

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA**  
**MOLECULAR**

**Juliana Afonso**

**“Origem das linhagens mitocondriais nas abelhas africanizadas (*Apis mellifera*  
L.) do Brasil”**

**Dissertação de Mestrado**

**Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama**

**São Carlos, março de 2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA**  
**MOLECULAR**

**Juliana Afonso**

**“Origem das linhagens mitocondriais nas abelhas africanizadas (*Apis mellifera*  
*L.*) do Brasil”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular. Área de concentração: Genética e Evolução.

**Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama**

**São Carlos, março de 2012**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

A257oL

Afonso, Juliana.

Origem das linhagens mitocondriais nas abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) do Brasil / Juliana Afonso. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

78 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Genética e evolução. 2. *Apis mellifera*. 3. Abelha-africanizada. 4. DNA mitocondrial. I. Título.

CDD: 575 (20ª)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

“Origem das linhagens mitocondriais nas abelhas  
africanizadas (*Apis mellifera* L.) do Brasil”

Dissertação de Mestrado de  
JULIANA AFONSO

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

.....  
Marco Antonio Del Lama

Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito

.....  
R. A. Brito

Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares

.....  
Ademilson E. E. Soares

Profa. Dra. Thaís Collet

.....  
Thaís Collet

Dedico essa dissertação a meus pais que me aguentaram dizer por 12 anos:

“Eu vou ser geneticista” .

## **AGRADECIMENTOS**

Obrigada primeiramente a meus pais, Edson Arnaldo Afonso e Inês Aparecida Rosalem Afonso, que SEMPRE me apoiaram na escolha da profissão, pós-graduação, mudança de cidade e, principalmente, nos momentos onde parecia que nada ia dar certo. Obrigado pelos conselhos, pelas palavras de conforto, carinho, por serem tão corujas quando eu volto para a casa (comida de mãe não tem preço) e por não se incomodarem quando preciso ligar o som alto para me concentrar nos estudos (mesmo não sendo o estilo musical preferido de vocês).

Obrigado a meus avós, tios, tias e primos que sempre me animaram nas reuniões, sempre me apoiaram em tudo o que eu fiz e sempre fizeram “cara de interessado” quando eu resolvia explicar meu projeto. Vocês são demais.

Obrigado principalmente ao meu orientador já há quatro anos, Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama, por me proporcionar a oportunidade única de trabalhar com algo do qual eu gosto tanto, pela convivência harmoniosa dentro do laboratório, pela paciência e destreza com que me explica infinitos conceitos, pela confiança depositada em meu trabalho, enfim, por tudo.

Obrigado a todos os amigos que são ou já foram do LGEH, principalmente à Thaís que me ajudou muito, me ensinando desde como segurar uma pipetadora corretamente até como compilar os resultados no final de minha iniciação científica e também pelos dados cedidos para esse trabalho. Obrigado à Naná, Caito, Luana, Juliano, Tony, Diego, Gabi e Marcella (Samy) tanto pelos momentos de discussão de teorias no laboratório quanto pelos momentos de descontração em botecos ou festas “open de amendoim”. Agradeço também à Kátia pelas inúmeras vezes que me salvou com algum programa, técnica ou resultado complicado; à Bel, que sempre está disposta a ajudar em tudo que for preciso e que está sempre ali com seu sorriso, ainda mais agora com aquele brilho de quem está esperando algo realmente bom. Também à Cíntia, Keize, Otávio e Camila que me ajudaram muito nos estudos antes da prova de seleção para o mestrado. Aos amigos dos laboratórios vizinhos, principalmente Manu, Rê e Emeline, pelos momentos de risadas no corredor, almoços divertidos e ajudas acadêmicas.

Obrigado a todos os meus amigos de longa data, principalmente à Nathália, Ana, Alzira, Flaviane, Samuca, Sandro, Fu, Rodrigo, Mara, Gustavo, Paulo, João, Patrícia e Denilton que sempre compreenderam que eu não podia estar com eles em alguns momentos por causa de disciplinas sendo cursadas, mesmo quando esses eram em meses de férias escolares normais. Obrigado por compreenderem que minhas “férias escolares” não são normais e que eu gosto disso. Eu adoro vocês.

Obrigado aos meus amigos biólogos, mas não necessariamente geneticistas: Angela, Tati, Vanessa, Mary, Fer, Maicon, Elton, Paulo, Cynthia, Vitinho, Juliana, Mariana, Antonio, Nath, Will e Débora não só pelos momentos em que vocês eram os únicos fora do laboratório realmente dispostos a ouvir os devaneios momentâneos sobre o meu trabalho, mas principalmente pelos momentos de descontração ao vivo ou pela internet. As nossas conversas foram muito importantes para mim nesse período.

Obrigado às meninas que dividem o apartamento comigo, me aguentam tardes e noites espalhando todos os meus artigos e anotações pela sala, não reclamam quando leio animadamente em voz alta alguma coisa nova que eu descubro fuçando neles e são minhas amigas de verdade em conversas “profundamente filosóficas” nas madrugadas e nas besteiras que vão parar escritas nas paredes da sala: Mayara, Bia, Cuca e Joyce, que já nos abandonou para seguir um sonho.

Obrigado ao Dr. Walter Steve Sheppard (Washington State University, USA), ao Prof. Ademilson Espencer Egea Soares (FMRP-USP) e aos apicultores que cederam amostras para a realização deste e de outros trabalhos do LGEH.

Obrigado a todos os professores que me ensinaram algo relacionado à genética até aqui. Dentre esses, gostaria de dar maior ênfase à Profa. Cristiane que foi a primeira a me mostrar como a genética podia ser legal.

Na primeira aula de que tenho lembrança no curso de Ciências Biológicas nossa professora nos perguntou: “Porque vocês escolheram esse curso?”. Lembro-me de ter respondido: “Para poder fazer pós-graduação em genética e evolução”. Obrigado a todos os que me ajudaram direta ou indiretamente desse dia em diante.

Obrigado também ao CNPq pelo apoio financeiro dado a este projeto.

A frase mais empolgante de ouvir na ciência, a que prenuncia novas descobertas, não é "Eureka!", mas sim "Isto é estranho..."

**Issac Asimov**

**Diz a lenda:**

James Dewey Watson e Francis Henry Compton Crick desvendaram a estrutura da molécula de DNA no dia 28 de fevereiro de 1953 pela manhã. Na mesma tarde, os dois foram comemorar no pub Eagle, em Cambridge. Crick entrou no pub dizendo a todos que ele e seu colega tinham descoberto o segredo da vida.

**E o pior:** Não acreditaram nele.

## RESUMO

O processo de africanização de *Apis mellifera* fez surgir diversas questões acerca da constituição genética da população resultante. Esse trabalho teve por objetivo identificar o número, a frequência e a distribuição dos diferentes haplótipos mitocondriais, bem como sua possível origem nas colônias africanizadas amostradas em diferentes regiões do país. Neste sentido, foram analisadas amostras de 1.626 colônias, sendo 1048 do Brasil e as demais de outros 12 países, incluindo amostras de *A. m. scutellata*, *A. m. iberiensis*, *A. m. ligustica*, africanizadas e não-africanizadas da América do Sul e Central. A identificação desses padrões foi feita por PCR-RFLP da região COI com as endonucleases *BclI* e *TaqI*, seguida pelo sequenciamento de amostras representativas desses padrões. Esses resultados foram, então, associados aos padrões já descritos para a região COI-COII das mesmas amostras por Collet et al. (2006). A associação geográfica entre os padrões eletroforéticos observados e as relações entre os haplótipos sequenciados estabelecidas em rede de haplótipos permitiram efetuar certas inferências quanto à origem geográfica destes padrões. Foram identificados três padrões *BclI*, denominados 1, 2 e 3 e quatro padrões *TaqI*, denominados A, B, C e D. Sete padrões compostos, formados pela associação dos padrões das duas nucleases, foram identificados em amostras do Brasil. Quando dados anteriores de padrões de digestão da região intergênica COI-COII com a endonuclease *DraI* são considerados, 17 padrões foram verificados nestas amostras. Dentre as 90 amostras sequenciadas do Brasil, África do Sul, Quênia, Portugal, Espanha, Itália e Chile foram observados 35 haplótipos distintos que respondem por 13 diferentes sequências de aminoácidos. Nossos dados demonstraram que a simples associação entre padrões de restrição não se constituiu em meio seguro para se inferir a origem das linhagens mitocondriais em populações africanizadas, sendo mais indicado realizar subsequentemente o sequenciamento dos fragmentos que geraram estes padrões. Foi possível inferir a origem de 11 de 17 padrões associados COI-COII e COI encontrados no Brasil. Não foi observada distribuição clinal entre os padrões COI como o verificado em COI-COII. Os dados apontam claramente para substituições nucleotídicas e de aminoácidos exclusivas em amostras de origem europeia e africanas/africanizadas, uma questão que merece uma pesquisa subsequente.

**Palavras-chave:** *Apis mellifera*, Africanização, DNA mitocondrial, variação

## ABSTRACT

The Africanization process of *Apis mellifera* has raised several questions about the genetic makeup of resulting populations. This study aimed to identify the number, frequency and distribution of different mitochondrial haplotypes, as well as their origin in Africanized colonies sampled in different regions of the country. In this sense, 1626 colonies, 1048 from Brazil and the remaining from 12 other countries. Including samples from *scutellata*, *iberiensis*, and *ligustica* subspecies, Africanized and non-Africanized honeybees from South America and Central America were analyzed. Identification of patterns was done by PCR-RFLP of COI region with endonucleases *Bcl*I and *Taq*I, followed by sequencing of representative samples of these patterns. These results are then related to the patterns already described for COI-COII region of the same samples by Collet et al. (2206). Geographic association between observed electrophoretic patterns and the relationships among haplotypes allowed us to make certain inferences regarding geographical origin of these patterns. *Bcl*I generated three restriction patterns, designated 1, 2 and 3, while *Taq*I generated four restriction patterns, A, B, C and D. These patterns resulted in seven composite patterns formed by the association of patterns produced by the two nucleases in samples from Brazil. When previous data on the *Dra*I restriction patterns of the intergenic region COI-COII were considered, 17 composite haplotypes were observed in those samples. Samples from Brazil, South Africa, Kenya, Portugal, Spain, Italy and Chile (n = 90) were submitted to sequencing reaction, generating 35 haplotypes and 13 different aminoacid sequences. Our data demonstrated that simple association of restriction patterns was not adequate to infer geographic origin of mitochondrial lineages in Africanized populations, a task which requires knowledge of their corresponding nucleotide sequences. It was possible to infer the origin of 11 of the 17 composite COI and COI-COII haplotypes found in samples from Brazil. COI patterns did not show a clinal distribution like the one observed with COI-COII patterns. Our data clearly indicates nucleotide and amino acid substitutions privative to European and African / Africanized samples, a matter that deserves subsequent research.

**Keywords:** *Apis mellifera*, Africanization, mitochondrial DNA, variation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1.</b> Mapa representando a expansão das abelhas africanizadas a partir do apiário de Camacua em Rio Claro até o sul dos Estados Unidos .....	4
<b>FIGURA 2.</b> Padrões de restrição obtidos após eletroforese em gel de agarose 1%. <i>Bcl</i> I: 1, 2 e 3. <i>Taq</i> I: A, B, C e D .....	19
<b>FIGURA 3.</b> Padrões de <i>Bcl</i> I (em %) observados nas amostras de cada um dos países analisados .....	20
<b>FIGURA 4.</b> Padrões <i>Taq</i> I (em %) em amostras de cada um dos países analisados	20
<b>FIGURA 5.</b> Distribuição dos padrões compósitos <i>Bcl</i> - <i>Taq</i> I (em %) em amostras de cada um dos países analisados .....	21
<b>FIGURA 6.</b> Padrões associados encontrados no Brasil e nos demais países analisados, em porcentagem .....	26
<b>FIGURA 7.</b> Distribuição geográfica dos haplótipos compósitos de COI (em %) em amostras de abelhas Africanizadas de diferentes localidades do Brasil .....	30
<b>FIGURA 8.</b> Distribuição geográfica dos haplótipos associados (COI-COII e COI) nas localidades brasileiras e suas porcentagens relativas .....	31
<b>FIGURA 9.</b> Rede de haplótipos .....	34
<b>FIGURA 10.</b> Árvore filogenética .....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Número de colônias analisadas de cada país .....	13
<b>TABELA 2.</b> Procedência das amostras seqüenciadas .....	16
<b>TABELA 3.</b> Número de amostras para cada um dos padrões compósitos COI ( <i>Bcl</i> e <i>TaqI</i> ) em cada localidade analisada .....	22
<b>TABELA 4.</b> Padrão de sítio de corte para cada um dos padrões visualizados em gel de agarose 1% para a região COI do mtDNA .....	32
<b>TABELA 5.</b> Haplótipos de COI detectados em amostras do Brasil e suas relações de similaridade com os haplótipos caracterizados nas subespécies parentais, conforme a rede haplotípica construída .....	35
<b>TABELA 6.</b> Polimorfismos nucleotídicos entre os haplótipos da rede .....	39
<b>TABELA 7.</b> Polimorfismos protéicos entre os haplótipos da rede .....	41
<b>TABELA 8.</b> Sítios mutacionais polimórficos em COI de <i>Apis mellifera</i> que resultaram em substituição de aminoácidos na cadeia polipeptídica correspondente.....	42
<b>TABELA 9.</b> Descrição das 13 seqüências de aminoácidos correspondentes aos 35 haplótipos de COI de <i>Apis mellifera</i> .....	42
<b>TABELA 10.</b> Sítios de substituição de aminoácidos nas seqüências de COI de <i>A. mellifera</i> .....	43
<b>TABELA 11.</b> Inferências acerca da origem dos padrões associados encontrados no Brasil com as subespécies envolvidas no processo de africanização, de acordo com a rede de haplótipos .....	50

## ÍNDICE

<b>1 Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 O gênero <i>Apis</i> .....	1
1.2 Introduções de <i>Apis mellifera</i> .....	2
1.3 A genética da abelha africanizada .....	5
1.3.1 Estudos com o DNA mitocondrial .....	7
<b>2 Justificativa e Objetivos</b> .....	<b>11</b>
<b>3 Material e métodos</b> .....	<b>12</b>
3.1 Amostras e extração de DNA .....	12
3.2 Amplificação via PCR .....	12
3.3 Digestão com endonucleases e eletroforese .....	13
3.4 Distribuição geográfica dos padrões .....	14
3.5 Sequenciamento .....	14
3.6 Busca com a ferramenta BLAST .....	15
3.7 Rede de haplótipos e árvore filogenética .....	17
<b>4 Resultados</b> .....	<b>18</b>
4.1 Fragmento amplificado e Buscas com a ferramenta BLAST .....	18
4.2 Padrões de restrição da região COI do mtDNA .....	19
4.3 Associação de padrões de restrição de duas regiões do mtDNA .....	25
4.4 Distribuição geográfica dos padrões compósitos e associados .....	28
4.5 Dados de sequenciamento .....	32
4.5.1 Confirmação dos padrões .....	32
4.5.2 Rede de haplótipos .....	32

4.5.3	Árvores filogenéticas .....	36
4.5.4	Sítios polimórficos entre os haplótipos .....	38
4.5.5	Polimorfismos protéicos entre os haplótipos .....	40
<b>5</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>44</b>
5.1	Fragmento amplificado e padrões observados .....	44
5.2	Distribuição geográfica dos padrões .....	46
5.3	Origem dos padrões encontrados no Brasil .....	48
5.4	Mutações nucleotícas e protéicas entre os haplótipos .....	50
<b>6</b>	<b>Considerações finais .....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>57</b>
<b>Apêndice I:</b>	Alinhamento das sequências nucleotídicas dos 35 haplótipos observados.....	61
<b>Apêndice II:</b>	Alinhamento entre a sequência de nosso amplicon do haplótipo H23, também correspondente ao mesmo amplicon na sequência de <i>A. m. ligustica</i> (CROZIER e CROZIER, 1993) e a sequência correspondente em <i>Melipona bicolor</i> (AF370439.1) .....	64
<b>Apêndice III:</b>	Alinhamento entre a sequência do gene COI completo de <i>Chorthippus parallelus</i> (publicada por Lunt et al, 1996) e as nossas 13 diferentes sequências de aminoácidos. Estão indicadas todas as classes estruturais codificadas por essa região e suas posições relativas na sequência .....	65

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O gênero *Apis*

Os insetos mais antigos de que se tem registro foram encontrados em rochas que datam do período Carbonífero há, aproximadamente, 350 milhões de anos (CARPENTER e HERMANN, 1979). Ordens de insetos que ainda existem atualmente já estavam presentes no final do Paleozóico. Segundo Michener e Grimaldi (1988), a abelha mais antiga de que se tem registro é um fóssil de *Meliponini* encontrada em New Jersey que data de, aproximadamente, 80 milhões de anos atrás.

A origem do gênero *Apis* tem sido atribuída a um sítio de clima tropical, como a Índia ou África (GAULD e BOLTON, 1996). Atualmente, são reconhecidas nove espécies no gênero *Apis*: *A. mellifera*, *A. koschevnikovi*, *A. cerana*, *A. florea*, *A. andreniformis*, *A. dorsata*, *A. binghami*, *A. breviligula* e *A. laboriosa* (OTIS, 1991 in SMITH, 1991).

*Apis mellifera* é a espécie melhor estudada do gênero. Ruttner et al. (1978, 1988) agruparam as 26 subespécies reconhecidas até então em três ramos evolutivos. Os mesmos autores hipotetizaram que, a partir do centro de origem no nordeste da África, a espécie teria se expandido para as regiões de origem das diversas subespécies em um padrão de distribuição em forma de “Y”. Dados de Franck et al. (1991) mostram a coexistência dos três ramos evolutivos no nordeste da África, corroborando a hipótese desse local como sendo o centro de origem da espécie.

