

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS COM  
ATIVIDADE ANTAGÔNICA ISOLADAS DO TEGUMENTO DE *Melipona seminigra*  
(HYMENOPTERA: APIDAE: MELIPONINI)**

**HENRIETTE SOARES PEREIRA PASKINN**

**Manaus - AM**

**2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE**  
**BIOLÓGICA**

**HENRIETTE SOARES PEREIRA PASKINN**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS**  
**ANTAGÔNICAS ISOLADAS DO TEGUMENTO DE *Melipona seminigra***  
**(HYMENOPTERA: APIDAE: MELIPONINI)**

**Orientador:** Dr. Spartaco Astolfi Filho

**Co-Orientador:** Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas, para obtenção do Título de Mestre em Diversidade Biológica

**Manaus – AM**

**2013**

## **EPÍGRAFE**

“O temor do Senhor é princípio da sabedoria”  
Sl 111:10.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por me conceder todas as oportunidades que me são conferidas e por proporcionar saúde, paciência e entendimento durante o decorrer desta trajetória.

À minha família, em especial meu marido Emilio Junior, pela compreensão e por estar sempre presente nos meus momentos de ausência, que não foram poucos, sendo um excelente pai e cúmplice em todos os momentos. Agradeço também aos nossos filhos Helissa e Kássio, que mesmo pequenos, me deram apoio apenas com seus singelos olhares, sorrisos e abraços carinhosos e que também, aos finais de semana, puderam ser vistos várias vezes brincando pelos corredores da UFAM, enquanto eu estava no laboratório. Amo muito vocês!

Aos meus pais Isaque e Beth por estarem sempre me apoiando nas decisões e participando dos momentos mais importantes da minha vida e à minha sogra Raquel por estar sempre disposta a ajudar quando precisei.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva e Dr. Spartaco Astolpho Filho, por acreditarem e confiarem em meu trabalho e por estarem sempre dispostos a ajudar em todos os momentos de decisões durante o desenvolvimento deste projeto.

À minha grande amiga Mirna por ter tido paciência e dedicação em me ensinar algumas técnicas que seriam imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho e também por sua amizade, cumplicidade e descontração.

À Dina, técnica do laboratório, por estar sempre solícita e disposta a auxiliar. Nos momentos que precisei, sempre solucionou minhas dúvidas e me deu dicas de como proceder em determinados momentos da pesquisa.

Ao José Luís, aluno de TCC, que contribui com seu trabalho e companhia nos momentos de coleta e preparo de reagentes.

Aos meliponicultores do brasileiro, em especial, seu Ribamar, que sempre com muita boa vontade, abriu as portas do seu sítio para a realização das coletas.

À Prof. Dra. Gislene Carvalho Zilse pela acolhida ao Grupo de Pesquisas em Abelhas do INPA, sempre apoiando e incentivando os trabalhos, bem como cedendo o meliponário para a coleta das abelhas.

Ao Prof. Dr. Januário Gama do Santos, por ter me ensinado durante o primeiro estágio na graduação, os primeiros passos dentro da microbiologia, demonstrando sempre muito amor ao que faz.

À Prof. Dra. Luciana Leomil e ao Prpf. Dr. Edmar Vaz de Andrade, pela generosidade em compartilhar alguns de seus conhecimentos que contribuíram bastante para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Anita, Eliane, Suelem, Júlio Nino, Edson, Hugo Valério, e Carol, que dividiram momentos de aflições e companheirismo, mas permitindo também companhias alegres durante o dia, tornando o trabalho bem mais divertido.

## RESUMO

Evidências demonstram que o tegumento de abelhas sociais apresenta uma barreira de proteção primária com propriedades antimicrobianas. Diversos tipos de bactérias habitam o tegumento de abelhas sociais saudáveis e podem interagir de forma antagônica frente a bactérias benéficas ou não, contribuindo para a saúde e funções do ninho. Apesar de sua provável importância na manutenção do equilíbrio da colméia, poucos estudos tem se voltado para a caracterização da microbiota deste tecido, visto que o exoesqueleto é considerado como um dos grandes responsáveis pelo sucesso evolutivo dos insetos, não somente pela proteção e ao suporte que lhes confere, mas também a interface que representa entre o animal e o meio ambiente, podendo também atuar como transportador e vetor de microrganismos. Sendo assim, o principal objetivo deste trabalho foi isolar e identificar bactérias com atividade antagônica contra bactérias patogênicas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25927 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) por meio de testes bioquímicos e amplificação do gene 16S rRNA. Neste trabalho encontrou-se *Staphylococcus* coagulase negativo e positivo, *Serratia liquefacies* e *Enterococcus sp.* Os gêneros e espécies bacterianas encontrados neste estudo foram capazes de produzir substâncias, exercendo efeito bactericida ou bacteriostático contra gram-positivos, no curso de seu crescimento in vitro e são amplamente relacionados com insetos sociais. Tal característica pode sugerir que interações entre abelhas sem ferrão e bactérias estão num patamar de associação tal que sejam imprescindíveis para ambos, tanto inseto quanto microrganismos.

