos fecundados, o que caracteriza que elas são diploides, mas os machos, eles são originados de ovos não fecundados, que no caso são os haploides. Segundo Kerr (1976), a haplodiploidia gera poucos locos polimórficos, o que explica que esse é um dos motivos pela a diminuição das populações, pelo o aumento da fixação de alelos (NASCIMENTO, 2008; NOGUEIRA, 2009.) No local de estudo deste trabalho, o meliponário é formado somente por 32 colmeias, o que vai de acordo com a literatura sobre a perda de alelos por machos haploides, principalmente em locais com menos de 44 ninhos, já que segundo Kerr e Vencovsky (1982), esse é o número mínimo para que seja mantido pelo menos seis alelos diferentes para o loco CSD, para que não ocorra a probabilidade de ter homozigose neste loco (GONÇALVES, 2010).

A ausência do fluxo gênico é outro fator que pode influenciar no aumento da endogamia, levando aos baixos resultados de diversidade genética encontrados. Silva *et al* (2014), cita que devido impossibilidade do deslocamento das rainhas que estão em intensa postura, faz com que o processo de dispersão das abelhas seja de forma bem mais lenta, isso associado a barreira geográficas e ambientais da região, como relevos e disponibilidade de uma florada para atender as necessidades, fazendo com que a população fique confinada e tenha efeitos negativos dentro dela (NASCIMENTO, 2008). No meliponário estudado, ele fica localizado dentro da área urbana de São Luís, havendo apenas um pequeno meliponário próximo, o que talvez ocorra uma troca de alelos entre as duas populações. O fluxo gênico dentro do próprio meliponário é existente, mas pelo os níveis baixos de H_e , é possível que sejam populações adaptadas a endogamia.

Comparando os níveis de H_e antes e após a seleção, é possível verificar que houve um pequeno aumento na diversidade genética, de 0,07 aproximadamente. Como o processo de seleção realizado, foi que inserimos rainhas de colmeias mais produtivas nas menos produtivas, estes indivíduos levaram consigo alelos que eram diferentes da colmeia originalmente, o que levou ao aumento da diversidade genética do meliponário que está sendo estudado. Uma hipótese que pode ser levantada, é que houve uma troca de alelos entre as rainhas do meliponário estudado com um outro, localizado dentro da Fazenda Escola da universidade Estadual do Maranhão, que foi adquirida de um município diferente. No trabalho de Gonçalves (2010), ele encontrou um valor de diversidade genética maior do que o esperado, e justificou o fato, por ter sido inserido ninhos no Campus proveniente de outras localidades, havendo assim troca de alelos entre os indivíduos.

Segundo a AMOVA, observou-se que a variação total se deve a diversidade genética existente dentro de cada população (Tabela 5), o que indica que não existe uma estrutura genética, as populações são similares entre elas, o que já era de se esperar pois neste trabalho, a população é a mesma, o que muda é seleção feita dentro dela, caracterizando uma população antes e outra após seleção. E como já visto nos níveis de H_e , a diferença entre os dois momentos foi mínimo, então não houve uma mudança significativa que o índice de AMOVA pudesse detectar uma diferença entre as “populações”.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre as populações	0.188	-0.01358	-2.23166
Dentro das populações	38.562	0.62198	102.23166
Total	38.750	0.60840	

Tabela 5. Análise de variância Molecular (AMOVA) considerando-se dois níveis hierárquicos

Os trabalhos de Nascimento (2008) e Nogueira (2009), mostram também que a maior parte da diversidade está dentro das populações, 45,66% e 32,60% entre; 79,08 e 27,20%. Vale (2013), também encontrou um nível maior entre populações dentro do grupo, que foi de 42,36 contra 18,23 somente entre os grupos pesquisados. Estes trabalhos citados também sugerem que esses valores foram encontrados devido a não distribuição dessas espécies no espaço geográfica, relacionado com o fluxo gênico restrito ou ausente dos indivíduos destas localidades, o que pode levar a um alto índice de endogamia.

O Fst é utilizado para estimar a diferença das populações a partir da variância da frequência de alelos, quanto mais próximo de 0 (zero), significa que a população não é geneticamente diferenciada, e quanto mais acima desse valor, mais frequências alélicas diferentes são encontradas (ZOLET *et al*, 2013). No presente trabalho, encontramos um valor negativo de $-0,0232$ (Tabela 5). Na literatura não encontrei nenhum valor referente negativo de Fst para abelhas, Melíponas e nem *Apis mellifera*.