Atualmente, são reconhecidas 29 subespécies desde a inclusão de *A. m. pomonella* por Sheppard e Meixner (2003). Estas são agrupadas hoje em cinco ramos evolutivos, de acordo com seus locais de origem (FRANCK et al, 2000, 2001):

**Ramo A:** subespécies da África - *adansoni*, *capensis*, *intermissa*, *lamarckii*, *litorea*, *major*, *monticola*, *sahariensis*, *scutellata*, *siciliana* e *unicolor*.

**Ramo C:** subespécies do leste europeu e norte do Mediterrâneo – *carnica*, *cecropia*, *macedonica*, *ligustica*, *sicula*, *meda* e *pomonella*.

**Ramo M:** subespécies da Europa Ocidental – *iberiensis* e *mellifera*.

**Ramo O:** subespécies do Oriente Médio – *adami*, *anatoliaca*, *armeniaca*, *caucasica*, *cypria*, *meda* e *syriaca*.

**Ramo Y:** subespécie *Apis mellifera yemenitica*, com distribuição restrita à região da Etiópia.

A espécie *Apis mellifera* é encontrada hoje em quase todo o planeta, exceto nas regiões polares (SCHNEIDER et al, 2004).

## 1.2 Introduções de *Apis mellifera*

Anteriormente à colonização do Brasil, só eram encontradas em nosso país abelhas melíferas sem ferrão, os meliponídeos. Há indícios de que essas abelhas eram utilizadas por grupos indígenas para a coleta de mel e cera (NATES, 1996).

Devido à tradição dos colonizadores com o manejo de *Apis mellifera*, foram trazidas para o Brasil colônias de origem européia, iniciando assim a prática apícola com o gênero. Os primeiros registros de introduções européias datam de 1839 e são de *A. m. iberiensis* vindas de Portugal (NOGUEIRA NETO, 1972).

O Brasil não foi o único lugar das Américas que recebeu introduções de abelhas de espécies ou subespécies não nativas. Na antiga Nova Espanha (vice-reino Espanhol que se estendia dos estados do Arizona, Califórnia, Colorado, Nevada, Novo México e Utah nos EUA até a Costa Rica) e no México ocorreram também introduções de subespécies européias pelos colonizadores entre 1520 a 1530. A entrada dessas abelhas se deu por razões ligadas ao uso tradicional da cera branca de *Apis* para se fazer as velas na Espanha, já que a cera de meliponídeos utilizada alternativamente pelos colonizadores no Novo Mundo causava uma fumaça mais escura que incomodava (BRAND, 1984). Segundo o

mesmo autor, houve outra reintrodução de abelhas européias na região, dessa vez por Cuba, na última parte do século 18.

Nos anos 50, dados da literatura mostravam que subespécies de origem africana produziam mais mel que as de origem européia, embora apresentassem um comportamento mais defensivo (GONÇALVES, 1998). Esse fato fez com que os apicultores e pesquisadores brasileiros começassem a pensar em hibridizar subespécies européias aqui residentes com subespécies africanas. Com este procedimento, eles esperavam produzir um híbrido que apresentasse uma maior produção de mel do que obtido com as abelhas européias e com menor comportamento defensivo do que o apresentado pelas africanas.

Kerr (1967) relata que, em 1956, viajou para a África do Sul e Tanzânia a fim de selecionar rainhas de *Apis mellifera scutellata* dos melhores estoques para iniciar os experimentos. As 47 rainhas que sobreviveram à viagem ficaram em quarentena em um apiário no estado de São Paulo. Um ano depois, as que mais se destacaram na produção de mel foram transferidas para o apiário de Camacua na cidade de Rio Claro, interior do estado de São Paulo. Elas seriam, então, hibridizadas com a população européia residente a fim de aumentar a produção de mel e diminuir o comportamento defensivo.

Porém, acidentalmente, rainhas de 26 colônias escaparam. Após esse escape, os enxames começaram a se estabelecer como colônias ferais e se hibridizaram com a população residente principalmente nos apiários (KERR, 1967), resultando na abelha Africanizada (GONÇALVES, 1998).

A africanização da abelha melífera nas Américas tem sido considerada a mais rápida e espetacular invasão biológica conhecida (SCHNEIDER, DEGRANDI-HOFFMAN E SMITH, 2004). Elas colonizaram boa parte do continente a uma taxa estimada de 480 Km/ano, chegando a atingir o estado do Texas, sul do Estados Unidos, em menos de 50 anos (TAYLOR, 1985). A expansão gradual dessas abelhas pelo continente e os anos relativos às primeiras aparições documentadas nos diferentes países podem ser vistos na Figura 1.



**FIGURA 1.** Mapa representando a expansão das abelhas africanizadas a partir do apiário de Camacua em Rio Claro até o sul dos Estados Unidos. As datas representam o ano em que as primeiras aparições em cada localidade foi documentada. Extraído de Moritz et al. 2005.

Esta abelha resultante é considerada africanizada porque os traços africanos tendem a dominar sobre os caracteres europeus (GONÇALVES, 1998). Há várias razões propostas para, em conjunto, justificar esta dominância dos caracteres africanos sobre os traços europeus.

Schneider, DeGrandi-Hoffman e Smith (2004) apontaram as principais razões descritas na literatura para este amplo predomínio dos caracteres africanos: a maior taxa de crescimento e enxameagem apresentadas pelas africanas; o fitness reduzido dos híbridos; as vantagens dos zangões africanos produzidos em maior número; o fato das rainhas com origem africana emergirem antes das de origem europeia, tornando-se, assim, a rainha da colônia; a dominância de alelos africanos e usurpação de ninhos europeus por rainhas africanas, entre outras.

Ainda que as abelhas africanizadas sejam encontradas em toda a extensão ilustrada na Figura 1, há regiões nas Américas onde são encontradas apenas abelhas de subespécies de origem europeia. Dentre elas, estão o norte da América do Norte, devido ao clima frio e o Chile, que mesmo sendo próximo ao Brasil, apresenta além do clima frio, a Cordilheira dos Andes como uma barreira geográfica aos enxames africanizados.

A Argentina é outro exemplo. Do norte da Argentina em direção ao sul até a região de Tucuman encontra-se uma região saturada de abelhas africanizadas pela completa exclusão de apicultura com populações provenientes da Europa. De Buenos Aires até ao sul do país, esta área é considerada livre de abelhas africanizadas. Desde a entrada das abelhas africanizadas no país em 1968, essa área tem sido a principal produtora de rainhas dos tipos europeus para uso comercial. A região entre essas duas áreas é considerada uma zona de transição entre os dois tipos raciais (SHEPPARD et al., 1991).

São raras as populações puras de uma única subespécie, mesmo em apiários controlados. A ilha Kangaroo, sul da Austrália, contém uma população introduzida de *A. m. ligustica* que se acreditava ser a única população puramente *ligustica* ainda remanescente. Isso porque se pensava que essa população estivesse protegida da hibridização com a subespécie *A. m. mellifera*, também existente na ilha, devido a sua localização isolada na mesma. No entanto, Oldroyd, Sheppard e Stelzer (1993) demonstraram através de dados morfológicos, alozímicos e de DNA mitocondrial que isso não era real e que essa população também é formada por híbridos.

Na Europa, a Espanha é uma conhecida área de hibridização. Esse país é uma região de contato secundário entre as subespécies *A. m. mellifera* e *A. m. intermissa*, além de abrigar a subespécie *A. m. iberiensis*. Dados de Smith et al. (1991) apontam que as populações de *A. m. iberiensis* mais ao norte da Espanha mostram um padrão aloenzimático para o loco *Mdh-1* mais próximo de *A. m. mellifera*, enquanto que mais ao sul esse padrão é mais próximo ao de *Apis m. intermissa*. Portanto, as populações da abelha melífera da Península Ibérica encontram-se em uma zona de hibridização intra-específica entre linhagens africanas e do oeste da Europa (SMITH et al, 1991).

### **1.3 A genética da abelha africanizada**

Após o início do processo de africanização da abelha melífera no Brasil, algumas questões foram propostas acerca da população resultante: i) ocorreu uma hibridização entre estas subespécies ou apenas a substituição das linhagens

européias pela africana?; ii) os alelos europeus podem ser reconhecidos nestas populações?

Uma pergunta adicional e que dá origem ao presente trabalho pode ser assim proposta: Quais as linhagens maternas que estão presentes no pool gênico atual e sua provável origem geográfica?

Diferentes metodologias foram utilizadas para caracterizar geneticamente a população resultante, tais como análises morfométricas, alozímicas, polimorfismos do DNA mitocondrial e nuclear (microssatélites).

A primeira metodologia utilizada para tentar responder a essas questões foi a morfometria. Diniz-Filho, Fuchs e Arias (1999) apontaram algumas peculiaridades dessa técnica, como a baixa resolução para diferenciar as subespécies africanas e européias com total confiabilidade, o aparecimento de caracteres com padrão espacial diferencial um tempo depois do processo de africanização que só são percebidos quando os caracteres apresentam diferenças importantes, o forte efeito que a maioria dos caracteres analisados sofre de pressões ambientais. Apesar de ser um teste rápido e de baixo custo, o efeito do ambiente interfere nos resultados, de forma que, embora estes apontassem para a similaridade morfológica da abelha africanizada com a subespécie africana, estes achados não permitiram estabelecer a composição genética desta abelha.

Os estudos alozímicos foram igualmente utilizados em trabalhos que buscavam diferenciar as populações européias das africanas/africanizadas (ver, por exemplo, Del Lama et al. 1988, 1990; Lobo et al., 1989; Rotta 1999). Esses e outros estudos demonstraram a predominância de genes africanos nas populações das Américas. Esta metodologia, embora potencialmente mais poderosa, esbarrou no baixo número de sistemas polimórficos (nove entre cerca de 50 analisados) e o número reduzido de locos realmente informativos para se determinar a composição genética das populações do Novo Mundo (*Mdh-1* e *Hk-1*).

Os marcadores nucleares RAPDs, sigla em inglês para amplificação aleatória de DNA polimórfico, já produziram fragmentos específicos para grupos europeus com o primer 539, que se mostrou específico para a Europa Oriental, e para grupos africanos com o primer 652 (HALL, 1998).

Outro marcador nuclear também utilizado para este objetivo tem sido os locos microssatélites, graças à amplificação de fragmentos com repetições em tandem de motivos di ou trinucleotídicos geralmente em regiões não codificadoras do genoma nuclear. Foram caracterizados mais de quinhentos locos microssatélites em *Apis mellifera* (SOLIGNAC et al, 2003). Com essa metodologia Kraus, Franck e Vandame (2007) verificaram que a proporção de alelos africanos no México foi similar em todas as altitudes analisadas, indicando que a expansão dos enxames africanizados obteve sucesso mesmo em regiões elevadas. Collet et al. (2009) analisando 2034 amostras de sete países incluindo o Brasil e utilizando 12 locos microssatélites verificou que as populações africanizadas das Américas apresentam elevada variabilidade e uma constituição genética essencialmente africana.

Um marcador adicional tem sido amplamente utilizado para a caracterização das populações Africanizadas – trata-se dos padrões de restrição de genes mitocondriais originados pela ação de endonucleases. Este foi o marcador escolhido para a realização deste trabalho.

### **1.3.1 Estudos com o DNA mitocondrial**

Os primeiros trabalhos realizados objetivando fazer inferências acerca do genoma mitocondrial completo de *Apis mellifera* utilizavam mapas de restrição do mesmo como um todo. Tentavam também separar as subespécies européias e africanas através dos polimorfismos encontrados. Smith (1988) utilizou essa metodologia em colônias do Brasil, México e América do Norte em comparação com amostras de subespécies da Europa e da África. A autora obteve uma estimativa do tamanho da molécula de mtDNA da espécie pelo somatório dos tamanhos dos fragmentos de restrição.

Após a publicação do genoma mitocondrial completo de *A. m. ligustica* (CROZIER e CROZIER, 1993) sabe-se que ele é constituído por dois genes codificantes para RNA ribossômicos, 22 genes codificantes para RNA transportadores, 13 genes codificantes para proteínas, que espaços entre os genes

são praticamente ausentes e que o mesmo é muito rico em A+T, o que faz com que transições praticamente não ocorram. Com esses dados foi possível desenvolver novas metodologias para os propósitos iniciais.

Dentre as regiões mitocondriais, as mais utilizadas em estudos populacionais devido à facilidade de amplificação e quantidade significativa de polimorfismos observada por PCR-RFLP são: o gene citocromo B (cyt B), a região intergênica COI-COII (também conhecida como a região tRNA<sup>leu</sup>-COII), o gene 16S, a região tRNA<sup>ile</sup>-ND2 e o gene COI.

Vários estudos foram feitos utilizando uma ou mais regiões mitocondriais com ou sem a complementação de outros marcadores. Hall e Smith (1991) utilizando as regiões mitocondriais COI, COI-COII e a subunidade maior ribossomal por PCR-RFLP mostrou um polimorfismo característico entre amostras do Novo Mundo que define sua origem como africana ou européia. Garnery et al. (1993) desenvolveram um teste simples onde a amplificação da região COI-COII é capaz de diferenciar as amostras entre as três linhagens mitocondriais principais (A, M e C). Estudos foram realizados também utilizando o DNA mitocondrial como ferramenta para acessar a variabilidade de populações locais, como em De La Rua, Serrano e Gallían (1998, 2000) em populações das ilhas Canárias com a região COI-COII digerida com *DraI* e em Segura (2000) com a mesma região em conjunto com dados de microssatélites nas populações da Costa Rica.

Este trabalho vem acrescentar os achados para mais uma região mitocondrial aos estudos iniciados em 1999 em nosso laboratório (LGEH – Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros) utilizando o DNA mitocondrial como marcador. O objetivo geral sempre foi identificar o número e a frequência dos diferentes haplótipos mitocondriais, bem como sua possível origem nas colônias residentes no país.

Rotta (1999) demonstrou que 98% das colônias brasileiras apresentavam o padrão “Africano” utilizando PCR-RFLP da região citocromo B digerida com a endonuclease *BglII*. No entanto, esse método não permitia verificar a ocorrência de diferentes padrões africanos e a diferenciação interpopulacional para este marcador.

Além disso, a existência do padrão “africano” em populações do norte da África e Península Ibérica não permitia determinar a origem geográfica deste padrão nas colônias do Brasil.

Buscando sanar estas dificuldades, um grande número de amostras Africanizadas foram, em seguida, analisadas para a região intergênica COI–COII digerida com a nuclease *Dral* (Ferreira, 2002; Collet, 2004; Collet et al., 2006). Foram observados oito mitótipos, com ampla predominância dos padrões A1 e A4. Esses padrões apresentaram um aumento de frequência em direção ao norte e ao sul, respectivamente. Esse gradiente norte/sul já havia sido observado em amostras da África. No entanto, o padrão A1 ocorre tanto em *A. m. scutellata* do sul da África, quanto em subespécies do norte da África e Península Ibérica (*A. m. intermissa* e *A. m. iberiensis*) (FRANCK et al., 2001), não permitindo assim definir sua origem geográfica.

Na tentativa de diferenciar as amostras de padrão A1 em subtipos que permitissem definir a origem das amostras, Lino e Silva (2006) analisou as mesmas amostras através de PCR-RFLP utilizando a região tRNA<sup>ile</sup>-ND2 e as endonucleases *Dral* e *Pacl*. Foram detectados novos padrões nas colônias africanizadas do Brasil e Uruguai. Quando associados aos padrões anteriores de COI-COII permitiram estabelecer seis haplótipos compostos. O seqüenciamento apontou que, apesar de 80% das colônias ainda serem possivelmente de origem *A. m. scutellata*, a composição genética das populações Africanizadas parece conter vestígios de antigas ou recentes introduções de origem européia.

Todos esses estudos em conjunto trouxeram resultados importantes, porém a origem geográfica de alguns padrões existentes no Brasil não foi ainda totalmente esclarecida. Tornava-se, então, necessário encontrar outra região do DNA mitocondrial que pudesse contribuir para a definição da origem de certos haplótipos mitocondriais nas colônias Africanizadas. Dentre os genes candidatos, a escolha recaiu sobre o gene mitocondrial COI.

A região COI do DNA mitocondrial de *Apis mellifera* é totalmente codificante e dá origem à subunidade I da proteína citocromo oxidase. A subunidade I funciona

como um terminal catalítico na cadeia respiratória da mitocôndria, está envolvida no transporte de elétrons e na translocação de prótons através da membrana, tem sido relativamente bem estudada a nível bioquímico e seu tamanho e estrutura parecem ser conservados em todos os organismos aeróbicos analisados (SARASTE, 1990).

Lunt et al. (1996) apontam que a região é útil para ser usada em estudos populacionais porque é a que codifica a maior das três subunidades da citocromo oxidase (composto por 511pb em *D. yakuba*, comparado com 228 para COII e 261 para COIII; CLAYRE e WOLSTENHOLME, 1985) e um dos maiores genes codificadores de proteína no genoma mitocondrial de Metazoa. Isso nos permite amplificar e seqüenciar muito mais caracteres (nucleotídeos) dentro de um mesmo complexo funcional.

Um dos fatos que deve ser levado em consideração em qualquer estudo com DNA mitocondrial é a ocorrência de NUMTs, ou cópias do genoma mitocondrial encontradas no genoma nuclear. A região COI do DNA mitocondrial de *Apis mellifera* é apontada como sendo a que mais contém NUMTs dentre todos os organismos já analisados (BEHURA, 2007).

## 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

Prada (2004) reportou que o gene mitocondrial que codifica para a subunidade I da proteína citocromo oxidase (COI) de *Apis mellifera* possuía considerável variação evidenciada pela digestão do mesmo com as endonucleases *Bcl* e *TaqI*. A partir desse dado e da necessidade de se escolher outro gene mitocondrial a fim de seguir com as análises em busca da origem dos padrões encontrados no Brasil resolvemos utilizá-la para este fim, dando origem ao presente trabalho.