**Palavras-chave:** Abelha sem ferrão. *Melipona seminigra*. Tegumento. Antagonismo bacteriano. 16S rRNA.

## ABSTRACT

Evidence has shown that the integument of social bees has a primary protective barrier with antimicrobial properties. Various types of bacteria inhabit the seed coat of healthy social bees and can interact antagonistically against bacteria or not, contributing to the health and function of the nest. Despite its likely importance in maintaining the balance of the hive, few studies have focused on the characterization of the microbiota of this tissue, since the exoskeleton is considered largely responsible for the evolutionary success of insects, not only for the protection and support that gives them, but also the interface between the animal and its environment, and can also act as a carrier and vector of microorganisms. Thus, the main objective of this study was to isolate and identify bacteria with antagonistic activity in front of pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25927 and ATCC 29212 *Enterococcus faecalis*) by biochemical tests and 16S rRNA gene amplification. In this study it was found *Staphylococcus* coagulase negative and positive, *Serratia liquefacies* and *Enterococcus sp.* The genera and species of bacteria found in this study were able to produce substances in the course of their growth in vitro, exerting bactericidal or bacteriostatic effect against gram-positive and are largely related to social insects. This feature may suggest that interactions between stingless bees and bacteria are at a level of association such that both are essential for both insect as microorganisms.

**Keywords:** stingless bees. *Melipona seminigra*. Integument. Bacterial antagonism. 16S rRNA.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	A: Meliponários do Grupo de Pesquisas em Abelhas (GPA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e B: Meliponário do Ramal do Brasileirinho, Km 12 – Manaus-AM.	19
<b>Figura 2.</b>	Demonstração da atividade antagônica de diferentes espécies bacterianas contra <i>P. fluorescens</i> (LEWIS 1928).	24
<b>Figura 3.</b>	Coleta das abelhas por catação manual (à esquerda) e tubo falcon estéril contendo 20 indivíduos (a direita).	27
<b>Figura 4.</b>	Diluição de 100 µL com maior número de UFCs isoladas.	39
<b>Figura 5.</b>	Foto do teste de antagonismo. Resultado positivo contra <i>S. aureus</i> ATCC 25927. C+ corresponde ao controle positivo (Ampiclina 100mg/mL).	40
<b>Figura 6.</b>	Foto da extração Fenol-Clorofórmio do DNA genômico em gel de agarose 0,8% com marcador de peso molecular Lâmbida ( $\lambda$ ). M2 (50ng) e M4 (100ng).	42
<b>Figura 7.</b>	Foto da amplificação do gene 16S Rrna por PCR em gel de agarose a 0,8%, mostrando o tamanho do fragmento de 1,000 pb. Controle positivo (C+): <i>E.coli</i> ATCC 25922. (C-): água deionizada. Marcador 1Kb Bioscience	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Locais de coleta das abelhas	28
<b>Tabela 2.</b>	Bactérias patogênicas American Type Culture Collection (ATCC) utilizadas para teste de antagonismo.	29
<b>Tabela 3.</b>	Resultado do isolamento bacteriano dos 14 ninhos coletados	37
<b>Tabela 4.</b>	Resultado do teste de antagonismo dos 52 isolados. S.A = Formação de halo contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25927; E.F = Formação de halo contra <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212; S= Sim,N= Não; Isolado: letra e número inicial correspondeM a posição do isolado no poço (Ex: D3) seguido do ninho de onde foi coletado (Ex: N195), portanto D3-N195. Em vermelho estão os isolados que formaram halos contra as duas bactérias ATCCs testada	40
<b>Tabela 5.</b>	Identificação molecular 16S rRNA de isolados de <i>M. seminigra</i> . Sentido: direção da fita de DNA 5'-3' sequenciada; e-value: índice estatístico contendo a probabilidade de erro do sequenciamento; % cobertura: percentual de cobertura; % ID: percentual identidade máxima.	44
<b>Tabela 6.</b>	Identificação bioquímica de isolados Gram-positivos. Cat: catalase; urea: uréase; cit: citrato; mot: motilidade; H2S: ácido sulfúrico; OG: oxidação da glicose; FG: fermentação da glicose; man: manitol; coa: coagulase; SCN: <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo; SCP: <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo.	45
<b>Tabela 7.</b>	Identificação bioquímica de isolados Gram-negativos pelos seguintes testes: Lac: lactose; oxi: oxidase; cat: catalase; OG: oxidação da glicose; FG: fermentação da glicose; mot: motilidade; H2S: ácido sulfídrico; ac: ácido a partir ad glicose; lis: lisina descarboxilase; cit: citrato.	47