Para explicar o fato de valor ter sido negativo em nosso estudo, levantamos a hipótese de que como não são duas populações propriamente ditas, mas sim de dois momentos (antes e depois da seleção) dentro da mesma população, esse valor foi negativo porque a comparação foi com os mesmos indivíduos e com uma pequena variação somente.

No dendograma formado a partir do programa PAST, foi possível fazer o agrupamento dos indivíduos de acordo com a similaridade genética, onde variou de 0,42 a 0,96 (Figura 4). As análises de agrupamento, considerando-se antes e após seleção, revelaram formação de quatro grupos, do qual é possível verificar que geneticamente estão todos bem próximos, com um coeficiente de correlação cofenética de 0,86, o que mostra que há um bom ajuste da demonstração gráfica e a sua matriz original. As formações dos grupos tiveram dentro de cada um, indivíduos dos dois momentos mais semelhantes que alguns outros, por exemplo, o indivíduo 20 antes da seleção e os indivíduos 6, 11 e 24 depois da seleção, mais próximos geneticamente do indivíduo 8 antes da seleção. Somente duas colmeias apareceram um pouco mais distantes dos grupos formados, sendo um de cada momento.

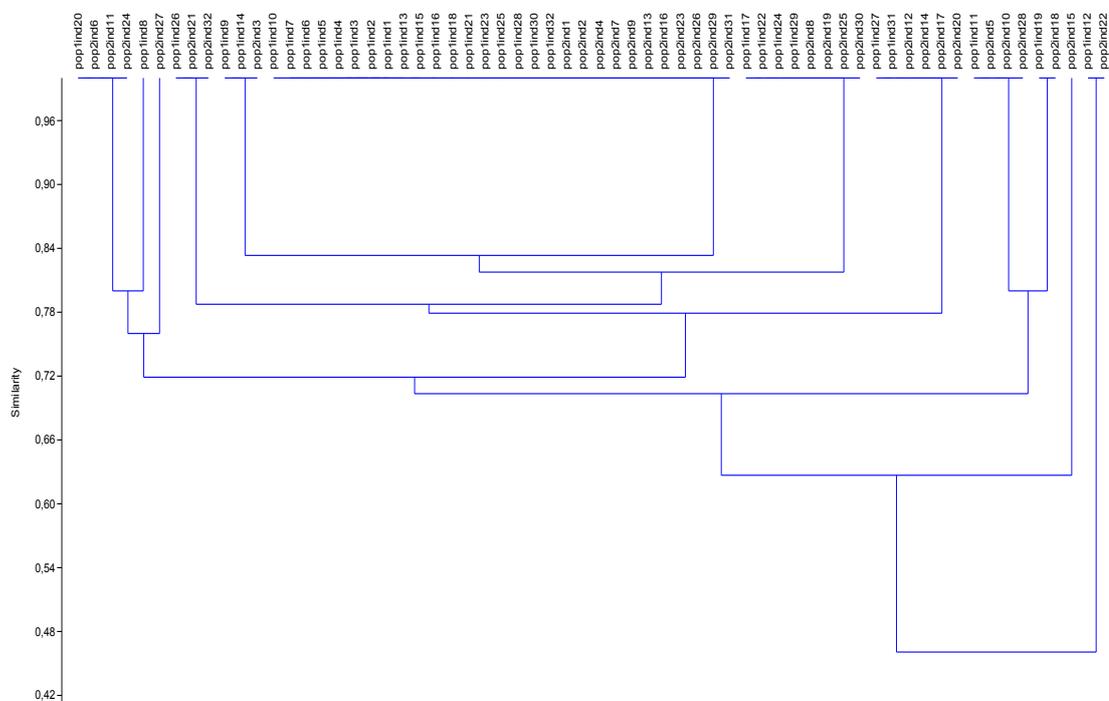


Figura 4. Dendograma de similaridade genética, obtida pelo o método UPGMA

4 | CONCLUSÃO

O estudo da diversidade genética de *Melipona fasciculata* com o marcador molecular ISSR possibilitou chegar às seguintes conclusões:

- Foi encontrado um baixo nível de variabilidade genética antes e após a seleção, o que condiz com a literatura quando se trata de indivíduos que tem sistema haplodiploide;
- Após seleção foi possível verificar um aumento nos níveis de heterozigidade, mostrando que é ela uma ferramenta que pode ser utilizada para aumento de produção;
- Na população estudada há indícios de fluxo gênico restrito, e com os dados foi possível observar que a população quase não tinha diferença genética;
- A migratório se torna bastante viável como uma forma de manejo e conservação das colônias do meliponário.