A preferência pela identificação de padrões de restrição, seguida pelo sequenciamento de algumas amostras de cada padrão, em contraposição ao seqüenciamento massivo de amostras tem uma razão particular. Apesar da análise de sequências ser muito mais informativa do ponto de vista da variabilidade existente, o uso de padrões de restrição é suficiente nesse caso, uma vez que se trata de populações originadas de um evento primário de introgressão gênica a partir de 26 rainhas de *A. m. scutellata* que culminou com o processo de africanização. Esta escolha permitiu a análise de um número elevado de colônias de diferentes procedências, ampliando a base para eventuais inferências sobre a origem da variação detectada.

Portanto, este trabalho tem por objetivo estabelecer a origem das linhagens mitocondriais observadas nas abelhas Africanizadas (*Apis mellifera* L.) do Brasil.

Os dados permitirão i) definir com maior confiabilidade a provável origem geográfica dos haplótipos mitocondriais observados nas populações de *Apis mellifera* do Brasil a partir do achados nas subespécies parentais que resultaram na abelha africanizada, ii) averiguar se os dados podem ser explicados unicamente pela introdução de *Apis mellifera scutellata* em 1957 e, iii) melhor caracterizar o gradiente latitudinal (norte-sul) apresentado pelos padrões A1 e A4 da região intergênica COI-COII no Brasil, um fato também observado na África (FRANCK *et al.*, 2001).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostras e extração de DNA

Foram analisadas para a região COI do DNA mitocondrial amostras de 1.626 colônias de *Apis mellifera*, sendo 1048 provenientes de 46 localidades do Brasil e 578 amostras de outros 12 países. Dessas, 1207 já haviam sido fenotipadas para a região intergênica COI-COII do DNA mitocondrial (681 do Brasil e 526 dos demais países) (COLLET et al, 2006; COLLET, informação pessoal). Na Tabela 1 é descrito o número de colônias analisadas para cada país para cada uma das regiões mitocondriais e as subespécies correspondentes. Quanto às amostras das Américas, as colônias do Chile não são africanizadas, as da Argentina são de regiões de colônias africanizadas e de colônias essencialmente européias, e as dos demais países são de abelhas africanizadas.

O DNA das amostras fora previamente extraído pelo método fenol-clorofórmio (SHEPPARD e McPHERON, 1991) a partir do tórax de uma operária adulta de cada colônia e encontrava-se mantido em freezer no Banco de DNA do Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros (LGEH – UFSCar).

#### 3.2 Amplificação via PCR

Para cada amostra foi amplificada via PCR uma região de 1044pb correspondente a parte do gene mitocondrial que codifica a subunidade I da citocromo oxidase (gene COI). A amplificação foi realizada mediante o uso dos primers descritos por Hall e Smith (1991):

F: 5' - TTA AGA TCC CCA GGA TCA TG - 3'

R: 5' - TGC AAA TAC TGC ACC TAT TG - 3'

As reações ocorreram em volume total de 25µl em mistura contendo tampão de reação 10X, 250µM de cada dNTP, 1.25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1µM dos primers F e R, 1µl de DNA, 1 U de Taq DNA Polymerase (Fermentas) e 16µl de água esterilizada. A reação foi submetida a um ciclo de 94°C por 3 minutos (desnaturação inicial), 30

ciclos de 94°C por 30 seg (desnaturação), 56°C por 20 seg (anelamento) e 72°C por 1 min (extensão), seguido por um ciclo de extensão final de 72°C por 10 min. As amostras foram mantidas a 4°C até serem retiradas do termociclador.

**TABELA 1.** Número de colônias analisadas de cada país. N indica o número de localidades de cada país, COI indica o número de colônias analisadas para a região COI e COI-COII indica o número de colônias previamente analisadas para a região COI-COII (COLLET et al, 2006). As subespécies parentais estão indicadas.

País	N	COI	COI-COII	Subespécie
Brasil	46	1048	681	
Portugal	5	27	27	<i>Apis mellifera iberiensis</i>
Espanha	11	43	43	<i>Apis mellifera iberiensis</i>
Itália	3	46	0	<i>Apis mellifera ligustica</i>
Chile	7	11	11	
Argentina	8	153	153	
África do Sul	6	60	60	<i>Apis mellifera scutellata</i>
Quênia	1	25	25	<i>Apis mellifera scutellata</i>
Uruguai	6	46	46	
Venezuela	5	117	117	
Colômbia	15	25	25	
Costa Rica	1	9	9	
Honduras	1	10	10	

### 3.3 Digestão com endonucleases e eletroforese

O fragmento amplificado de COI de cada amostra foi submetido à digestão com as endonucleases *TaqI* e *BclI*, separadamente. As reações de digestão foram feitas em volume final de 20µl, em mistura contendo tampão Buffer G 10X (para *BclI*) ou tampão Buffer *TaqI* 10X (para *TaqI*), 2 U das enzimas (*BclI* ou *TaqI*), 13,8µl de água esterilizada e 4µl da reação de PCR.

As reações de digestão ocorreram em banho-maria a 60° (*TaqI*) ou a 37° (*BclI*) por, no mínimo, quatro horas. A visualização dos produtos da digestão foi feita em géis de agarose 1% corados com *GelRed* e visualizados em luz UV.

### 3.4 Distribuição geográfica dos padrões

Foram construídos dois mapas ilustrando a distribuição geográfica da ocorrência dos padrões no Brasil. O primeiro mapa contém somente os padrões COI (*BclI* e *TaqI*), denominados como padrões compósitos por serem formados pelo padrão eletroforético das duas endonucleases em estudo. O segundo mapa contém os padrões formados pela associação entre os padrões COI-COII (COLLET et al, 2006) e os padrões COI, denominados como padrões associados.

### 3.5 Sequenciamento

Foram seqüenciadas 90 amostras representando 11 dos 17 padrões associados (COI-COII COLLET et al, 2006 e COI) nas amostras do Brasil e demais países. Na Tabela 2 é descrita a procedência de cada uma das amostras seqüenciadas.

Para o completo seqüenciamento do fragmento amplificado de 1044 bp, foi desenhado um par de primers interno a este amplicon. Os fragmentos resultantes foram denominados de COI-1 e COI-2, contendo 577pb e 489pb, respectivamente.

Os novos conjuntos de oligos iniciadores foram, deste modo, formados de forma que cada par continha um dos oligos já utilizados para a amplificação do fragmento de 1044pb e outro oligo novo.

Reação para COI-1:

F: 5' - TTAAGATCCCCAGGATCATG - 3' (já utilizado)  
R: 5' - GTTGATAAAGAATTGGATCTCC – 3'

Reação para COI-2:

F: 5' – GGAGATCCAATTCTTTATCAAC - 3'  
R: 5' - TGC AAA TAC TGC ACC TAT TG - 3' (já utilizado)

Os produtos da PCR foram então “purificados” usando 1U de SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, GE) e 10U de *ExoI* (Exonuclease I, GE) para cada 8µl de amostra. Posteriormente, estas foram incubadas a 37 °C por 1 hora e, em seguida, a 80°C por 15 minutos. As sequências *forward* e *reverse* foram obtidas em seqüenciador ABI 3700 (Applied Biosystems).

Os eletroferogramas gerados foram analisados pelo programa *CodonCode Aligner* (CodonCode Corporation, Dedham, MA) e alinhadas através do programa *BioEdit* (Hall, 1998).

Foram feitas simulações de digestão no software *GeneRunner* para cada uma das sequências nucleotídicas referentes a cada um dos padrões de restrição visualizados em gel de agarose para confirmação dos tamanhos dos fragmentos observados em gel.

### **3.6 Busca com a ferramenta BLAST**

Foi realizada uma busca usando a ferramenta BLAST do site NCBI utilizando-se como arquivo de entrada a sequência completa da região COI utilizada como controle de *Apis mellifera ligustica* (Crozier e Crozier, 1993) retirada do mesmo site sob o código L06178. Em seguida, igual procedimento foi repetido para os dois pares de primers utilizados para amplificar as duas partes da região COI. A base de dados comparada foi a sequência de nucleotídeos do genoma nuclear de *Apis mellifera* versão 4, de 3 de outubro de 2006.

Esta busca objetivou detectar possíveis similaridades entre a sequência do gene COI mitocondrial com regiões do genoma nuclear de *Apis mellifera* (NUMTs).

TABELA 2: Procedência das amostras seqüenciadas.

País	Localidade	Amostras	Subespécie	País	Localidade	Amostras	Subespécie
Brasil	Alegrete	3	Africanizada	África do Sul	Pretória	6	<i>A. m. scutellata</i>
	Araripina	2	Africanizada		Franklington	3	<i>A. m. scutellata</i>
	Barra do Corda	2	Africanizada		White River	3	<i>A. m. scutellata</i>
	Blumenau	2	Africanizada	<b>Total</b>	12		
	Boa Vista	4	Africanizada	Quênia	8	<i>A. m. scutellata</i>	
	Corumbá	3	Africanizada	<b>Total</b>	8		
	Curitiba	1	Africanizada	Portugal	Évora	1	<i>A. m. iberiensis</i>
	Dores do Indaiá	3	Africanizada		Malveira	2	<i>A. m. iberiensis</i>
	Eldorado do Sul	1	Africanizada		Moura	1	<i>A. m. iberiensis</i>
	Florianópolis	1	Africanizada		Serpa	1	<i>A. m. iberiensis</i>
	Gov.	1	Africanizada		V. F. Rosário	1	<i>A. m. iberiensis</i>
	Valadares			<b>Total</b>	6		
	Gurupi	2	Africanizada	Espanha	Breda	2	<i>A. m. iberiensis</i>
	Lagoa	1	Africanizada		Coll de Nargo	1	<i>A. m. iberiensis</i>
	Vermelha				Rio Sevilla	1	<i>A. m. iberiensis</i>
	Luís Antônio	4	Africanizada		Lecrin	1	<i>A. m. iberiensis</i>
	Manaus	1	Africanizada		Mijas	1	<i>A. m. iberiensis</i>
	Miranda	5	Africanizada	Orba	1	<i>A. m. iberiensis</i>	
	Mossoró	1	Africanizada	Pablo de Mont	2	<i>A. m. iberiensis</i>	
	Nova Olinda	3	Africanizada	Serra	2	<i>A. m. iberiensis</i>	
	Ouro Preto do Oeste	3	Africanizada	<b>Total</b>	11		
	Santa Maria	1	Africanizada	Itália	Seregno	3	<i>A. m. ligustica</i>
	São Joaquim	1	Africanizada		Pozzone	1	<i>A. m. ligustica</i>
Viçosa	1	Africanizada	<b>Total</b>	4			
<b>Total</b>		46		Chile	La Union	3	Não africanizada
					Truman		
				<b>Total</b>	3		

### 3.7 Rede de haplótipos e árvore filogenética

A partir das 90 sequências obtidas e da sequência de *A. m. ligustica* utilizada como controle (Crozier e Crozier, 1993) foi construída uma rede de haplótipos, a fim de se averiguar as relações de similaridade entre os haplótipos encontrados no Brasil e nas amostras das raças parentais - *A. m. scutellata*, *A. m. iberiensis* e *A. m. ligustica*. Para tal, foi utilizado o programa MEGA 4 para montar o arquivo de entrada e o programa TCS versão 1.21 para construção da rede.

Estas sequências foram utilizadas ainda para a elaboração de árvores filogenéticas a fim de confirmar a informatividade do gene para o objetivo proposto. A sequência correspondente ao de *Melipona bicolor* (Genbank: AF370439.1) foi utilizada como grupo externo. As árvores foram elaboradas com cada um dos métodos disponíveis no software MEGA 5 - Probabilidade Máxima, *Neighbor-joining*, Evolução Mínima, UPGMA e Máxima Parsimônia, todos com a opção de 10000 repetições (*bootstrap*).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Fragmento amplificado e Buscas com a ferramenta BLAST

O fragmento amplificado da região COI (Figura 2) contém 1044pb e se inicia na posição 1908 e termina na posição 2951 do genoma mitocondrial de *Apis mellifera* descrito por Crozier e Crozier (1993), para um total de 16343pb. Nosso fragmento se inicia na posição 114 da região COI e termina na posição 402 da sequência de Crozier e Crozier (1993) para este gene.

As buscas com a ferramenta BLAST do site NCBI revelaram 503 pontos de correspondência do fragmento de 1044pb amplificado para a região COI no genoma nuclear de *Apis mellifera*, a maioria apresentando baixo número de bases compartilhadas se comparada ao tamanho total do fragmento.

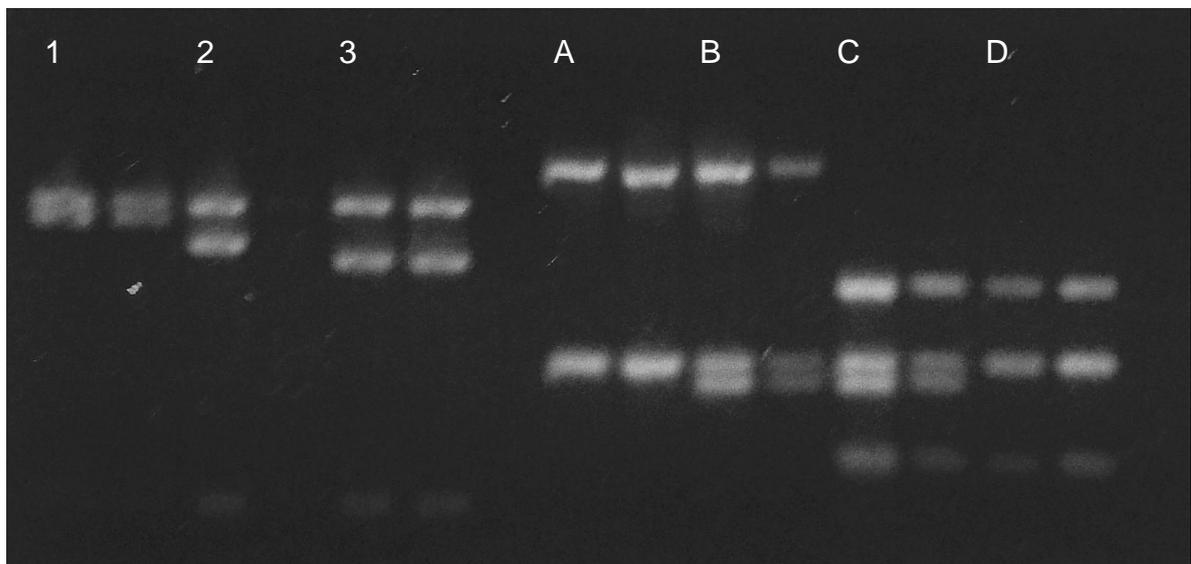
A maior correspondência foi de 713pb, com Score de 914 e E-Value de 0, embora a sequência tenha apresentado regiões de não correspondência (GAPs) para que esta similaridade fosse obtida.

Quanto ao primeiro par de primers utilizado para amplificar o fragmento completo foram encontradas 18 correspondências para o primer *forward* e 23 para o *reverse*. No entanto, as correspondências não foram completas, sendo que a maioria delas apresentou entre 14 e 16pb. Com exceção de uma região (group 7.33), as outras não apresentavam os dois primers situados proximamente. Nesta região, os dois primers estão situados a, aproximadamente, 7,1Kb de distância, o que impossibilita qualquer reação de amplificação por PCR da mesma.

Levando-se em conta os pares de primers utilizados para amplificar a região COI em dois fragmentos (COI-COII) para sequenciamento, é possível concluir que os oligos utilizados se encontram distantes no genoma nuclear de *Apis mellifera*, de modo a permitir o estudo deste gene mitocondrial mediante a metodologia utilizada.

## 4.2 Padrões de restrição da região COI do DNA mitocondrial

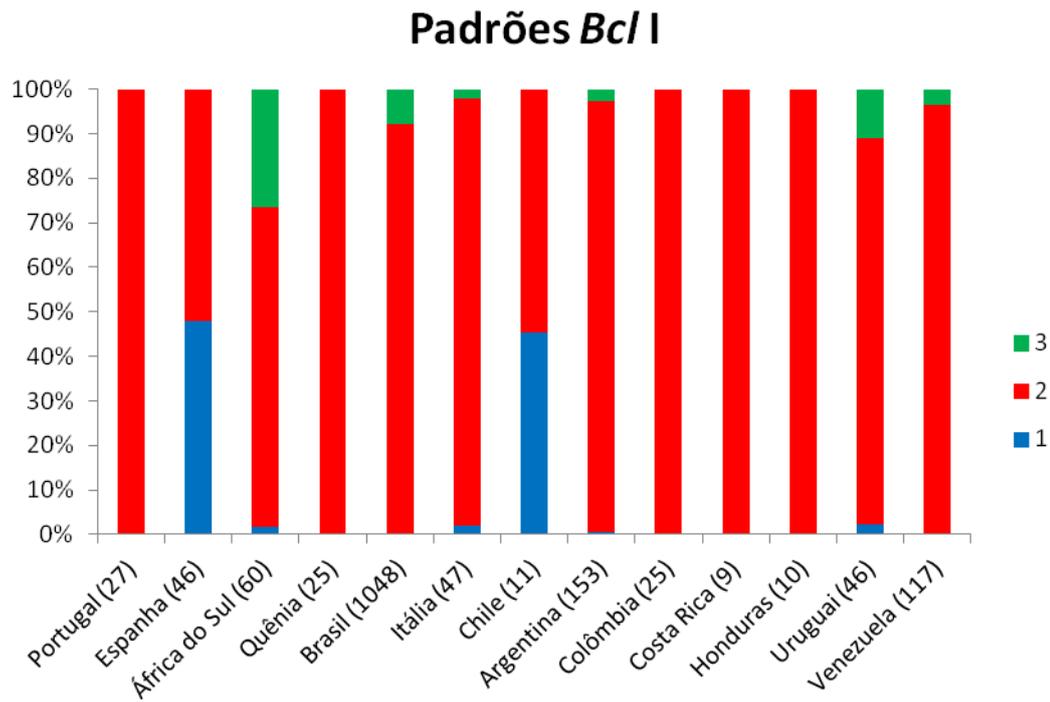
Após eletroforese em géis de agarose 1% dos produtos das digestões do fragmento COI amplificado foram observados três padrões de restrição para a endonuclease *Bcl*I, denominados 1, 2 e 3. Quanto à endonuclease *Taq*I, foram observados quatro padrões de restrição denominados A, B, C e D (Fig. 2).