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
1.1	Objetivo geral	10
1.2	Objetivos específicos	10
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>11</b>
<b>3.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>13</b>
3.1	Meliponíneos	13
3.1.1	Biologia	13
3.1.2	Nidificação	14
3.1.3	Polinização	14
3.1.4	Meliponicultura	15
3.1.5	Tegumento de abelhas	17
3.2	Associações entre microrganismos e sociabilidade de insetos	18
3.3	Atividade antagônica entre bactérias	20
3.4	Métodos fenotípicos e moleculares de identificação bacteriana utilizando 16S rRNA	22
<b>4.</b>	<b>MATREIAL E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
4.1	Coleta	25
4.2	Preparo das amostras obtidas do tegumento de abelhas	26
4.3	Isolamento bacteriano	26
4.4	Teste de antagonismo contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecalis</i>	27
4.5	Identificação molecular	28
4.5.1	Extração de DNA genômico de bactérias	28
4.5.2	Identificação bacteriana por amplificação do gene 16S rRNA	29
4.5.3	Precipitação dos produtos de PCR por PEG (polietilenoglicol)	29
4.5.4	Reação de sequenciamento	30
4.5.5	Análises computacionais	30
4.6	Identificação Fenotípica	31
4.6.1	Testes Bioquímicos para bactérias Gram positivas e Gram negativas	31
4.6.1.2	Coloração de Gram	31
4.6.1.3	Prova da catalase	32
4.6.1.4	Teste da oxidase	32
4.6.1.5	Teste da urease	32
4.6.1.6	Teste em ágar citrato de Simmons	33
4.6.1.7	Teste da glicose em meio OF (oxidação-fermentação)	33
4.6.1.8	Teste em meio SIM	34
4.6.1.8.1	Produção de ácido sulfídrico (H <sub>2</sub> S)	34
4.6.1.8.2	Motilidade	34
4.6.1.8.3	Indol	34
4.6.2	Testes bioquímicos para bactérias Gram Positivas	35
4.6.2.1	Teste de crescimento em Agar Chapman	35
4.6.2.2	Teste da coagulase em tubo	35
4.6.3	Testes bioquímicos para Enterobactérias	35
4.6.3.1	Teste em meio Ágar MacConkey	35
4.6.3.2	Teste da glicose	35
4.6.3.3	Teste da Lisina descarboxilase	36
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>37</b>
5.1	Isolamento bacteriano	37

5.2	Testes de antagonismo	38
5.3	Extração de DNA genômico e amplificação do gene 16 S rRNA	39
5.4	Identificação molecular bacteriana	40
5.5	Caracterização fenotípica	43
5.5.1	Coloração de Gram	43
5.5.2	Testes bioquímicos	43
5.5.2.1	Bactérias gram-positivas	43
5.5.2.2	Bactérias gram-negativas	44
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
6.1	Considerações gerais	46
6.2	Isolamento e teste de antagonismo	47
6.2	Identificação molecular e fenotípica	48
6.2	<i>Staphylococcus sp.</i>	48
6.5	<i>Serratia sp.</i>	50
6.6	<i>Enterococcus sp.</i>	51
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>53</b>
<b>8.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>54</b>
<b>9.</b>	<b>CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO</b>	<b>55</b>
<b>10.</b>	<b>ORÇAMENTO</b>	<b>56</b>
<b>10.1</b>	Custeio 1 – Material de consumo - Reagentes e Kits	56
<b>10.2</b>	Custeio 2 – Material de consumo – Vidrarias e Plásticos	57
<b>10.3</b>	Custeio 3 – Material de consumo – Material de escritório	58
<b>10.4</b>	Custeio 4 – Passagens e Diárias	58
<b>10.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>59</b>
<b>11.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>69</b>

## **1. OBJETIVOS**

### **1.1 Geral**

- Identificar bactérias isoladas de *Melipona seminigra* com atividade antagônica à bactérias patogênicas.