REFERÊNCIAS

ANDREATTI FILHO, Raphael Lucio et al. Comparação de métodos para extração de DNA na reação em cadeia da polimerase para detecção de Salmonella enterica sorovar Enteritidis em produtos avícolas. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 115-119, 2011.

BENZAQUEM, Denise C.; FREITAS, Danival V.; VERAS, Ydrielly T.; BARROS, Waldir G.; SAMPAIO, Paulo de T. Seleção de Primers ISSR para análise genético populacional em espécies do gênero Aniba. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 61, 2009. Manaus - Amazonas. **Anais eletrônicos...**São Paulo: SBPC, 2009. Disponível em: Acesso em:

05 de abril de 2017.

FAQUINELLO, P.; BRITO, B. B. P.; CARVALHO, C. A. L.; LEITE, C. P.; ALVES, R. M. O. Correlação entre parâmetros biométricos e produtivos em colônias de *Melipona quadrifasciata* anthidioides Lepeletier (Hymenoptera: Apidae). **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 312–317, 2013.

CORTOPASSI-LAURINO, Marilda et al. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 275 - 292, 2006.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, p. 7 – 50. 2005.

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

GONÇALVES, Paulo Henrique Pereira. **Análise da variabilidade genética de uma pequena população de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de análise do DNA mitocondrial, microssatélites e morfometria geométrica das asas**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2010.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Eletrônica** v.4, p.1-9, 2001.

MORGADO, Leila. N.; CARVALHO, César. F.; SOUZA, Brígida.; SANTANA Márcia. P. Fauna de Abelhas (HYMENOPTERA: APOIDEA) nas Flores de Girassol *Helianthus annuus* L. em Lavras – MG. **Ciência e agrotecnologia**, n.26, p.1167 - 1177, 2002.

MULLIS, K. & FALOONA, F., Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol**, p. 335-350, 1987.

NASCIMENTO MA; BATALHA-FILHO H; WALDSCHMIDT AM; TAVARES MG; CAMPOS LAO; SALOMÃO TMF. Variation and genetic structure of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier. **Genetic and Molecular Biology**, p. 394–397, 2010.

NASCIMENTO, M. A. **Variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) no estado de Minas Gerais com marcadores ISSR**. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2008.

NOGUEIRA, J. **Variabilidade genética de *Melipona capixaba* MOURE & CAMARGO, 1994 (Hymenoptera: Apidae), espécie ameaçada de extinção: subsídios para sua conservação**. Dissertação de mestrado apresentada a Universidade Federal de Viçosa, 2009.

SCHLÜTER, P. M. **FAMD - Fingerprint Analysis with Missing Data 1.31 - Manual**. Institute of Systematic Botany. University of Zurich, p. 57, 2013.

SAIKI, R. K; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A. & ERNHEIN, N., Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, p. 1350-1354, 1985.

SILVA, Geice Ribeiro da et al. **Aspectos bioecológicos e genético-comportamentais envolvidos na conservação da abelha Jandaíra, *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini), e o uso de ferramentas moleculares nos estudos de diversidade**. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 299-308, 2014.

SILVA, R. B. **Variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) no estado de Minas Gerais-Brasil**. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, 2007.

TAVARES MG; ALMEIDA BS; PASSAMANI PZ; PAIVA SR; RESENDE HC; CAMPOS AO; ALVES RMO; WALDSCHMIDT AM. Genetic variability and population structure in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae) from Bahia, Brazil, based on molecular markers. **Apidologie** 44: 720–728. 2013.

VALE, Kaline Aguiar Gonzalez. **Diversidade Genética e Estrutura de Populações da Abelha *Scaptotrigona aff. depilis* no Piauí**. Dissertação de Mestrado, Teresina, Piauí, 2013.

VENTURIERI, G. C.; RAIOL, V. F. O.; PEREIRA, C. A. B., Avaliação da criação racional de *Melipona fasciculata* (Apidae: Meliponina), entre os agricultores familiares de Bragança, PA, Brasil. **Biota Neotropica**, V. 3, n. 2, 7 p., 2003.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, 38: 1358–1370. 1984.

WRIGHT, S. Variability within and among natural populations. Vol. 4. **The University of Chicago Press**, Chicago. 1978.