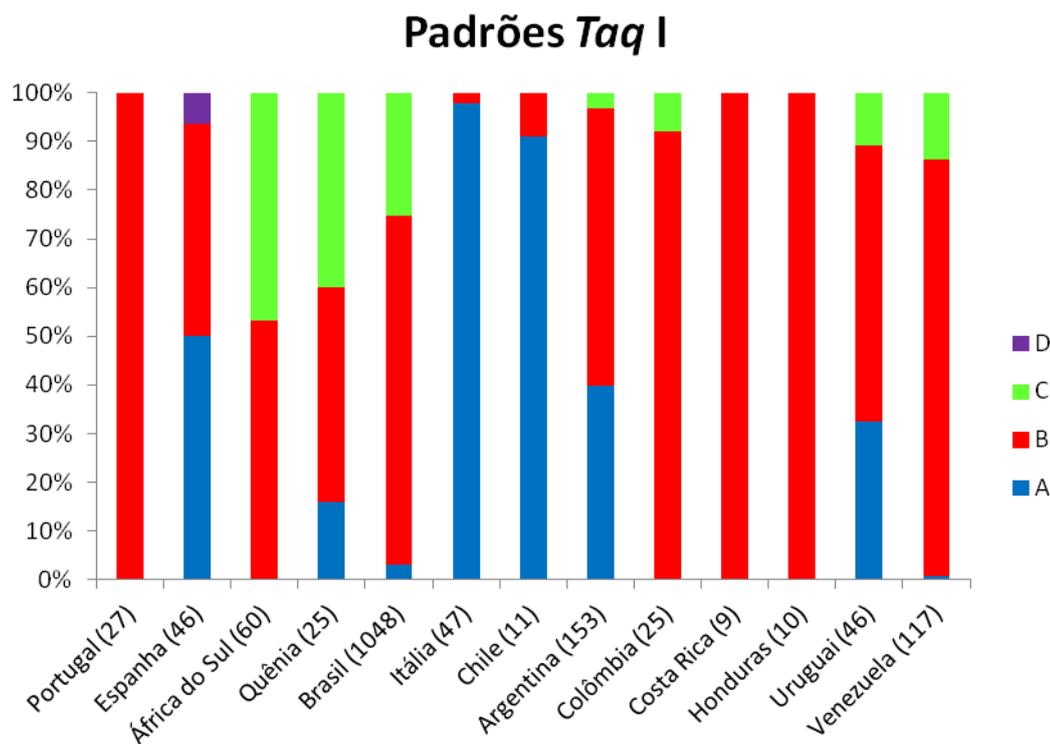
**FIGURA 2:** Padrões de restrição obtidos após eletroforese em gel de agarose 1%. *Bcl* I: 1, 2 e 3. *Taq* I: A, B, C e D.

No Brasil (1048 amostras), para a endonuclease *Bcl*I apenas uma amostra apresentou o padrão de restrição 1 (0,09% das amostras), 964 amostras apresentaram o padrão 2 (aproximadamente 92%) e 83 apresentaram o padrão 3 (aproximadamente 8%); para a endonuclease *Taq*I, 34 amostras apresentaram o padrão A (3%), 784 o padrão B (72%) e 266 apresentaram o padrão C (25%).

O padrão D foi observado somente em três amostras da Espanha (6,5% das amostras deste país). Nas Figuras 3 e 4, podemos ver a frequência (em porcentagem) de cada padrão para cada uma das endonucleases nas amostras dos países analisados. Os gráficos mostram que o padrão 1 parece ser mais comum em amostras europeias e não africanizadas, enquanto os padrões 3 e C parecem ocorrer mais frequentemente em amostras de países africanos e africanizados.



**FIGURA 3:** Padrões de *Bcl* I (em %) observados nas amostras de cada um dos países analisados. Entre parênteses, o número de colônias analisadas.

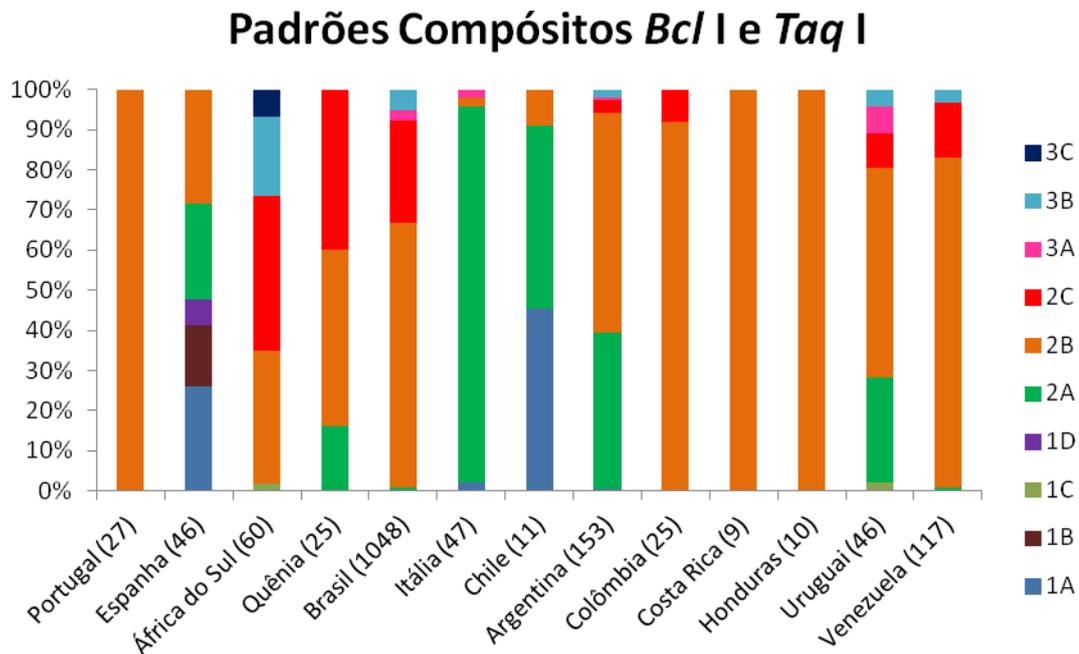


**FIGURA 4:** Padrões *Taq* I (em %) em amostras de cada um dos países analisados. Entre parênteses, o número de colônias analisadas.

Na Figura 5, podemos observar a distribuição (em %) dos padrões formados pela associação dos padrões *Bcl* I e *Taq* I, doravante denominados padrões compósitos, em amostras de cada um dos países analisados.

Nas amostras de *A. m. iberiensis*, as amostras de Portugal apresentaram apenas o padrão 2B, enquanto as amostras da Espanha apresentaram cinco padrões, dois dos quais exclusivos de amostras deste país (1B e 1D).

Em amostras de *A. m. scutellata*, as amostras da África do Sul apresentaram cinco padrões, enquanto as amostras do Quênia apresentaram dois destes padrões, além de um terceiro exclusivo. A Tabela 3 descreve o número de amostras de cada localidade e os respectivos padrões compósitos observados.



**FIGURA 5:** Distribuição dos padrões compósitos *Bcl* - *Taq* I (em %) em amostras de cada um dos países analisados.

**TABELA 3:** Número de amostras para cada um dos padrões compósitos COI (*Bcll* e *Taql*) em cada localidade analisada. As linhas representam as localidades dentro de cada país e as colunas representam cada um dos padrões compósitos encontrados, o número de amostras analisadas para a região COI em cada localidade (COI) e o número de amostras analisadas por Collet et al (2006) para a região intergênica COI-COII em cada localidades (COI-COII).

País	Localidade	1A	1B	1C	1D	2A	2B	2C	3A	3B	3C	COI	COI-COII	
Brasil	Aldeia Contão						6		1			7	7	
	Alegrete						7			1		8	8	
	Aracaju						8			1		9	9	
	Araripina						17	4			1	22	22	
	Barra do Corda						15	1				16	16	
	Belém						11	9				20	20	
	Blumenau						19	6	1			26	21	
	Boa Vista						30	5	6	1		42	38	
	Bom Jardim						16	13		2		31	15	
	Brasília						18	1	1	1		21	0	
	Buquim						4	1				5	5	
	Conde						3	1				4	4	
	Corumbá						1	15		1	1	18	11	
	Cuiabá							34	3			37	17	
	Curitiba							17	3		2	22	7	
	Dores do Indaiá							18	2			20	20	
	Eldorado do Sul						1	20	2		3	26	26	
	Fernando de Noronha							15				15	0	
	Florianópolis							6	10		1	17	13	
	Gioânia							18	2			20	20	
	Governador Valadares						3	14	2			19	16	
	Guarai							18	3	1		22	22	
	Gurupi							8	7			15	15	
	Lagoa Vermelha							27	11		2	40	21	
	Luís Antônio							31	48	2	21	102	45	
	Manaus							27	2		1	30	22	
	Maringá							9	16		3	28	23	
	Miranda						1	20	3	1	1	1	27	26
	Mossoró							14	4	2		20	20	
	Nova Olinda							13	6	1		20	19	
	Ouro Preto do Oeste							15	5	2		22	20	
	Picos							9	9			18	17	
	Pomerode		1					9	3			13	0	
	Pontal do Araguaia							22	1	6	1	29	21	
	Praia de Guaratuba							8	18	1	4	31	0	
	Recife							20	13			33	13	
Ribeirão Preto							9	17			26	0		
Rio do Sul							8	3			12	0		
Rio Preto do EVA							7	1			8	0		
Santana do Livramento							7	1			8	8		
Salvador							20	7			27	6		



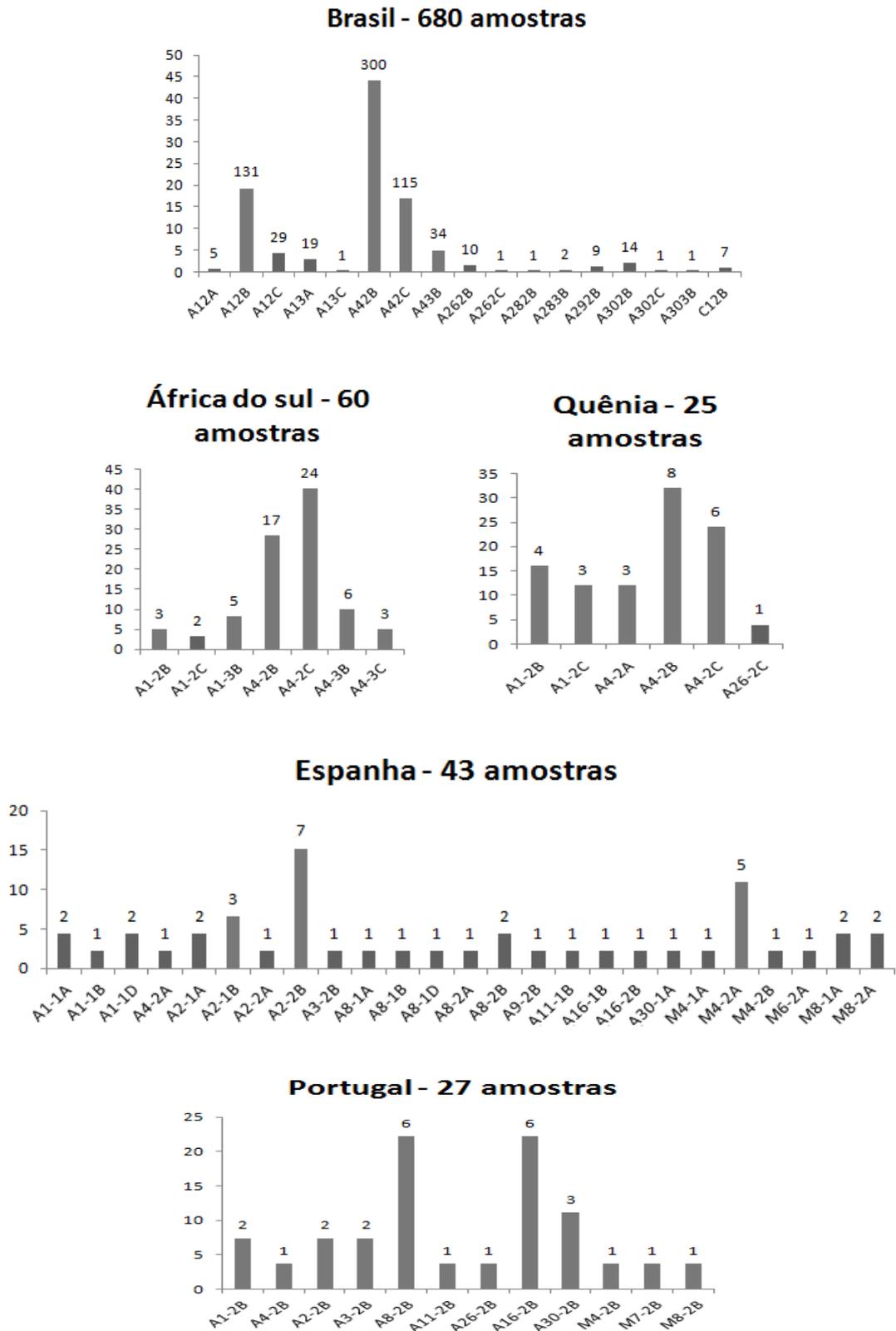
Tabela 3: Continuação

País	Localidade	1A	1B	1C	1D	2A	2B	2C	3A	3B	3C	COI	COI-COI
<b>Chile</b>	La U. Mashue	1										1	1
	UTC					2						2	2
	Penco					1						1	1
	<b>Total</b>											<b>11</b>	<b>11</b>
<b>Argentina</b>	Província de San Juan					6	15					30	30
	Província de Salta					1	18	1				20	20
	Província de Mendoza	1				36	16					54	54
	Província de La Rioja					6	18	2	1	1		24	24
	Província de Catamarca						3	2		1		7	7
	Tucuman					1	6					10	10
	Córdoba					4	6					2	2
	Coronel Villegas						2					6	6
	<b>Total</b>												<b>153</b>
<b>Uruguai</b>	Montevideo			1			4					5	5
	Rocha					1	5			2		8	8
	O. Lavalle						5	1				6	6
	Paysandu					1	3					4	4
	Mello					5	5	3	1			14	14
	Durazno					5	2		2			9	9
<b>Total</b>												<b>46</b>	<b>46</b>
<b>Colômbia</b>	Boyacá						3					3	3
	Coello						2					2	2
	Ibagué						1					1	1
	Rovina						1	1				2	2
	Suba						6					6	6
	Paz Del Rio						1					1	1
	Villa R.						1					1	1
	Fusaga						1					1	1
	Choachi						1					1	1
	S. R. Viter						1					1	1
	La Union						1					1	1
	Mosquera						1					1	1
	Tutaza						1					1	1
	Miguel						1					2	2
	Teruel						1					1	1
<b>Total</b>												<b>25</b>	<b>25</b>
<b>Venezuela</b>	Cojedes						40	6				46	46
	Vargas						12	5				17	17
	Lara						14	4				18	18
	Yaracuy					1	13	1		3		18	18
	Guárico						18					18	18
	<b>Total</b>												<b>117</b>

### **4.3 Associação de padrões de restrição de duas regiões do mtDNA**

Do total de amostras analisadas dos países em estudo, exceto Itália, 680 amostras já haviam sido analisadas para a região COI-COII do mtDNA por Collet et al (2006) (Tabela 3). Associando-se os padrões COI-COII de Collet et al (2006) com os padrões caracterizados neste estudo, foram definidos padrões associados assim identificados: primeiramente, o padrão COI-COII, seguido após o hífen pelo padrão COI. Como exemplo, o padrão associado A4-2A significa que essa amostra apresentou o padrão A4 para COI-COII e o padrão composto 2A para COI.

A Figura 6 mostra a porcentagem relativa dos padrões associados encontrados em amostras de cada um dos países em estudo.



**FIGURA 6:** Padrões associados encontrados no Brasil e nos demais países analisados, em porcentagem. Cada padrão é formado pela associação dos padrões COI-COII (Collet et al., 2006) e dos padrões COI observados. Os números sobre cada barra indicam o número de amostras que apresentaram cada padrão.