### **1.2 Específicos**

- Construir bacterioteca a partir dos isolados de cutícula de abelhas *Melipona seminigra*;
- Selecionar bactérias com provável atividade antagônica frente a bactérias patogênicas utilizando métodos convencionais;
- Determinar o perfil fenotípico de isolados bacterianos com atividade antagônica demonstrada.
- Sequenciar a região 530f e 1492r do gene 16S rRNA para determinação das sequências nucleotídicas dos isolados bacterianos com atividade antagônica demonstrada.

## 2. JUSTIFICATIVA

Insetos sociais têm atraído atenção em virtude de sua diversidade ecológica, organização social e sucesso evolutivo devido à riqueza de espécies e sua extraordinária abundância, principalmente nas regiões tropicais (ZIENZ *et al.*, 2005). As relações simbióticas entre insetos sociais e não sociais e bactérias já são conhecidas em vários grupos de abelhas (ROUBIK, 1989).

Na atividade de forrageamento das abelhas existe o contato direto com o ambiente externo ao ninho e com os diversos microrganismos existentes nele, incorporando-os ao tegumento e, portanto, se constituindo no veículo para sua introdução no ninho. Evidências demonstram que essa interação propicia uma barreira cuticular primária provida de secreções antibióticas, impedindo a proliferação de possíveis patógenos inclusive no ambiente da colméia (ZASLOFF, 2002; STOW *et al.*, 2009). Uma vez que relações antagônicas estão relacionadas com a produção de substâncias por um microrganismo que exercem função bactericida ou bacteriostática em outro organismo presente no mesmo hábitat, alterando as condições do ambiente através de fatores como pH ou potencial de oxi-redução, tornando-o desfavorável a outras espécies (MAYRAND e GRENIER, 1998).

Em ninhos de abelhas é válido dizer que há uma estreita variabilidade genética entre seus indivíduos constituintes (em sociedades), situação que as tornaria especialmente vulneráveis quanto à disseminação de um agente patogênico (ZASLOFF, 2002; LAWNICZAK *et al.*, 2007, STOW *et al.*, 2007).

Por outro lado, existem diversos tipos de bactérias que habitam o tegumento de abelhas saudáveis, estas, por sua vez, apresentam possivelmente uma atividade antagonista a patógenos, tendo a função de “escudo” microbiano de defesa (ROUBIK, 1983). Se considerarmos uma colônia de abelhas como um superorganismo (BIESMEIJER, 1997), seria possível inferir que as bactérias que convivem e interagem com o mesmo, contribuem para a saúde e funções da colméia. Apesar de sua provável importância na manutenção do equilíbrio do ninho, poucos estudos tem se voltado para a caracterização de tal microbiota. Pesquisas indicam uma alta diversidade e abundância de microrganismos em associação aos microhabitats de ninhos de insetos (HAINE *et al.*, 2008), além disso, os componentes antimicrobianos do tegumento de insetos sociais (ZASLOFF, 2002) seriam um dos fatores que possivelmente levariam esse grupo a combater a disseminação de doenças, visto que esses compostos provavelmente aumentariam de acordo com a sociabilidade dos insetos e estariam

diretamente relacionados com o sucesso evolutivo do grupo dos insetos sociais (STOW *et al.*, 2007). No entanto, pouco se conhece a respeito da composição da microbiota externa de abelhas. Se há riqueza bacteriana, alta densidade, ou até mesmo, se possuem efeito antagônico para evitar competidores (ROUBIK, 1983). A microbiota externa dos organismos vivos está associada a um grande número de espécies de bactérias benéficas, as quais se revelam muitas maneiras e podem influenciar a evolução, desenvolvimento e saúde de seus hospedeiros (RUBY *et al.*, 2004). Neste contexto, estudos tem constatado que abelhas carregam um conjunto diversificado de bactérias, onde muito poucas parecem ser patogênicas (EVAN e ARMSTRONG 2006).