ZOLET, A. C. T.; SEGATTO, A. L. A.; TURCHETTO, A.; SILVA, C. P.; FREITA, L. B. **Guia prático para estudos filogeográficos**, ed. Sociedade Brasileira de Genética 2013.

SOBRE O ORGANIZADOR

BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (2005), com especialização na modalidade médica em Análises Clínicas e Microbiologia (Universidade Candido Mendes - RJ). Em 2006 se especializou em Educação no Instituto Araguaia de Pós graduação Pesquisa e Extensão. Obteve seu Mestrado em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto de Ciências Biológicas (2009) e o Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (2013) da Universidade Federal de Goiás. Pós-Doutorado em Genética Molecular com concentração em Proteômica e Bioinformática (2014). O segundo Pós doutoramento foi realizado pelo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás (2015), trabalhando com o projeto Análise Global da Genômica Funcional do Fungo *Trichoderma Harzianum* e período de aperfeiçoamento no Institute of Transfusion Medicine at the Hospital Universitätsklinikum Essen, Germany. Seu terceiro Pós-Doutorado foi concluído em 2018 na linha de bioinformática aplicada à descoberta de novos agentes antifúngicos para fungos patogênicos de interesse médico.

Palestrante internacional com experiência nas áreas de Genética e Biologia Molecular aplicada à Microbiologia, atuando principalmente com os seguintes temas: Micologia Médica, Biotecnologia, Bioinformática Estrutural e Funcional, Proteômica, Bioquímica, interação Patógeno-Hospedeiro.

Sócio fundador da Sociedade Brasileira de Ciências aplicadas à Saúde (SBCSaúde) onde exerce o cargo de Diretor Executivo, e idealizador do projeto “Congresso Nacional Multidisciplinar da Saúde” (CoNMSaúde) realizado anualmente, desde 2016, no centro-oeste do país.

Atua como Pesquisador consultor da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Goiás - FAPEG. Atuou como Professor Doutor de Tutoria e Habilidades Profissionais da Faculdade de Medicina Alfredo Nasser (FAMED-UNIFAN); Microbiologia, Biotecnologia, Fisiologia Humana, Biologia Celular, Biologia Molecular, Micologia e Bacteriologia nos cursos de Biomedicina, Fisioterapia e Enfermagem na Sociedade Goiana de Educação e Cultura (Faculdade Padrão). Professor substituto de Microbiologia/Micologia junto ao Departamento de Microbiologia, Parasitologia, Imunologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás. Coordenador do curso de Especialização em Medicina Genômica e Coordenador do curso de Biotecnologia e Inovações em Saúde no Instituto Nacional de Cursos. Atualmente o autor tem se dedicado à medicina tropical desenvolvendo estudos na área da micologia médica com publicações relevantes em periódicos nacionais e internacionais. Contato: dr.neto@ufg.br ou neto@doctor.com

ÍNDICE REMISSIVO

A

Abelha sem ferrão 58
Amarílis 11, 13, 15, 16

B

Bulbos 11, 13, 14, 15, 16

C

Cerrado 17, 26, 27, 28, 34, 35, 37, 38, 39, 45, 58, 59
Criopreservação 68, 69, 70, 73, 74, 77

D

Descritores 3, 11, 15, 33
Diversidade Genética 1, 2, 6, 9, 16, 26, 28, 29, 34, 36, 38, 40, 41, 43, 44, 46, 48, 51, 53, 55, 57

F

Fruteiras Nativas 26, 35

G

Gabirobeira 26, 27
Gargalo 36, 40, 42, 43
Glicerol 21, 67, 68, 73, 74, 75, 76, 78

I

Inovação 18, 67, 71

M

Manihot Esculenta 1, 4
Migração 18, 23, 58, 62, 63, 64

P

Populações 12, 14, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 47, 48, 51, 52, 53, 54, 57, 59
Produtividade 2, 5, 26, 27, 29, 32, 33, 48, 58, 60, 63, 71
Proteômica 18, 79
Protocolo 18, 21, 22, 36, 39, 67, 74

R

Reserva 36, 38, 41, 42, 43

S

Seleção 5, 7, 9, 28, 32, 33, 44, 46, 49, 52, 53, 54, 55

Skim Milk 67, 68, 73, 74, 75, 76

V

Variabilidade 1, 4, 5, 7, 9, 12, 26, 29, 30, 32, 33, 35, 38, 47, 48, 51, 52, 55, 56

Variedade Genética 46

Variedades Tradicionais 5, 7

Vigna Unguiculata 5, 6, 10

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-628-7