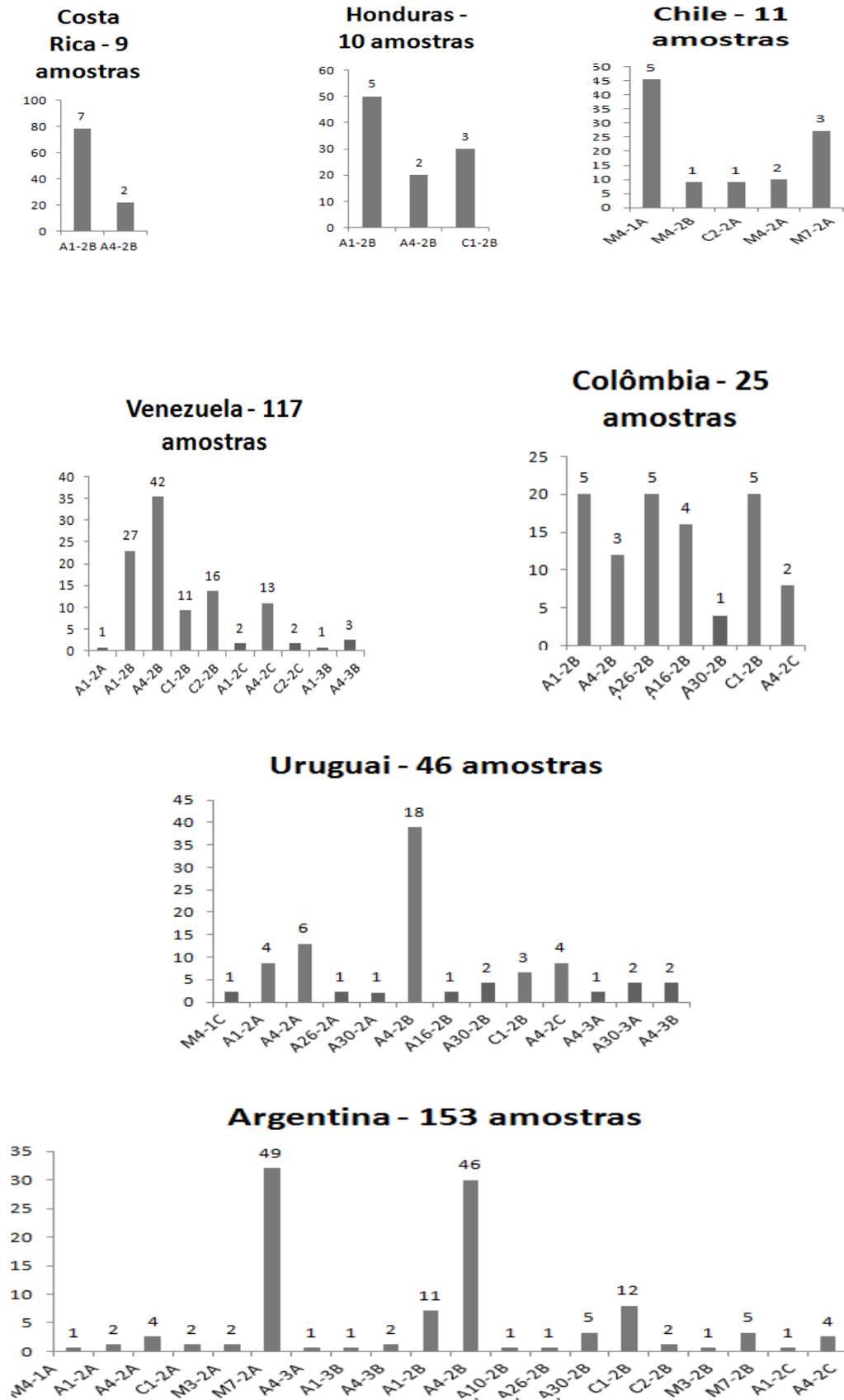


FIGURA 6: Continuação

#### 4.4 Distribuição geográfica dos padrões compostos e associados

A Figura 7 apresenta a distribuição geográfica dos sete padrões compostos COI encontrados no Brasil. O número de amostras de cada localidade que apresentou cada um destes padrões se encontra na Tabela 3. Embora o número de amostras de cada localidade não seja suficiente para uma inferência quanto à porcentagem relativa de cada haplótipo em cada uma delas; no entanto, os dados apresentados permitem verificar a ocorrência ou não dos padrões em cada sítio amostrado.

Podemos notar que o padrão 2B foi observado em todas as localidades, sendo o mais frequentemente detectado; por outro lado, os padrões 1A e 3C só foram encontrados em Pomerode e Miranda, respectivamente, sendo os mais raros.

O padrão 3A é encontrado em todo o norte da distribuição e ao sul até Blumenau, bem como o padrão 2C que aparece em quase todas as localidades.

O padrão 2A é visto do sudeste até o sul do país em três localidades (Eldorado do Sul, Governador Valadares e Miranda). O padrão 3B aparece tanto no norte como no sul do país; no entanto, parece apresentar um aumento em direção ao sul do país.

A Figura 8 nos mostra a distribuição geográfica dos padrões associados e suas porcentagens em cada uma das localidades analisadas do Brasil. É possível perceber que os padrões associados A1 tendem a aumentar em direção ao norte, enquanto os padrões A4 tendem a aumentar em direção ao sul, como já definido para a região COI-COII por Collet et al (2006). O padrão A1-2A (único padrão associado que contém 2A) só é encontrado em três localidades do sudeste e sul do país.

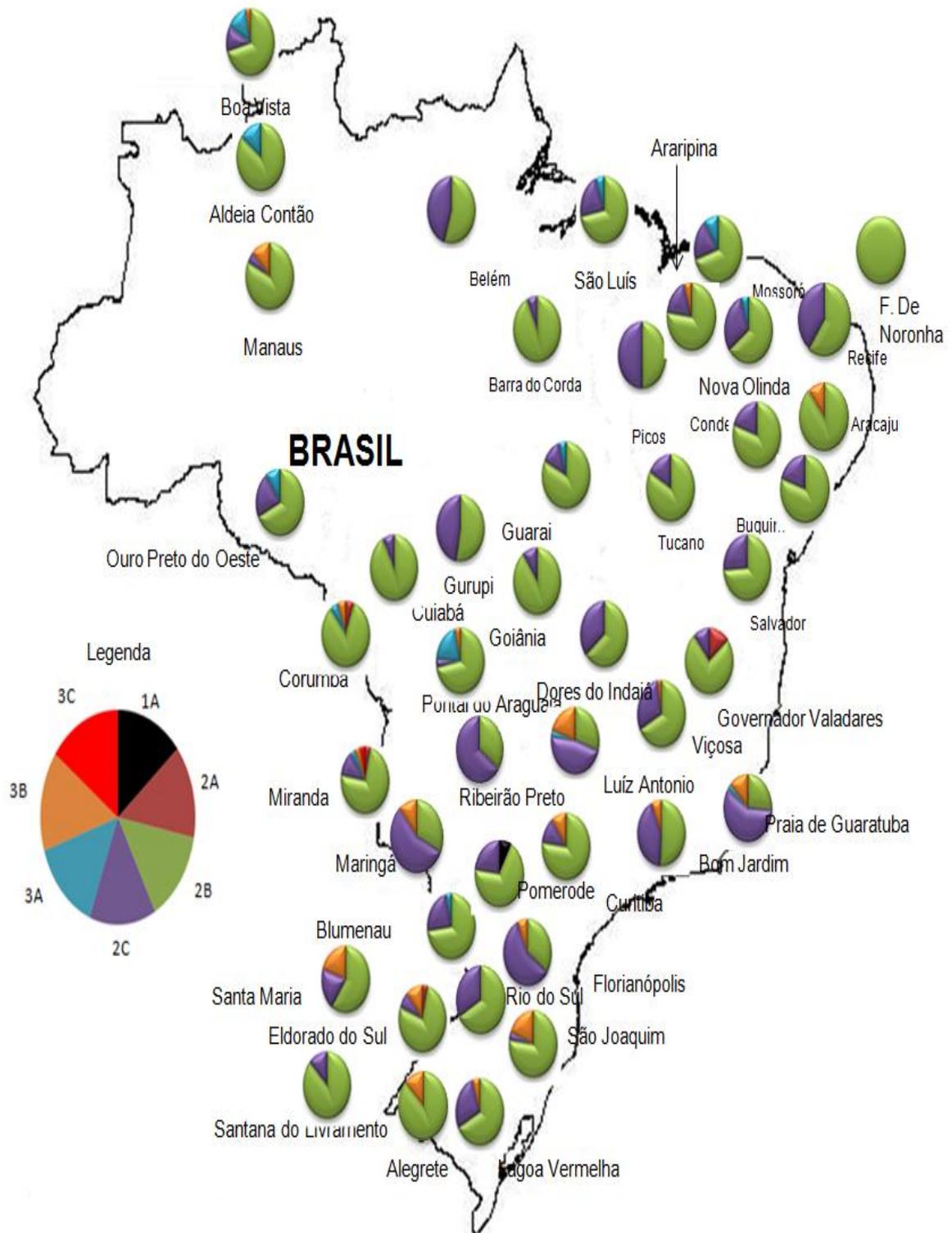
O padrão A4-3B é encontrado em amostras do sul quanto do norte do país; no entanto, apresenta um aumento em direção ao sul. O padrão C1-2B é encontrado do centro em direção ao sul do país.

Alguns padrões foram encontrados somente em uma ou duas localidades em regiões mais frias do país, são eles: A28-2B (São Joaquim), A28-3B (Eldorado do

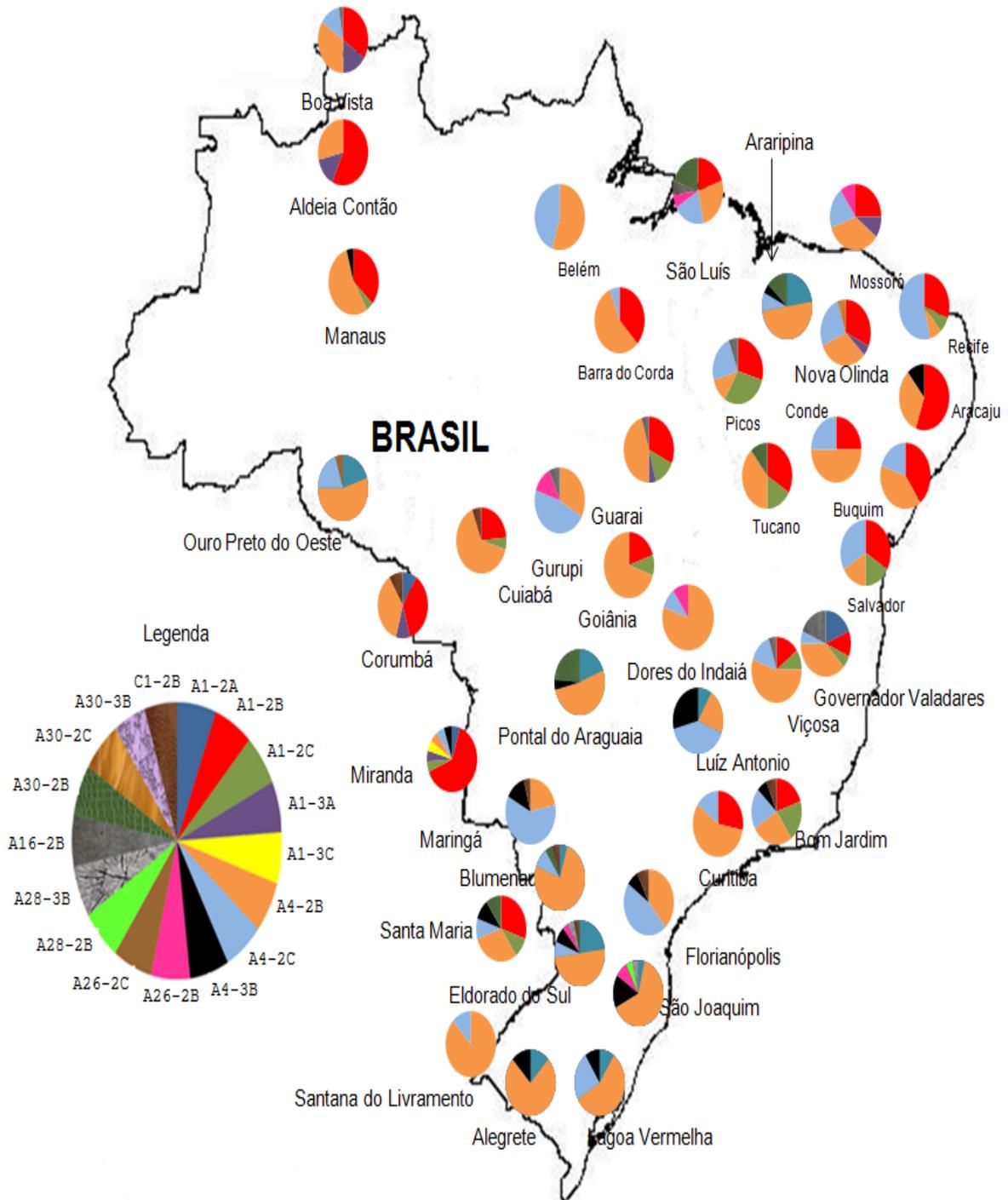
Sul e São Joaquim) e A30-2B (Santa Maria). A cidade com maior número de padrões associados é Miranda, na região do Pantanal do Mato Grosso.

O padrão A1-2C foi encontrado no norte e no sul do país; no entanto, apresenta um aumento em direção ao norte. A1-3A foi encontrado no sudeste e em direção ao norte. A29-2B parece aumentar em direção ao norte, sendo apenas encontrado mais ao sul em Governador Valadares e Viçosa (Sudeste).

O padrão A30-2C foi encontrado somente em Nova Olinda, nordeste do país. O padrão A30-2B foi detectado em três cidades do nordeste (Araripina, São Luís e Tucano), mas também foi identificado em Blumenau (sul). Já o padrão A30-3B foi encontrado apenas no sul (Santa Maria).



**FIGURA 7:** Distribuição geográfica dos haplótipos compostos de COI (em %) em amostras de abelhas Africanizadas de diferentes localidades do Brasil. Conferido



**FIGURA 8:** Distribuição geográfica dos haplótipos associados (COI-COII e COI) nas localidades brasileiras e suas porcentagens relativas.

## 4.5 Dados de Sequenciamento

### 4.5.1 Confirmação dos padrões

Foram seqüenciadas amostras referentes a cada um dos padrões obtidos para a região COI. Na Tabela 4, podemos ver o número de sítios de corte, posição e tamanho dos fragmentos esperados em gel.

O padrão 2 apresentou uma variante (denominada 2') em três amostras provenientes da Itália. Esta variante resulta do deslocamento do sítio de restrição oito pares de bases à frente na sequência nucleotídica do padrão 2.

Os demais padrões apresentaram em gel de agarose 1% o esperado pelas suas respectivas sequências nucleotídicas.

**TABELA 4:** Padrão de sítio de corte para cada um dos padrões visualizados em gel de agarose 1% para a região COI do mtDNA.

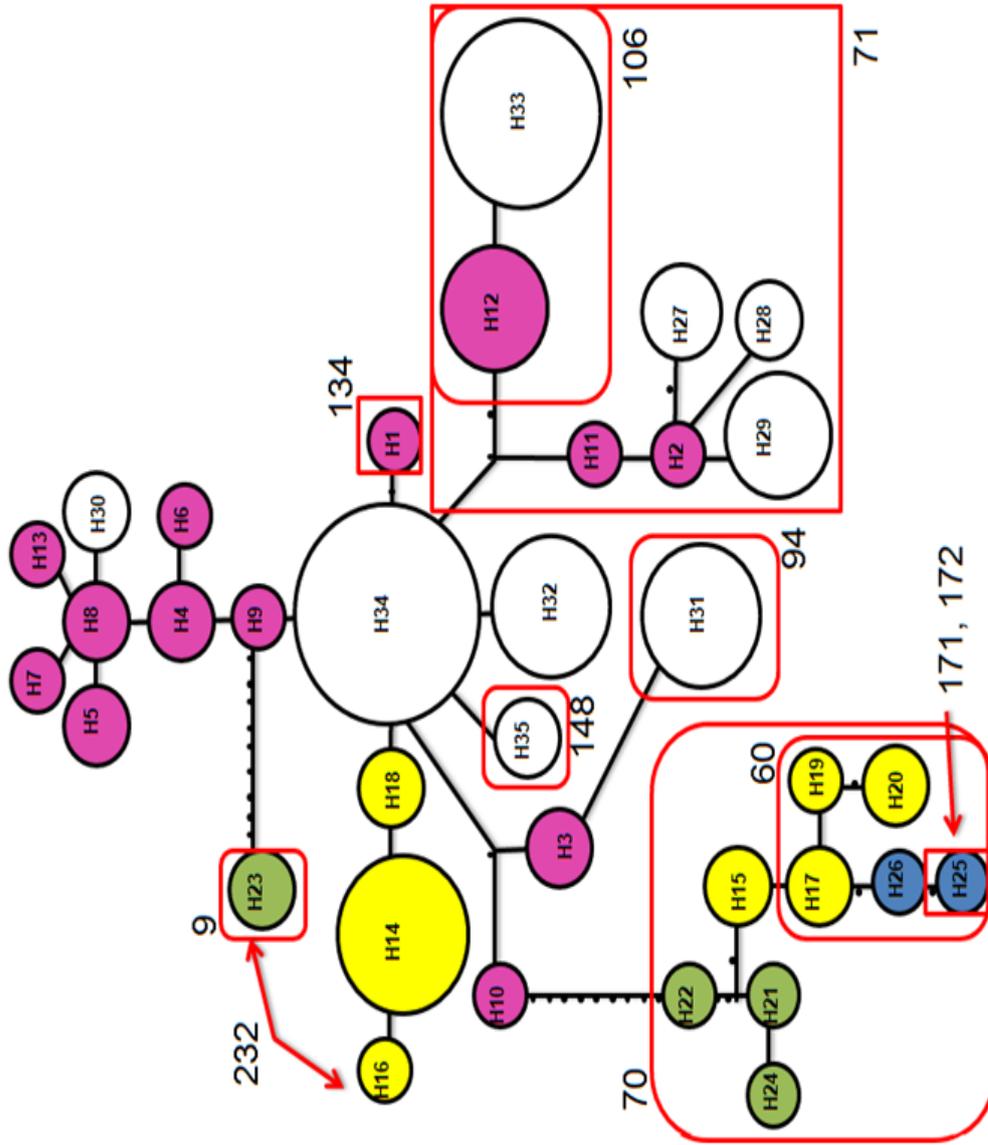
Padrão	Nº de sítios de corte	Posição do corte	Tamanho dos fragmentos (pb)
1 <i>Bcl I</i>	2	436/898	146/436/462
2 <i>Bcl I</i>	3	30/436/898	30/146/406/462
2' <i>Bcl I</i>	3	414/436/898	22/146/414/462
3 <i>Bcl I</i>	4	30/414/436/898	22/30/146/384/462
A <i>Taq I</i>	2	516/783	261/267/516
B <i>Taq I</i>	3	516/539/783	23/244/261/516
C <i>Taq I</i>	4	165/516/539/783	23/165/244/261/351
D <i>Taq I</i>	3	165/516/783	165/261/267/351

### 4.5.2 Rede de haplótipos

A partir das 90 sequências da região COI do DNAmít obtidas, mais a sequência de *A. m. ligustica* publicada por Crozier e Crozier (1993), foi feita uma rede de haplótipos a fim de se determinar as relações entre os haplótipos caracterizados nas análises.