Os benefícios científicos esperados de um maior conhecimento sobre a microbiota consorciada com as abelhas são extensos (RAPPE e GIOVANNONI, 2003; COLWELL, 1997), e ainda poderá fornecer melhor compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes e o conhecimento das suas interações com insetos sociais. Já os benefícios econômicos e estratégicos estão relacionados com a descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos tanto para fins industriais quanto farmacêuticos (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A abordagem de “*screening*” (triagem) molecular da diversidade microbiana é a maneira mais adequada, tanto do ponto de vista experimental quanto custo-benefício, para a identificação de microrganismos em relação a sua diversidade e abundância. Nesse aspecto, a evolução das metodologias de biologia molecular aplicada ao estudo do meio ambiente tem contribuído significativamente para um grande avanço do conhecimento sobre a diversidade microbiana (COUTINHO *et al.*, 2001). Segundo Oliveira (2006), uma ínfima parte da diversidade de microrganismos é conhecida devido ao fato de que a grande maioria não pode ser cultivada e, portanto, não seria facilmente identificada. Portanto, a identificação de microrganismos baseada em sua sequência genômica é uma abordagem única que pode fornecer informações úteis no caso de uma nova espécie.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Meliponíneos

As abelhas têm sido consideradas como um dos grupos-chave para estudos de diversidade biológica na Amazônia (OVERAL, 2001). De maneira geral, o conhecimento sobre a fauna de abelhas da região apresenta grandes lacunas. Poucas coletas sistematizadas foram feitas, se compararmos de outros insetos, além de que a taxonomia de muitos gêneros ainda foi pouco trabalhada. Apesar disso, alguns grupos de abelhas presentes na fauna amazônica são suficientemente conhecidos para permitir sua utilização como indicadores de biodiversidade. Este é o caso das abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponini), os quais se constituem como os principais polinizadores, ocupando uma posição chave nos diferentes ecossistemas, os quais podem eventualmente colapsar sem sua presença (KERR *et al.*, 1996; KERR *et al.*, 2001; MICHENER, 2007).

Do ponto de vista econômico, estima-se que os serviços de polinização prestados pelas abelhas, num panorama global, gerem um impacto de 117 bilhões de dólares anualmente. Todavia, com a destruição de habitats e a redução da diversidade floral associada à agricultura intensiva, pastagens e avanço de áreas urbanas, observa-se o declínio das populações de várias espécies de abelhas, principalmente as nativas (KEVAN e IMPERATRIZ-FONSECA, 2004). Uma situação preocupante, que vem mobilizando pesquisadores, conservacionistas e o poder público (KEVAN e IMPERATRIZ-FONSECA, 2006).

Entre as inúmeras espécies de abelhas existentes, destacam-se as abelhas sem ferrão (Meliponina), com 52 gêneros e, aproximadamente, 300 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (SILVEIRA *et al.*, 2002). Entre os Meliponina, o gênero *Melipona* contém as abelhas de maiores tamanhos, com cerca de 40 espécies de ocorrência exclusivamente Neotropical (MICHENER, 1979), cuja maior diversidade é encontrada na bacia amazônica (SILVEIRA *et al.*, 2002).

##### 3.1.1 Biologia

Com exceção das rainhas, uma característica comum entre as fêmeas dessa família é a presença da corbícula, uma concavidade na tíbia do terceiro par de pernas traseiras de operárias, utilizada para carregar pólen das flores e outras substâncias para a colméia (NOGUEIRA-NETO, 1997). Para auxiliar o transporte, várias espécies de abelhas da família

Apidae acrescentam mel ou néctar no grão de pólen, antes de adicioná-lo na corbícula, assegurando assim o transporte de vários tipos de pólen (CORTOPASSI-LAURINO, 1993).

Em geral, essas abelhas fazem reserva de resina aderida nas paredes laterais do ninho, de preferência próxima à entrada, formando pequenos montes, enquanto a cera é armazenada nas bordas dos discos de cria ou em pequenas esferas sobre o invólucro. A cera é produzida por glândulas cerígenas presentes entre as placas de quitina no abdômen superior. Sendo esta uma característica que as diferenciam das abelhas do gênero *Apis*, pois estas têm suas glândulas na parte inferior do abdômen (BIESMEIJER, 1997).

### **3.1.2 Nidificação**

Segundo Kerr (1996) em todas as espécies, a entrada dos ninhos está quase sempre no centro de uma estrutura de terra, ou de geoprópolis (argila e resinas vegetais). A maioria dos meliponíneos utiliza ocos de árvores naturais em diferentes alturas, blocos de cimento, madeira morta e ninhos abandonados por outros insetos para se alojarem. Os ninhos são construídos basicamente de cera pura ou cerume, que é a mistura de cera, própolis e barro. Para delimitação da morada, usa-se o batume, que é a denominação para a mistura de própolis e barro (geoprópolis).