Nesta rede (Figura 9), podemos observar 35 haplótipos distintos. Nove foram encontrados apenas em amostras do Brasil (H27, H28, H29, H30, H31, H32, H33, H34 e H35); um em amostras do Brasil e África do Sul (H3); um em amostras do

Brasil, Portugal e Espanha (H14); oito apenas em amostras da África do Sul (H1, H2, H5, H6, H7, H9, H10, H11), dois apenas em amostras da África do Sul e Quênia (H4 e H8); dois apenas em amostras do Quênia (H12 e H13); um apenas em amostras de Portugal (H16); um em amostras de Portugal e Espanha (H15); quatro apenas em amostras da Espanha (H17, H18, H19 e H20); dois apenas em amostras do Chile (H25 e H26) e quatro apenas em amostras da Itália (H21, H22, H23 e H24). Um dos haplótipos encontrados somente em amostras da Itália engloba a sequência de Crozier e Crozier (1993). Na tabela 5 podemos ver em que países foram observados cada um dos haplótipos e quais padrões para as regiões COI e COI-COII foram apresentados pelas amostras apresentando cada um deles. Nesta tabela, pode-se ver ainda a possível origem dos haplótipos detectados em amostras do Brasil. Essa possível origem foi inferida de acordo com a similaridade apresentada por cada haplótipo do Brasil com os haplótipos caracterizados nas subespécies parentais, conforme a rede haplotípica construída.



**FIGURA 9:** Rede de haplótipos formada pelas 90 sequências obtidas na região COI do mtDNA de amostras do Brasil, África do Sul, Quênia, Chile, Portugal, Espanha e Itália mais a sequência de *A. m. iguistica* publicada por Crozier e Crozier (1993). Os 35 haplótipos são nomeados de H1 a H35. Haplótipos brancos são os que só contêm amostras do Brasil, verdes são amostras de Portugal e Espanha, amarelos amostras de Itália, azuis Chile e cor-de-rosa amostras da África. As setas e quadradinhos em vermelho indicam os haplótipos que contêm cada uma das mudanças de aminoácidos observadas entre as sequências e suas posições. O tamanho de cada haplótipo representa a quantidade proporcional de amostras que o apresentaram. Mais informações sobre cada um dos haplótipos estão contidas na tabela 5.

**TABELA 5:** Haplótipos de COI detectados, procedência geográfica, padrões para a região COI-COII e COI e número de amostras apresentando cada um dos haplótipos. A possível origem foi inferida para haplótipos observados em amostras do Brasil de acordo com suas relações de similaridade com os haplótipos caracterizados nas subespécies parentais, conforme a rede haplotípica construída. País: AF=África do Sul, QU=Quênia, PO=Portugal, ES=Espanha, IT=Itália, CH=Chile e BR=Brasil.

Haplótipo	País	Padrões COI-COII	Padrão COI	Nº de amostras	Possível "origem" do haplótipo
H1	AF	A4	2B	1	
H2	AF	A1	2B	1	
H3	AF, BR	A1, A2	3B	2	<i>A. m. scutellata</i>
H4	AF, QU	A4	2C	2	
H5	AF	A4	2C	2	
H6	AF	A4	2C	1	
H7	AF	A4	2C	1	
H8	AF, QU	A4, A26	2C	2	
H9	AF	A4	2B	1	
H10	AF	A4	3B	1	
H11	AF	A4	2B	1	
H12	QU	A1, A4	2B	5	
H13	QU	A1	2C	1	
H14	PO, ES, BR	A1, A2, A4, A8, A30	2B	7	<i>A. m. iberiensis</i>
H15	PO, ES	A1, A4	1A	2	
H16	PO	A16	2B	1	
H17	ES	?	1A	2	
H18	ES	A1, A2	2B	2	
H19	ES	A1	1D	1	
H20	ES	A1, A8	1D	2	
H21	IT	M7	2'A	1	
H22	IT	M7	2'A	1	
H23	IT	M7	2B	2	
H24	IT	M7	2'A	1	
H25	CH	M4	1A	1	
H26	CH	M4	1A	1	
H27	BR	A1	3A	3	<i>A. m. scutellata</i>
H28	BR	A1	2B	2	<i>A. m. scutellata</i>
H29	BR	A1	2B	5	<i>A. m. scutellata</i>
H30	BR	A1, A30	2C	2	<i>A. m. scutellata</i>
H31	BR	A4, A30	3B	6	<i>A. m. scutellata</i>
H32	BR	A4	2B	6	<i>A. m. iberiensis e A. m. scutellata</i>
H33	BR	A4, A26	2C	9	<i>A. m. scutellata</i>
H34	BR	A4, A26	2B	10	<i>A. m. iberiensis e A. m. scutellata</i>
H35	BR	A4	2B	2	<i>A. m. iberiensis e A. m. scutellata</i>

### 4.5.3 Árvores Filogenéticas

Foram feitas também árvores filogenéticas com a sequência nucleotídica dos 35 haplótipos identificados, utilizando *Melipona bicolor* como grupo externo (Genbank AF370439.1). Essas árvores foram feitas por cinco métodos diferentes (*Maximum likelihood*, *Neighbor-Joining*, Métodos de Evolução Mínima, Máxima Parcimônia e UPGMA), todos eles com um *bootstrap* de 10000 repetições. Devido à alta similaridade entre as diferentes árvores, apresentamos aqui somente a árvore cujas posições de cada haplótipo se repetiu exatamente da mesma forma em três das cinco árvores construídas (métodos: Neighbor-joining, Método de evolução mínima e UPGMA) (FIGURA 10).

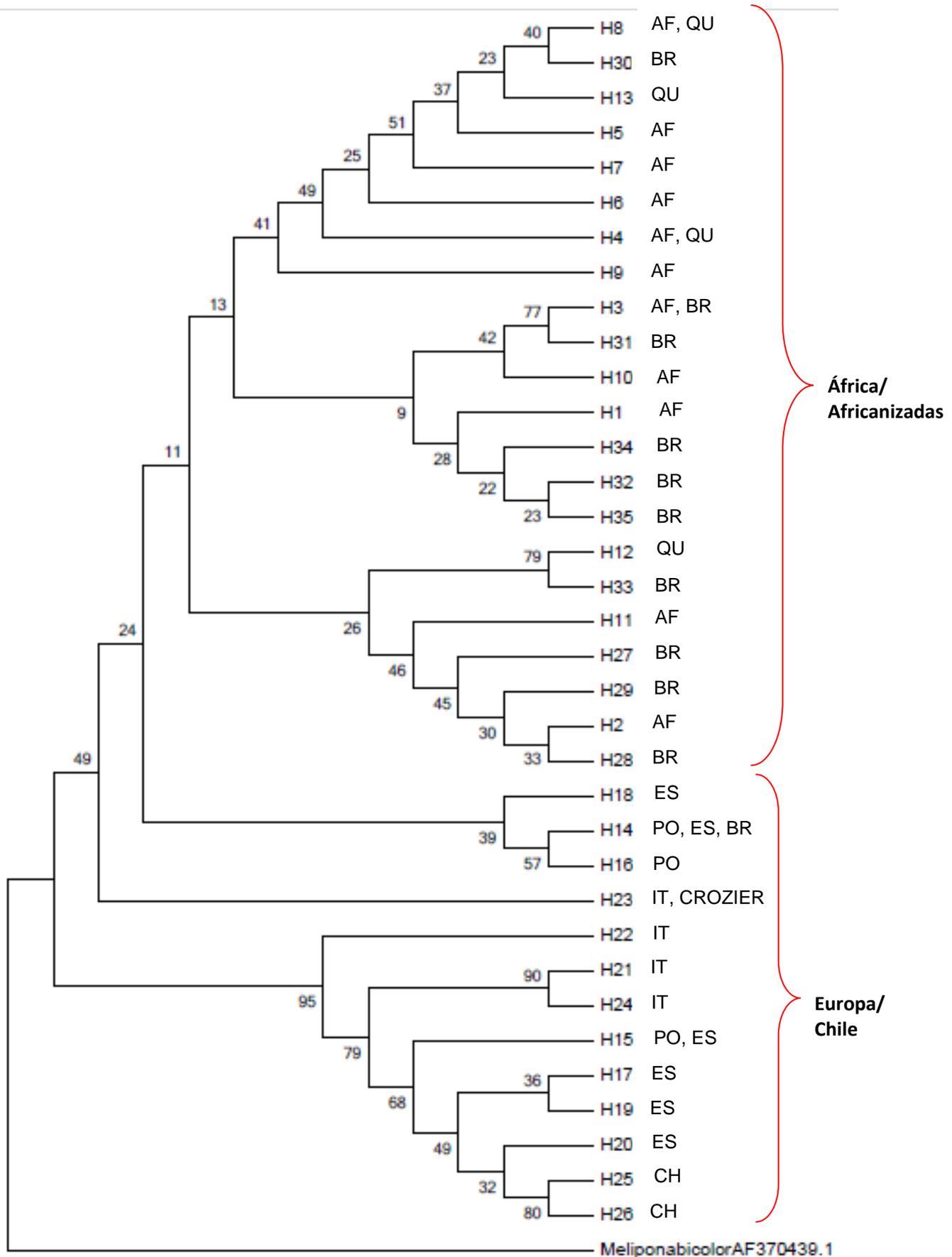
Nesta árvore, podemos observar que há formação de clados separando os haplótipos encontrados em amostras Europeias e do Chile (amostras não africanizadas) dos caracterizados em amostras da África e Brasil (amostras africanizadas). O único haplótipo encontrado no Brasil que está contido no clado das amostras Europeias e do Chile é o H14. Esse é o único haplótipo compartilhado por amostras do Brasil, Portugal e Espanha.

Como esperado, os seis clados apresentados na árvore acompanham a proximidade dos haplótipos na rede filogenética.

No entanto, o baixo *bootstrap* dos ramos não permite inferir com robustez uma origem separada para os haplótipos dos diferentes clados, o que permite apenas estabelecer o grau de similaridade entre estes.

A sequência de *M. bicolor* apareceu em ramo distinto em todas as árvores. O Apêndice 3 mostra a sequência de *M. bicolor* alinhada com a sequência de *A. m. ligustica* (CROZIER e CROZIER, 1993), indicando os sítios de similaridade nucleotídica entre as mesmas.

**FIGURA 10:** Árvore filogenética. AF: África do Sul, QU: Quênia, PO: Portugal, ES: Espanha, BR: Brasil, IT: Itália e CH: Chile.



#### **4.5.4 Sítios polimórficos entre os haplótipos**

Nas sequências obtidas, foram observados 46 sítios mutacionais que deram origem aos 35 haplótipos identificados. Esses sítios estão distribuídos entre os haplótipos encontrados nos diferentes países de acordo com a Tabela 6. Como esperado, os haplótipos presentes em amostras do Brasil são mais similares aos encontrados na África do Sul e Quênia. É de se notar ainda que alguns sítios mutacionais são encontrados exclusivamente em amostras Africanas/africanizadas ou em amostras de origem Européia e que a maioria dos polimorfismos nucleotídicos não resulta em mudança de aminoácidos na sequência.



#### 4.5.5 Polimorfismos protéicos entre os haplótipos

O fragmento do gene COI amplificado corresponde a 348 aminoácidos da sequência da proteína. Não foram observados *stop códons* nas 35 sequências nucleotídicas caracterizadas. Ao comparar estes haplótipos entre si, foram identificados 11 sítios polimórficos para a sequência de aminoácidos codificada (Tabela 7). Esses polimorfismos aparecem entre o aminoácido 9 e o aminoácido 232 do fragmento amplificado, correspondentes aos aminoácidos 47 e 270 da sequência completa de COI de *A. m. ligustica* (CROZIER e CROZIER, 1993). É de se observar que há alterações de aminoácidos exclusivas de amostras Africanas/africanizadas ou de amostras Européias.

A Tabela 8 mostra as alterações de aminoácidos ocorridas e suas respectivas propriedades físicoquímicas. Dentre as sequências de aminoácidos dos 35 haplótipos identificados, foram obtidas 13 sequências proteicas distintas, denominadas A1 - A13. Na Tabela 9, a associação entre haplótipos e sequências de aminoácidos é ilustrada.

A proteína codificada pelo gene COI de insetos foi dividida em quatro domínios estruturais – a molécula contém 12 hélices transmembrana (M1-M12), seis loops externos (E1-E6), 5 loops internos (I1-I5) e as regiões C- e N- terminais. Lunt et al (1996) sequenciaram o gene COI completo de *Chorthippus parallelus*, um grilo da ordem Orthoptera, a fim de mapear a posição relativa destes domínios estruturais na sequência de aminoácidos.

Um alinhamento feito entre a sequência de *C. parallelus* e as nossas 13 diferentes sequências de aminoácidos (Apêndice 3) nos permitiu fazer inferências acerca dos sítios mutacionais polimórficos detectados e os domínios envolvidos, de maneira a inferir possíveis alterações funcionais daí decorrentes. As nossas sequências contêm 348 aminoácidos contra os 495 aminoácidos da sequência completa de *C. parallelus* devido ao uso de pares de primers distintos utilizados para amplificação nos dois estudos. Por esta razão, nossas sequências se iniciam na posição 40 e terminam na posição 387 da sequência de aminoácidos de *C. parallelus*.

Podemos ver que as mudanças pontuais observadas entre as sequências de aminoácidos (Tabela 10) são encontradas em três loops externos (E1, E2 e E3), duas hélices transmembrana (M3 e M5) e um loop interno (I2).

**TABELA 7:** Polimorfismos protéicos entre os haplótipos da rede. As linhas representam cada um dos haplótipos (numerados de H1 a H35) e as colunas representam cada um dos polimorfismos protéicos encontrados, a legenda de cada coluna representa a posição da sequência de aminoácidos onde ele é encontrado e o aminoácido consenso para essa posição. Os haplótipos em cor-de-rosa são os encontrados em países africanos, os em amarelo Portugal e Espanha, em verde Itália, em azul Chile e em branco Brasil. O haplótipo H3 (amostras da África) e o H14 (amostras de Portugal e Espanha) é encontrado também no Brasil.

	9N	60I	70F	71M	94A	106A	134F	148V	171F	172D	232G
H1	.	.	.	.	.	.	L	.	.	.	.
H2	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.
H3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H11	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.
H12	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.
H13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H15	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.
H16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R
H17	.	V	L	.	.	.	.	.	.	.	.
H18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H19	.	V	L	.	.	.	.	.	.	.	.
H20	.	V	L	.	.	.	.	.	.	.	.
H21	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.
H22	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.
H23	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R
H24	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.
H25	.	V	L	.	.	.	.	.	Y	V	.
H26	.	V	L	.	.	.	.	.	.	.	.
H27	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.
H28	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.
H29	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.
H30	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H31	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
H32	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H33	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.
H34	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H35	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.

**TABELA 8:** Sítios mutacionais polimórficos em COI de *Apis mellifera* que resultaram em substituição de aminoácidos na cadeia polipeptídica correspondente. A tabela indica ainda se a substituição resulta em alteração de propriedades físicoquímicas na molécula.

Posição	Substituição	Propriedade
9	N → S	Polar → neutro
60	I → V	Apolar
70	F → L	Apolar
71	M → T	Apolar → Polar neutro
94	A → T	Apolar → Polar neutro
106	A → T	Apolar → Polar neutro
134	F → L	Apolar
148	V → G	Apolar
171	F → Y	Apolar Polar → neutro
172	D → V	Polar ácido → Apolar
232	G → R	Apolar Polar → básico

**TABELA 9:** Descrição das 13 seqüências de aminoácidos correspondentes aos 35 haplótipos de COI de *Apis mellifera*. A origem geográfica das amostras onde estes haplótipos foram caracterizados é também indicada. AF: África do Sul, QU: Quênia, PO: Portugal, ES: Espanha, BR: Brasil, IT: Itália e CH: Chile.

Seqüência	Haplótipos	Países
A1	H1	AF
A2	H2	AF
A3	H3, H10, H13, H14, H18, H30, H32, H34.	AF, QU, PO, ES e BR
A4	H11, H27, H28, H29	AF e BR
A5	H12, H33	QU e BR
A6	H15	PO e ES
A7	H16	PO
A8	H17, H19, H20, H26	ES e CH
A9	H21, H22, H24	IT
A10	H23	IT
A11	H25	CH
A12	H31	BR
A13	H35	BR

**TABELA 10:** Sítios de substituição de aminoácidos nas sequências de COI de *A. mellifera*. Suas posições em nosso fragmento, classes estruturais a que pertencem na sequência de *C. parallelus* e países onde foram encontradas estas variantes estão indicados. AF: África do Sul, QU: Quênia, PO: Portugal, ES: Espanha, BR: Brasil, IT: Itália e CH: Chile. Marcações: Amarela = substituição de aminoácido apolar para polar neutro; vermelha = polar ácido para apolar; verde = apolar para polar básico. Aminoácidos sem marcação representam substituições de aminoácidos de mesma propriedade físicoquímica. A cada posição em nosso fragmento deve ser acrescido 40pb para se conseguir a posição do mesmo na sequência de *C. parallelus*.

Sítio em <i>A. mellifera</i>	Domínio	Países
9	E1	IT
134	I2	AF
94 e 148	E2 e M5	BR
171 e 172	E3	CH
60	M3	ES e CH
70	M3	PO, ES, IT e CH
232	I3	PO e IT
71	M3	AF, QU e BR
106	E2	QU e BR

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Fragmento amplificado e padrões observados

De acordo com a sequência do DNA mitocondrial de *Apis mellifera ligustica* descrita por Crozier e Crozier (1993), são esperados no fragmento COI amplificado três sítios de corte para *Bcl* I, gerando 4 fragmentos de 462, 406, 146 e 30 pares de bases. Para a nuclease *Taq* I, espera-se três sítios de corte, gerando 4 fragmentos com tamanhos de 516, 261, 244 e 23 pares de bases. Os padrões *Bcl* 2 e *Taq* B estão de acordo com esta descrição. Esse fato é corroborado por predições de sítios de corte feitas na sequência de Crozier e por observação direta dos padrões obtidos após eletroforese. Uma de nossas amostras, originária da Itália (haplótipo H23), apresentou sequência idêntica à reportada por Crozier e Crozier (1993).

A ocorrência do padrão compósito 2B é frequentemente detectado em amostras de todos os países analisados, o que indica que ele possa ser considerado o padrão ancestral entre *A. m. scutellata*, *A. m. iberiensis* e *A. m. ligustica* e não específico de *A. m. ligustica*, mesmo sendo aquele apresentado pela sequência de *A. m. ligustica* (CROZIER e CROZIER, 1993).

O padrão compósito 2A se mostrou presente em vários padrões associados encontrados tanto em amostras de países africanos como em amostras de países europeus. No entanto, há apenas um único padrão associado presente no Brasil - A1-2A, mostrando que aqui o padrão compósito 2A possivelmente tenha sido introduzido com os enxames africanos.

Collet et al. (2006) encontraram em Portugal e na Espanha padrões típicos da linhagem M, como esperado (fig. 5). Em Portugal as amostras com os padrões M4, M7 e M8 apresentaram também o padrão 2B (como todas as amostras daquele país). Já na Espanha, os padrões M4, M6 e M8 aparecem juntamente com os padrões 1A, 2A e 2B. Esses resultados apontam mais uma vez para a presença ubíqua dos padrões 2A e 2B.

O padrão 2', somente encontrado na Itália, não é distinguível nos géis do padrão 2, o que pode ser explicado pelo fato do gel de agarose não ser efetivo em

mostrar fragmentos menores ou iguais a 146pb e em diferenciar fragmentos com pequenas diferenças de tamanho. Dessa maneira, os fragmentos menores dos dois padrões não foram visualizados no gel e a diferença de 8pb a mais no maior fragmento do padrão 2' não foi detectada nos géis.

As demais diferenças eletroforéticas entre os padrões se devem a diferenças na posição e número dos sítios de corte. Não foram observados padrões que possam ser explicados por diferenças nucleotídicas que afetam a conformação da molécula fazendo com que mesma posição e número de sítios de corte similares apresentem diferentes padrões no gel, como observado por Ferreira et al. (2008) para a região mitocondrial citocromo b.

O padrão 2' foi encontrado apenas em amostras da Itália, o padrão D somente na Espanha e os padrões associados A28-3B, A30-2C, A1-3C, A30-3B e A28-2B foram encontrados apenas no Brasil. No caso da Itália, esse fato pode ser explicado pela grande diferença entre seus haplótipos e os haplótipos do restante dos países analisados. O padrão 2' é o que apresenta a menor diferença em comparação ao padrão tido como ancestral; assim, pode-se inferir que este padrão deve ter se originado na Europa e se manteve restrito a essa região devido ao não remanejamento do mesmo para fins econômicos, como aconteceu com os padrões africanos.

O fato de encontrarmos um padrão restrito à Espanha já era esperado, visto que dados alozímicos e mitocondriais apontam esse país como sendo uma região de contato secundário entre diferentes subespécies formando uma zona híbrida intra-específica entre linhagens africanas e oeste da Europa (SMITH et al, 1991).

Essa zona de hibridização aumenta a variabilidade dentro da Espanha, cujas amostras são da mesma subespécie daquelas encontradas em Portugal (*A. m. iberiensis*). Isso explica o fato de que nossas amostras de Portugal apresentam apenas o padrão compósito ancestral, enquanto as amostras da Espanha apresentam a maior variabilidade entre eles.

Segundo Smith e Glenn (1995) o número de alelos e sua alta frequência relativa pode ser uma característica única de populações ibéricas. Isso foi verificado em nossas amostras da Península Ibérica que apresentam muito mais padrões

associados do que os países africanos. Como o Brasil também é uma área de contato entre subespécies, o alto número de padrões associados em nosso país pode ser explicado da mesma maneira.

A região COI de *Apis mellifera* apresenta o maior número de NUMTs já documentados, apesar desse fenômeno geralmente ser mais comum para regiões não gênicas (BEHURA, 2007). As nossas análises não apontaram para a presença de NUMTs no fragmento amplificado. No entanto, dentre os 1044pb do fragmento, há uma região nuclear que apresentou 713pb de correspondência, com *GAPs*.

## 5.2 Distribuição geográfica dos padrões

Os dados de Collet et al (2006) indicam que o padrão COI-COII A1 teve sua origem em *A. m. scutella*, mas indicam também que esse padrão é encontrado em populações ibéricas em pequenas proporções. As conclusões desse estudo apontam que: ...“o padrão A1 das colônias americanas não teria origem africana (via *scutellata*) se tal mitótipo apresentado pelas colônias localizadas mais ao sul do continente fosse distinto do que se estabeleceu nas populações situadas em direção ao norte...”.

O padrão A1 nos países analisados (figs. 5 e 6) se mostram associados a 1A, 1B e 1D somente na Espanha e não aparece em nenhuma amostra do Chile. O padrão A1-2B aparece em todos os outros países, exceto Uruguai, e é o único que contém A1 em Portugal, Colômbia, Costa Rica e Honduras. No Uruguai só foi encontrado A1-2A. Nos países africanos encontramos A1 associado a 2B, 2C e 3B. Os países com padrões associados A1 em proporções mais próximas são Brasil, Argentina e a Venezuela, todas amostras africanizadas.

Assim, não foi observada uma diferenciação do padrão A1 em amostras do norte e do sul do continente, não sendo possível diferenciar a origem dos padrões A1 das amostras do norte e sul. Não foi observada distribuição clinal em nenhum dos padrões compósitos.

Collet et al. (2006) aponta que o padrão A1 tende a aumentar de frequência para o norte do país, enquanto que o padrão A4 tende a aumentar em direção ao sul. Dos padrões associados contendo A4, somente A4-3B parece acompanhar esse aumento, os demais são encontrados em todo o território. Os padrões A1-2A e A1-3C que são encontrados apenas no Brasil não acompanham esse aumento para o norte. A1-3C é encontrado em apenas uma amostra da cidade de Miranda (centro-oeste do Brasil) e em mais nenhum país analisado e A1-2A mostra um leve aumento em direção ao sul no Brasil e é encontrado na Argentina, Uruguai e Venezuela.

Em nossas análises, verificamos que o maior número de padrões associados é encontrado nas cidades de Santa Maria, Eldorado do Sul e São Joaquim, todas ao sul do Brasil e sendo as mais frias do país, além de Miranda, no pantanal do Mato Grosso.

Em 1989, início do processo de africanização no México, a maioria das colônias desse país parecia ter mtDNA europeu, mas exibiam baixos níveis de DNA nuclear europeu. Isso mostra que elas começaram a se tornar africanizadas através do fluxo gênico de zangões europeus. Algumas colônias já começavam a apresentar um mtDNA africano, mostrando que elas seriam maioria ao longo do tempo devido a vários fatores que fazem com que colônias com mtDNA africano enxameiem mais rapidamente. Nessa data, há a ausência de mtDNA europeu em colônias manejadas da Venezuela, ou seja, as amostras daquele país já haviam sido afetadas pelo processo de africanização (GLEN e MURALIDHARAN, 1989).

Da mesma forma como ocorreu no México, as nossas amostras da Costa Rica e Honduras, que foram coletadas em estágios iniciais do processo de africanização, apresentaram mtDNA mais similar aos de amostras européias.

Uma maior diversidade haplotípica é observada na África, se considerarmos a quantidade de haplótipos diferentes encontrados em tão poucas amostras analisadas. Isso corrobora a hipótese de Ruttner et al. (1978) que aponta a África como epicentro da evolução da espécie.

Amostras de mesma subespécie amostradas em diferentes países (*A. m. iberiensis* de Portugal e Espanha e *A. m. scutellata* da África do Sul e Quênia) apresentam uma grande diferença entre os padrões compósitos e associados

observados. Isso pode ser explicado pela diferenciação única das amostras de cada país devido às condições diferentes que os organismos de cada país experimentam ou ainda um viés decorrente do baixo n amostral de cada subespécie.

### 5.3 Origem dos padrões encontrados no Brasil.

Considerando os padrões compósitos encontrados no Brasil (1A, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B e 3C), as três principais subespécies que deram origem às abelhas africanizadas e os países em que tais subespécies se distribuem (Portugal e Espanha; África do Sul e Quênia; Itália), é possível, tentativamente, estabelecer as relações entre eles e a possível origem geográfica dos mesmos.

Sendo assim, podemos ver que os padrões compósitos contendo o padrão *TaqI* A parecem ter uma origem europeia por serem encontrados em maior quantidade em países europeus, no Chile (não africanizado) e em alguns outros da América. Da mesma forma, os padrões compósitos contendo os padrões *TaqI* B e C parecem ter origem africana por serem encontrados mais comumente na África do Sul, Quênia e em países da América do Sul cujas populações de *Apis mellifera* são fortemente africanizadas.

Quando consideramos os padrões associados encontrados no Brasil (COI-COII e COI), verificamos que a possível origem dos padrões *TaqI* B e C passa ser ser uma origem africana . As exceções são aqueles que contêm os padrões compósitos 2B, que parecem ter uma influência tanto europeia quanto africana, e os padrões compósitos encontrados apenas no Brasil.

No entanto, quando olhamos para a rede de haplótipos, o cenário muda. Como o seqüenciamento é uma técnica mais refinada, capaz de reconhecer todos os sítios mutacionais, verificamos que as indicações quanto à origem dos padrões apenas considerando os dados de restrição não se sustentam. A origem europeia dos padrões *TaqI* A e a origem africana dos padrões *TaqI* B e C (com exceção de 2B) propostas podem não ser real, mas uma limitação da técnica de PCR-RFLP que

só acessa polimorfismo no sítio de corte da endonuclease utilizada e não na sequência completa do amplificado, como é o caso do seqüenciamento.

Quando comparamos as relações entre os haplótipos encontrados no Brasil e os haplótipos detectados em amostras européias e africanas podemos, tentativamente, inferir a origem dos mesmos. Dos 17 padrões associados encontrados no Brasil, 11 foram seqüenciados. A tabela 11 mostra as inferências quanto à origem desses padrões de acordo com a proximidade dos haplótipos na rede cujas amostras os apresentaram. Vale ressaltar que os padrões associados que não foram seqüenciados (A1-2C, A1-3C, A29-2B, A28-2B, A1-2A e C1-2B) correspondem a apenas 6,8% do total de amostras analisadas.

Considerando a árvore filogenética consenso apresentada, podemos verificar que os valores de *bootstrap* apresentados nos dizem que a região amplificada não é a mais indicada para acessar a origem dos padrões; no entanto, pode constituir um indicativo do grau de similaridade entre os haplótipos. Neste sentido, é possível observar a formação de clados separando amostras africanas/africanizadas daquelas européias.

Com isso, podemos inferir a origem dos padrões encontrados no Brasil devido a similaridade apresentada entre eles e os haplótipos encontrados em amostras da Europa ou África, mas não podemos afirmar com certeza. Nenhum padrão apresentou uma origem inferida como sendo *A. m. ligustica*. Nenhum dos padrões tidos como tendo uma origem em *A. m. scutellata* (africana) foi encontrado em países europeus ou no Chile (não africanizado).

Outro ponto interessante é o fato da maioria dos haplótipos encontrados no Brasil terem uma alta similaridade nucleotídica com os haplótipos encontrados em amostras africanas, ainda que somente um haplótipo tenha sido encontrado em amostras da África e do Brasil. Este fato inesperado pode ser resultado do bom número de amostras originárias do Brasil, mas do baixo número de colônias amostradas da África.

**TABELA 11:** Inferências acerca da origem dos padrões associados encontrados no Brasil com as subespécies envolvidas no processo de africanização, de acordo com a rede de haplótipos.

<b>Padrão associado</b>	<b>Origem inferida</b>
A4-2C, A26-2C, A4-3B, A28-3B, A30-2C, A30-3B e A1-3A	<i>A. m. scutellata</i>
A30-2B	<i>A . m. iberiensis</i>
A26-2B, A1-2B e A4-2B	<i>A. m. iberiensis</i> e <i>A. m. scutellata</i>

#### 5.4 Mutações nucleotídicas e alterações protéicas nos haplótipos

Dentre os 46 sítios mutacionais responsáveis pelos 35 haplótipos encontramos aqueles exclusivos de amostras européias e de países não-africanizados ou de amostras africanas ou africanizadas.

Os haplótipos encontrados em amostras da Europa e do Chile são os mais diferentes dos encontrados em amostras do Brasil; no entanto, o polimorfismo da posição 691 é encontrado somente na Itália e no Brasil. Como a rede de haplótipos parece indicar que nenhum haplótipo presente no Brasil teve origem a partir de *Apis m. ligustica* e como esse polimorfismo está presente nos haplótipos H23 (Itália) e H28 (Brasil) que estão distantes na rede, pode-se concluir que esta mutação surgiu independentemente em amostras dos dois países, como um exemplo de homoplasia.

Os haplótipos presentes no Chile são tão similares aos haplótipos encontrados em amostras de Portugal e Espanha quanto aos encontrados em amostras da Itália, corroborando dados da literatura que apontam que as amostras do Chile não são africanizadas.

Sete dentre os sítios mutacionais são encontrados somente em amostras da Itália (posições 26, 27, 60, 162, 753, 813 e 987) sendo, portanto específicos de *A. m. ligustica*. O fato desses sítios não serem encontrados em amostras do Brasil e da quantidade de sítios específicos para *A. m. ligustica* evidencia mais uma vez a grande diferença entre as amostras da Itália e as dos demais países.

Os sítios mutacionais 694 e 765 são encontrados, respectivamente, em amostras de Portugal e Itália e em amostras da África do Sul e Itália, não sendo específicas para qualquer país ou subespécie. Os haplótipos que apresentam esses sítios mutacionais se mostram distantes na rede; este fato nos diz que essas mutações são exemplos de homoplasias.

Um sítio mutacional é encontrado apenas em amostras da Espanha (posição 177), três deles somente em amostras do Chile (512, 515 e 975) e quatro deles somente em amostras do Brasil (280, 443, 993 e 1011). Possivelmente, trata-se de mutações específicas de populações que se diferenciaram em diferentes ambientes.

Quatro sítios são encontrados apenas em amostras de países africanos (posições 139, 402, 546 e 966) e dois são encontrados apenas em amostras de Portugal e na Espanha (463 e 648). Esses polimorfismos parecem ser típicos de *A. m. scutellata* e de *A. m. iberiensis*, respectivamente.

Dois sítios (540 e 996) são encontrados em amostras de Portugal, da Espanha, Itália, Chile e Brasil, sugerindo que são sítios mutacionais característicos de amostras européias, da mesma forma que o sítio polimórfico 178, somente encontrado em amostras da Espanha e Chile.

O sítio mutacional 727 foi encontrado apenas em amostras da África do Sul, Quênia e Brasil, enquanto mutações nas posições 212, 642 e 741 foram observadas somente em amostras da África do Sul e Brasil e na posição 316 somente em amostras do Quênia e Brasil. Estas evidências sugerem uma origem *A. m. scutellata* para os mesmos.

Já os sítios mutacionais das demais posições são encontrados em amostras de todas as subespécies analisadas sendo, portanto polimorfismos ancestrais.

Levando em consideração as sequências de aminoácidos no fragmento analisado, temos que o polimorfismo na posição do aminoácido 9 só é observado em um haplótipo encontrado em amostras da Itália e o referente à posição 134 somente em um haplótipo encontrado em amostras da África do Sul. Sendo, portanto, exclusivos de *A. m. ligustica* e de *A. m. scutellata* respectivamente.

Os referentes às posições 94 e 148 só foram visualizados em um haplótipo cada, encontrados em amostras do Brasil. O mesmo acontece com os polimorfismos nas posições 171 e 172 que foram observados cada um em um haplótipo encontrado em amostras do Chile, separadamente.

O polimorfismo na posição 71 foi observado em haplótipos encontrados em amostras da África do Sul, Quênia e Brasil e o da posição 106 em haplótipos encontrados em amostras do Quênia e do Brasil indicando que esses são exclusivamente africanos e que foram introduzidos no Brasil com o processo de africanização. Outro dado que aponta para essa conclusão é o fato dos polimorfismos nessas posições serem encontrados em haplótipos que formam clados na rede apresentada.

Os polimorfismos protéicos das posições 60 e 70 também são apresentados por haplótipos europeus que formam um clado na rede apresentada mostrando a relação entre a presença desse polimorfismo e a relação de ancestralidade entre eles. O polimorfismo protéico na posição do aminoácido 232 é o único que parece ser uma homoplasia, pois é encontrado no H23 (Itália) e no H16 (Espanha) que se mostram distantes na rede.

Isso mostra também que mesmo havendo muitas diferenças entre os padrões compósitos das amostras de *A. m. scutellata* provenientes da África do Sul e do Quênia, as diferenças protéicas entre os haplótipos encontrados em amostras desses países não se mostram tão pronunciadas como quando se olha para os polimorfismos nucleotídicos. As diferenças quanto a sítios mutacionais entre as amostras de *A. m. iberiensis* de Portugal e Espanha também se mostram praticamente inexistentes quando consideradas as diferenças entre as cadeias de aminoácidos. Assim, as diferenças nucleotídicas acumuladas em diferentes populações dentro das subespécies analisadas pouco alteram a estrutura primária da proteína resultante.

Outro dado interessante merece ser ressaltado. Nas amostras de Portugal e Espanha, os polimorfismos protéicos se encontram nas posições 60, 70 e 232; em amostras da Itália, nas posições 9, 60, 70 e 232; em amostras do Chile, nas posições 60, 70, 171, 172 e 232. Como se pode notar, as substituições ocorrem no início e ao final da sequência de aminoácidos analisada. Todos esses países contêm

amostras de origem européia. Já na África do Sul, Quênia e no Brasil, os polimorfismos se concentram mais ao centro da sequência, se estendendo da posição 71 a posição 148.