### **3.1.3 Polinização**

Dentre as interações que ocorrem entre os insetos e as flores, a polinização é a mais importante delas. Esse processo pode ocorrer na própria planta quando o grão de pólen é transportado para o estigma da flor ou ainda, com a transferência dos grãos de pólen da antera de uma flor para o estigma de outra flor da mesma espécie, mas de pés diferentes, com intervenções de agentes polinizadores, como por exemplo, as abelhas (SOUZA *et al.* 2007). A polinização é essencial para a reprodução sexuada das plantas e, na sua ausência, a manutenção da variabilidade genética entre os vegetais não ocorre (IMPERATRIZ-FONSECA, 2004).

Os polinizadores fornecem um serviço essencial ao ecossistema e trazem inúmeros benefícios à sociedade, através de seu papel na produção de alimento e na agricultura, além de melhorias nos meios de subsistências, desenvolvimento científico e conservação da diversidade biológica. Neste contexto, as abelhas são os principais agentes polinizadores de plantas, das quais retiram néctar, resinas e pólen, sendo este a principal fonte de proteínas e vitaminas (CARVALHO-ZILSE 2007). As abelhas sem ferrão precisam de néctar e pólen para crescimento, sobrevivência e reprodução da colméia. Estes produtos, depois de

coletados, transformados e combinados com substâncias específicas próprias, são armazenados e amadurecidos nos discos para a alimentação das abelhas (MENDES & COLEHO, 1983, BRASIL, 2000).

As abelhas podem ser especialistas na polinização de determinadas flores ou famílias botânicas, coletando com a máxima eficiência e operando até como polinizadores exclusivos. Existe também o comportamento generalista, isto é, quando há ocorrência da visita a muitas espécies botânicas, podendo polinizá-las com menor eficiência do que as especialistas (CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 1993). Esses comportamentos dependerão da espécie da abelha, da localidade, da composição florística e da sazonalidade do ecossistema, podendo ocorrer a especialização, dependendo da estação florida. Há muitas espécies de plantas que são visitadas por uma única espécie de abelhas como foi observado por Absy e colaboradores (1984) na região do médio Amazonas (Rio Tapajós).

A região Amazônica com sua rica biodiversidade é conhecida como berço natural das abelhas sem ferrão. Dentro do grupo pantropical, estas abelhas realizam importantes serviços ambientais para ecossistemas amazônicos, sendo os principais polinizadores da flora nativa e podem até mesmo serem dispersores de sementes (NUNEZ *et al.*, 2008) além de serem importantes polinizadores de culturas de importância agrícola (HEARD, 1999; IMPERATRIZ-FONSECA, 2004). Aproximadamente 192 espécies de meliponíneos (SILVEIRA *et al.*, 2002) brasileiros têm ampla ação polinizadora da nossa flora garantindo a presença e desenvolvimento de nossa fauna e biodiversidade (KERR *et al.*, 1996).

### **3.1.4 Meliponicultura**

Na história da humanidade o mel foi uma das primeiras fontes de açúcar para o homem (BUARQUE DE HOLANDA, 1957). No continente americano, isso é comprovado pelos vestígios arqueológicos do uso do mel e pólen das abelhas nativas sem ferrão nos períodos pré-hispânicos, revelam um importante papel que desempenharam na dieta das comunidades ameríndias (MEDINA e GONZALES, 1995).

Muito antes da chegada dos europeus (portugueses) ao Brasil algumas etnias indígenas já tinham um conhecimento adiantado sobre o mel e seu benefícios nutritivos, bem como o própolis como alimento curativo (RIBEIRO, 1995). Decorrente desse conhecimento, temos muitas abelhas com nomes indígenas, como: jupará, jandaíra, urucu entre outras.

A coleta de mel por parte das populações ribeirinhas e povos da floresta Amazônica tem ocorrido a muito tempo de forma errônea, visto que os coletores derrubam as árvores, destruindo os ninhos e perdem desta forma, a futura provisão do mel. Isso acontece por falta

de informação, técnicas apropriadas ou manejo para desenvolver este trabalho (VIEIRA, *et al.* 2008).

Nos últimos anos há uma grande preocupação sobre como devem ser ocupadas áreas ainda inexploradas da região Amazônica. Para tal tem-se criado projetos de colonização que visam à utilização das riquezas florísticas e faunísticas. Na Amazônia há um grande número de abelhas melíferas sem ferrão que podem ser manejadas de forma racional visando a produção de mel, pólen, própolis e outros produtos e subprodutos comercialmente viáveis (ASSIS, 2001). Tais espécies estão adaptadas a florestas tropicais, não sofrendo inclemências do clima. Tendem, entretanto, desaparecer devido ao acirrado processo de desmatamento que vem ocorrendo na Amazônia nos últimos anos, o que tem destruído os locais de nidificação das abelhas, bem como suas fontes de alimento, ocasionando assim o risco de extinção dessas espécies.

Segundo PARANI e colaboradores (2006), a meliponicultura surge, portanto, como uma forma racional de criação das abelhas nativas contribuindo como fonte de emprego da mão de obra familiar das comunidades amazônicas, tendo como foco o consumo e a venda dos produtos como mel, própolis, pólen e outros subprodutos destas abelhas, além de terem um grande potencial no mercado interno e externo, contribuem para uma vida mais saudável. Sendo assim, a meliponicultura é uma importante atividade para a conservação e desenvolvimento econômico regional.

Dentre as várias espécies de abelhas sem ferrão, *Melipona seminigra*, espécie utilizada neste estudo, é uma abelha endêmica do Estado do Amazonas (CAMARGO e PEDRO, 2008), utilizada na meliponicultura local (Figura 1) para produção de mel e pólen (CARVALHO-ZILSE, 2006).

**Figura 1.** A esquerda Meliponário do Grupo de Pesquisas em Abelhas (GPA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia em Manaus, Amazonas. A direita Meliponário do km 12 do Ramal do Brasileirinho em Manaus, Amazonas.



Foto: José Luiz Costa Mendes

### 3.1.5 Tegumento de abelhas

A maior porção do corpo dos insetos e, portanto, a superfície de contato com o ambiente é o tegumento. O tegumento ou cobertura externa do corpo dos insetos é formado pela epiderme e uma camada extracelular, a cutícula, que recobre e constitui seu exoesqueleto. A forma dos insetos, seu sucesso como animais terrestres capazes de resistir à dissecação e de respirar ar atmosférico, além de seus diversos modos de locomoção, estão entre as várias características diretamente relacionadas com as propriedades de seu tegumento (CRUZ-LANDIM, 2008; PALLI 1987; FILSHIE, 1984).

O exoesqueleto (cutícula) é considerado um dos grandes responsáveis pelo sucesso evolutivo dos insetos. Isso se deve não somente a proteção e ao suporte que lhes confere, mas também a interface que representa entre o animal e o meio ambiente (ANDERSEN, 1979; CRUZ-LANDIM, 2008). Pode ser dividido em duas camadas: a epicutícula, fina, de composição extremamente complexa (lipídios e uma variedade de proteínas) e, internamente a exocutícula, espessa, contendo proteínas e o polissacarídeo estrutural quitina (HEPBURN, 1985). Toda essa estrutura é produto de secreção da camada celular epidérmica subjacente, sendo, portanto, fisiologicamente indissociável a ela. Já a exocutícula é composta exclusivamente de proteínas e sua dureza deve-se à estabilização dessas proteínas por ligações cruzadas resultantes de um processo de esclerotização produzido pela oxidação de fenóis diídricos sintetizados pelas células epidérmicas e por quinonas. O exterior da cutícula dos

insetos apresenta uma variedade de estruturas adaptativas como cerdas, pelos, escamas etc. Esses caracteres são fundamentais também para identificação na taxonomia (CRUZ-LANDIM, 2008).

Ontogenicamente podem ser distinguidos dois tipos básicos de cutícula: a incolor, flexível e reativa, e a pigmentada, rígida e estabilizada. O segundo tipo deriva necessariamente do primeiro, que se diferencia por um processo chamado “tanning” (“curtimento”), caracterizado pelo escurecimento e (melanização), além do enrijecimento (esclerotização) (NETO 2008).

### **3.2 Associações entre microrganismos e sociabilidade de insetos**

Os ninhos de abelhas sem ferrão apresentam grande variedade de organismos associados a eles, como bactérias (CRUZ-LANDIM, 1996), fungos (GILLIAM e ROUBIK, 1990), ácaros (EICKWORT, 1990) e artrópodes de várias ordens (KISTNER, 1982; WILLE, 1983; MELO, 1996). Na última década, alguns pesquisadores têm se interessado sobre este tema devido à possibilidade de estudos relacionados à biologia, ecologia e evolução dessas associações (ROUBIK, 1989; EICKWORT, 1990; APONTE, 1996; BEZERRA *et al.*, 2000), além dos potenciais para aplicações biotecnológicas.