Dos três polimorfismos protéicos caracterizados em amostras de Portugal e Espanha quando comparados à sequência consenso, podemos ver que apenas um possui substituição de aminoácido de categoria diferente (posição 232). Considerando os polimorfismos visualizados em haplótipos encontrados em amostras do Chile, verificamos que dos cinco, três apresentam mudança de categoria (posições 171, 172 e 232). Dos haplótipos encontrados em amostras da Itália, somente um dos três polimorfismos mostra substituição por aminoácido de categoria distinta (posição 232). Para as amostras da África do Sul e Quênia, vemos que os três polimorfismos presentes apresentam aminoácidos de propriedades distintas (posições 71, 106 e 134). O mesmo acontecendo com os quatro polimorfismos encontrados em amostras do Brasil (posições 71, 94, 106 e 148).

É de se notar que substituições por aminoácidos de categorias distintas ocorrem somente de apolar para polar neutro em sequências de amostras da África do Sul, Quênia e Brasil, mais similares a *A. m. scutellata*; de apolar para polar neutro e de polar ácido para apolar (um ao lado do outro da sequência) somente em uma sequência obtida em amostra do Chile e de apolar para polar básico em uma sequência obtida em uma amostra de Portugal e uma amostra da Itália (Tabela 12). As demais substituições ocorridas são por aminoácidos similares quanto à sua hidrofobicidade.

Os polimorfismos que resultam em substituição de aminoácidos de hidrofobicidade diversa e, portanto, constituindo mudanças mais significativas, se encontram mais ao centro da sequência de aminoácidos obtidas e se concentram mais em amostras da África do Sul, Quênia e Brasil.

É importante enfatizar que nem todos os haplótipos encontrados em amostras da África, Europa ou do Brasil apresentam os padrões polimórficos aqui apontados como sendo específicos de cada uma das subespécies. O haplótipo H3, presente em amostras da África do Sul e Brasil, além do haplótipo H14, presente em amostras de Portugal, Espanha e Brasil e mais 12 haplótipos encontrados em amostras dos três continentes, apresentam a sequência consenso de aminoácidos.

Essas mudanças pontuais observadas entre as sequências de aminoácidos são encontradas em três classes estruturais diferentes codificadas pela região COI, sendo três loops externos (E1, E2 e E3), duas hélices transmembrana (M3 e M5) e um loop interno (I2), considerando as classes estruturais reportadas na sequência de COI de Lunt et al. (1996). De acordo com esse autor, estes diferentes domínios estruturais onde os polimorfismos ocorrem contidos não apresentam função essencial para a proteína resultante.

O polimorfismo em I2 só é encontrado em amostras da África, parecendo ser então específico de *A. m. scutellata*. Os polimorfismos em M3 (sítio 71 de nossas sequências) e E2 (sítio 106 de nossas sequências) aparecem tanto em amostras de países africanos como em amostras do Brasil, sendo considerados, portanto polimorfismos originados na África e vindos para o Brasil durante o processo de africanização.

Os polimorfismos em M3 (sítio 60 de nossas sequências) e I3 são encontrados em amostras da Espanha e do Chile e em amostras de Portugal e Espanha, respectivamente, indicando que são característicos de *A. m. iberiensis*. Já o polimorfismo em M3 (sítio 70 de nossas sequências) é encontrado em amostras de Portugal, Espanha, Itália e Chile, indicando uma origem européia para o mesmo, mas não específica de uma subespécie. Os polimorfismos em E2 e M5 são encontrados apenas em amostras do Brasil e em E3 somente em amostras do Chile. Parecem ser exemplos de polimorfismos específicos de subespécies africanas e européias, respectivamente, introduzidas em outros lugares que não sua distribuição original. O haplótipo H23 foi apresentado por uma amostra da Itália e pela sequência de *Apis mellifera ligustica* (CROZIER e CROZIER, 1993). Na rede de haplótipos podemos observar que o mesmo se mostra a nove pontos mutacionais de um haplótipo encontrado na África do Sul (H9) e distante das demais amostras da Itália.

Quando olhamos para os pontos mutacionais nucleotídicos e de aminoácidos vemos que esse haplótipo é realmente bem diferente daqueles apresentados pelas demais amostras da Itália sequenciadas, mas, ainda assim, mais parecido com os pontos mutacionais apresentados por haplótipos encontrados em amostras européias do que africanas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos dados mostraram que a simples associação de padrões de restrição não se constituiu em meio seguro para se inferir a origem das linhagens mitocondriais em populações africanizadas.

No entanto, foi possível inferir a similaridade com *A. m. iberiensis* ou *A. m. scutellata* de 11 dos 17 padrões associados encontrados no Brasil. Ainda que a árvore filogenética não separou os haplótipos europeus e africanos em ramos bem definidos (*bootstrap* baixo), os nossos resultados apontam para uma origem em *A. m. scutellata* para os padrões associados A4-2C, A26-2C, A4-3B, A28-3B, A30-2C, A30-3B e A1-3A, uma origem em *A. m. iberiensis* para A302B e uma origem dupla para os padrões associados A26-2B, A1-2B e A4-2B. O padrão associado A4-2B é tido como o padrão ancestral, assim como o haplótipo COI 34 e sua correspondente sequência de aminoácidos A3.

Não foi detectado um padrão de distribuição clinal norte/sul no Brasil na região COI em amostras africanizadas como o observado para a região intergênia COI-COII. Não foi possível definir uma origem diferente de *A. m. scutellata* para os padrões A1 (COI-COII, COLLET et al, 2006) encontrados no Brasil.

Nossas amplificações mostraram-se livres de NUMTs, mesmo sendo a região COI de *Apis mellifera* a região com maior número de NUMTs documentada.

Diferenças específicas na sequência nucleotídica e de aminoácidos entre amostras Africanas/africanizadas e amostras européias foram caracterizadas. No entanto, essas mudanças não parecem afetar a função da proteína resultante, visto que se encontram em domínios que não afetam diretamente a função catalítica da enzima.

Essas diferenças específicas entre amostras africanas e européias indicam que talvez haja também diferenças específicas dentre as diferentes subespécies quando levado em consideração o gene COI como um todo. Desta forma, os dados preliminares aqui obtidos justificam que estudos subsequentes sejam realizados em toda a extensão do gene em amostras do maior número de subespécies, pois eles

certamente revelarão eventos históricos específicos ocorridos durante a evolução do gene nesta espécie.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, B. et al. Dynamics of plant mitochondrial genome: model of a three level selection process. *Genetics*, v. 144, p. 369-382, 1996.

BEHURA, S. K. Analysis of nuclear copies of mitochondrial sequences in honeybee (*Apis mellifera*) genome. *Molecular Biology Evolution*, v. 24, n. 7, p. 1492–1505, 2007.

BRAND, D. D. The Honey Bee In New Spain and Mexico. *Journal of Cultural Geography*, p. 71-82, 1984.

CARPENTER, F. M.; HERMANN, H. R. Antiquity of sociality in insects. In: HERMANN, H.R. (Ed.). *"Social Insects"*. New York: Academic Press, 1979. v.1, p.81-89, 1979.

CLARY, D.O.; WOLSTENHOLME, D.R. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization and genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, v.22, p.252-279. 1985.

COLLET, T. et al. Genetic structure of Africanized honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI-COII patterns. *Heredity*, v.97, p. 329-335. 2006.

COLLET, T. *Estrutura genética das populações de abelhas africanizadas (Apis mellifera L.) do Brasil determinada por meio de polimorfismos do DNA mitocondrial*. 2004. 67p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

COLLET, T. *Estrutura Genética das populações de abelhas africanizadas (Apis mellifera L.) e suas relações com as raças parentais determinadas por meio de análises de microssatélites*. 2009. 64p. Tese (Doutorado em Genética e evolução) – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

CROZIER, R.H.; CROZIER, Y.C. The mitochondrial Genome of the Honeybee *Apis mellifera*: Complete Sequence and Genome Organization. *Genetics Society of America*, v. 133, p.97-117, 1993.

DE LA RÚA, P.; SERRANO, J.; GALLÍAN, J. Mitochondrial DNA variability in the Canary Islands honeybees (*Apis mellifera* L.). *Molecular Ecology*, v.7, p. 1543-1547, 1998.

DE LA RÚA, P. et al. mtDNA variation in *Apis cerana* populations from the Philippines. *Heredity*, v.84, p.124-130. 2000.

DEL LAMA, M.A. et al. Hexokinase polymorphism in *Apis mellifera* and its use for Africanized honeybee identification. *Revista Brasileira de Genética*, v.11, p.287-297, 1988.

DEL LAMA, M.A. et al. Genetic differentiation estimated by isozymic analyses of Africanized bee populations from Brazil and from Central America. *Apidologie*, v.21, p. 271-280, 1990.

DINIZ-FILHO, J.A.F.; FUCHS, S.; ARIAS, M.C. Phylogeographical autocorrelation of phenotypic evolution in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Heredity*, v.83, p. 671-680, 1999.

FERREIRA, K.M. *O padrão africano do DNA mitocondrial das abelhas africanizadas do Brasil tem origem diversa de Apis mellifera scutellata?* 2002. 83p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

FERREIRA, K.M. et al. Cytochrome-b variation in *Apis mellifera* samples and its association with COI–COII patterns. *Genetica*, v. 135, p.149-155, 2008.

FRANCK, P. et al. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*, v.86, p. 420-430, 2001.

FRANCK, P. et al. Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. *Apidologie*, v. 31, p. 167-180, 2000.

GAULD, I.; BOLTON, B. *The Hymenoptera*. 2<sup>o</sup> ed. London: Oxford University Press. 1996.

GARNERY, L.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J. M. A Simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia*, v.49. 1993.

GLENN HALL, H.; MURALIDHARAN, K. Evidence from mitochondrial DNA that African honey bees spread as continuous maternal lineages. *Nature*, v. 339, p. 211-213, 1989

GONÇALVES, L.S. Principais impactos biológicos causados pela africanização das abelhas *Apis mellifera* e perspectivas da apicultura brasileira. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 3º, 1988, Ribeirão Preto, Brasil. *Anais do III Encontro sobre Abelhas*, p. 31-36. 1998.

HALL, T. BioEdit. *Biological sequence alignment editor for Windows*. Disponível em: <<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>>. Acesso em: 10 out. 2010.

HALL, H.G.; SMITH, D.R. Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 88, p. 4548-4552, 1991.

HALL, H. G. PCR amplification of a locus with RFLP alleles specific to African honey bees. *Biochemical Genetics*, v.36, p. 351-361, 1998.

KERR, W.E. The history of the introduction of African bees to Brasil. *South African Bee Journal*, v.39, p. 3-5, 1967.

KRAUS, F. B.; FRANCK, P.; VANDAME, R. Asymmetric introgression of African genes in honeybees populations (*Apis mellifera* L.) in Central Mexico. *Heredity*, v.99, p.233-240, 2007.

LINO E SILVA, O. *Padrões de RFLP-PCR da região mitocondrial tRNAile-ND2 em populações Africanizadas de Apis mellifera Linnaeus (1758) (Hymenoptera: Apidae) da América do Sul*. São Carlos: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, 2006. 50p. Monografia de Conclusão de Curso.

LOBO, J.A.; DEL LAMA, M.A.; MESTRINER, M.A. Population differentiation and racial admixture in the Africanized honeybee (*Apis mellifera* L.). *Evolution*, v. 43, p. 794-802, 1989.

LUNT, D. H. et al. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*, v.5, p. 153-165. 1996.

MICHENER, C. D.; GRIMALDI, D.A. The oldest fossil bee: Apoid history, evolutionary stasis, and antiquity of social behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.85, p.6424-6426, 1988.

MORITZ, R. F. A.; HARTEL, S.; NEUMANN, P. Global invasions of the western honeybee (*Apis mellifera*) and the consequences for biodiversity. *Ecoscience*, v. 12, p. 289-301, 2005.

NATES, G.P. Las abejas sin aguijós y su origen dentro de la mitología muisca. *Revista Tacaya*. Universidad Nacional de Colombia. 1996.

NOGUEIRA-NETO, P. Notas sobre a história da apicultura brasileira. In: CAMARGO, J.M.F. *Manual de apicultura*. São Paulo: Ceres, p. 17-32. 1972.

OLDROYD, B. P.; SHEPPARD, W. S.; STELZER, J. A. Genetic characterization of the bees of Kangaroo Island, South Australia. *Journal of Apicultural Research*, v. 31, p. 141-148, 1993.

OTIS, G. W. A review of the diversity of species within *Apis*. In: SMITH, D. R. *Diversity in the genus Apis*. Westview Press: Colorado. 265p. 1991

PRADA, Q.C.F. *Estrutura genética das populações de abelhas africanizadas (Apis mellifera L.) da Colômbia estimada através de marcadores nucleares e mitocondriais*. 96p. 2004. Dissertação de Mestrado – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

Rotta, I.T. *Análise alozimática, morfométrica e dos padrões do DNA mitocondrial das abelhas Africanizadas do Brasil*. 1999. 82p. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1999.

RUTTNER, F. ; TASSENCOURT, I. ; LOUVEAUX, J. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie*, v.9, p. 363-381, 1978.

SARASTE, M. Structural features of cytochrome oxydase. *Quart. Rev. Biophysics*, v.23, p.331-366, 1990.

SEGURA, J. A. L. Highly polymorphic DNA markers in an Africanized honey bee population in Costa Rica. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, p. 317-322, 2000.

SCHNEIDER, S.S.; DEGRANDI-HOFFMAN, G.; SMITH, D.R. The African Honey Bee: factors contributing to a successful biological invasion. *Annu. Rev. Entomol.*, v.49, p. 351-376, 2004.

SHEPPARD, W.S.; MCPHERON, B.A. Ribosomal DNA diversity in Apidae, In: SMITH, DR (ed.), *Diversity in the genus Apis*. Westview Press: Boulder, p. 89-102. 1991.

SHEPPARD, W. S.; MEIXNER, M. D. *Apis mellifera pomonella*, a new honey bees subspecies from Central Asia. *Apidologie*, v. 34, p. 367-375, 2003.

SHEPPARD, W. S. et al. Gene flow between African- and European- derived honey bee populations in Argentina. *Nature*, v.349, p. 782-784, 1991.

SMITH, D. R. Mitochondrial DNA polymorphisms in five Old World subspecies of honey bees and in New World hybrids. In NEEDHAM, G. R. et al. (EDs), *Africanized Honey Bees and Bee Mites*. Ellis Horwood: Chichester, p. 303-312. 1988.

SMITH, D. R.; GLENN, T. C. Allozyme polymorphisms in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). *Journal of Heredity*, v. 86, p. 12-16, 1995.

SMITH, D. R. et al. Geographical overlap of two mitochondrial genomes in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). *Journal of Heredity*, v.82, p. 96-100, 1991.

SOLIGNAC, M. et al. Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome. *Mol. Ecol. Notes*, v.3, p. 307-311. 2003.

TAYLOR, O.R. African bees: potential impact in the United States. *Bull. Entomol. Soc. Am.*, v.31, p. 15-24, 1985.





	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
H1	ACTCGAGCATATTTTACTTCAGCCACRATATTTTGGCTGACCCACAGGATTTAAGTTTTTACATGATAGCCRACTTATCATGGTTCARAAATTAARATTAATATTTTCRAATTTTATGATCCTAGCTT													
H32	.....													
H34	.....													
H35	.....													
H9	.....													
H14	.....													
H16	.....													
H18	.....													
H3	.....													
H31	.....													
H10	.....													
H2	.....													
H11	.....													
H28	.....													
H29	.....													
H27	.....													
H12	.....													
H33	.....													
H4	.....													
H6	.....													
H7	.....													
H8	.....													
H13	.....													
H30	.....													
H5	.....													
H23	.....C.....													
H15	.....G.....													
H17	.....G.....													
H19	.....G.....													
H25	.....G.....													
H26	.....G.....													
H20	.....G.....													
H21	.....G.....													
H24	.....G.....													
H22	.....G.....													
Consensus	.....a.....													

	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	
H1	TTATTATACTATTTACTATTGGTGGATTACAGGATTTATATTATCAAAATCTTCARATGATATTTCTTCATGATACATATTACGTTCTTGGACATTTTCATATGCTCTTTCARATAGTGCACATATT														
H32	.....T.....C.....														
H34	.....T.....														
H35	.....T.....														
H9	.....T.....														
H14	.....T.....T.....														
H16	.....T.....T.....														
H18	.....T.....T.....														
H3	.....T.....														
H31	.....T.....														
H10	.....T.....														
H2	.....T.....														
H11	.....T.....														
H28	.....T.....														
H29	.....T.....T.....														
H27	.....T.....														
H12	.....T.....														
H33	.....T.....														
H4	.....T.....														
H6	.....T.....														
H7	.....T.....														
H8	.....T.....														
H13	.....T.....														
H30	.....T.....C.....														
H5	.....T.....														
H23	.....T.....														
H15	.....T.....T.....														
H17	.....T.....T.....														
H19	.....T.....T.....														
H25	.....T.....C.....T.....														
H26	.....T.....C.....T.....														
H20	.....T.....T.....														
H21	.....T.....C.....T.....														
H24	.....T.....C.....T.....														
H22	.....T.....T.....C.....														
Consensus	.....T.....C.....														

1044  
|--|  
TGCA  
H1 ....  
H32 ....  
H34 ....  
H35 ....  
H9 ....  
H14 ....  
H16 ....  
H18 ....  
H3 ....  
H31 ....  
H10 ....  
H2 ....  
H11 ....  
H28 ....  
H29 ....  
H27 ....  
H12 ....  
H33 ....  
H4 ....  
H6 ....  
H7 ....  
H8 ....  
H13 ....  
H30 ....  
H5 ....  
H23 ....  
H15 ....  
H17 ....  
H19 ....  
H25 ....  
H26 ....  
H20 ....  
H21 ....  
H24 ....  
H22 ....  
Consensus ....



**APÊNDICE III:** Alinhamento entre a sequência do gene COI completo de *Chorthippus parallelus* (publicada por LUNT et al, 1996) e as nossas 13 diferentes seqüências de aminoácidos. Estão indicadas todas as classes estruturais codificadas por essa região e suas posições relativas na seqüência de acordo com Lunt et al. (1996).