Os microrganismos são as entidades bióticas mais numerosas e antigas, capazes de colonizar com sucesso cada nicho ecológico possível do planeta. Sua presença e atividade são essenciais para o funcionamento e equilíbrio dos ecossistemas, bem como dos indivíduos (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Associações bacterianas em artrópodes estão implicadas na degradação de materiais vegetais e outros alimentos, regulação do pH, a síntese de vitaminas e, em casos relativamente raros, a indução da doenças (DILLON e DILLON, 2004) ou até mesmo na determinação da razão sexual da prole (ZIENTZ *et al.*, 2005).

Abelhas, vespas, formigas e cupins são insetos que fornecem os exemplos mais extremos de sociabilidade na natureza. Devido à alta densidade de indivíduos dentro de colônias, partilha de alimentos e outros recursos, além da coexistência de membros da colônia de várias gerações e cuidado cooperativo da cria, se constituem num grupo extremamente interessante para estudos sobre interações ecológicas (HOLLDOBLER e WILSON, 1990; BIESMEIJER, 1997). Nesse contexto, esses insetos, fornecem recursos exclusivos para simbiontes microbianos, caracterizando interações advindas de uma história co-evolutiva (EVANS e ARMSTRONG, 2006).

Por adotarem um estilo de vida social, insetos da ordem Hymenoptera “carregam” consigo um inevitável aumento na densidade de indivíduos e a frequência de contato entre

eles. Fatores como transmissão de doenças poderiam ser facilitados pelo fato dos indivíduos estarem intimamente relacionados e terem uma estreita base genética (HAMILTON, 1987; SHIMID-HEMPEL, 1998). Conseqüentemente, a sociabilidade tem sido associada com maiores taxas de possíveis transmissões de doenças. Por essa razão, insetos sociais necessitam apresentar mecanismos de defesa peculiares ao modo de vida em sociedade que garantam resistência às patologias oportunistas (ROSENGAUS *et al.*, 1998; TRANIELLO *et al.*, 2002).

A formação de proles com estreito parentesco (todas as operárias são oriundas de uma mesma rainha e, portanto, são irmãs) pode ter uma implicação importante, tanto do ponto de vista organizacional (divisão de trabalho e coesão social), bem como no padrão de colonização por microrganismos (ZIENTZ *et al.*, 2005).

Fatores inerentes à vida em sociedade, como por exemplo o comportamento de trofalaxia (troca de alimentos regurgitados, secreções glandulares, etc.), conferem coesão a colméia, proporciona o fluxo de microrganismos e a estabilidade populacional dos mesmos (ZIENTZ *et al.*, 2005).

Por muito tempo se acreditou que o ambiente de uma colméia não favoreceria ao crescimento de microrganismos, sendo esse, um nicho “quase estéril” à existência dos mesmos devido à ação de antibióticos presentes nos materiais utilizados na construção do ninho ou devido à ação de inibidores produzidos pelos próprios microrganismos para evitar outros competidores (ROUBIK, 1983). No entanto, estudos comprovam que o ninho de insetos sociais estaria longe de ser “uma ilha”, ou seja, um ambiente ou um aglomerado de invertebrados isolados “convenientemente” livres de interações microbióticas. O fato é que o ecossistema em ninhos de insetos sociais inclui muitos microrganismos presentes, seja colonizando-os como indivíduos no interior do lúmen e outras cavidades internas de insetos como também no tegumento dos mesmos (TANADA e KAIA, 1993), e ainda podendo estar em todas as partes de suas habitações, desde os alimento, pólen e mel e até impregnados na estrutura física de seus ninhos (EVANS e ARMSTRONG, 2006).

Os microrganismos presentes em colméias de abelhas constituem uma fração de vida associada da qual se tem pouca informação. Estudos relatam a existência de centenas de cepas de leveduras em pólen e néctar de intestinos de abelhas da espécie *Apis mellifera*, além de pelo menos 107 fungos, 81 leveduras e 29 bactérias em polén (ROSA e PETER 2006). Abelhas adultas emergentes adquirem micro-flora intestinal por meio de um intercâmbio alimentar com outras abelhas na colméia e ainda pelo consumo de levedura contida no pólen. Desta forma, a colméia mantém a sua cultura microbiana ao longo do tempo e de rainha a rainha (GILLIAM, 1991; MILION, 2000). Além disso, abelhas, bem como insetos em geral,

podem ser parasitados (ROUBIK, 1989) ou desenvolver patologias, e conseqüentemente, devem possuir um diversificado conjunto de defesas individual e grupal para evitar doenças através do efeito de proteção dos seus simbioses microbianos (EVANS e ARMSTRONG 2006).

### **3.3 Atividade antagônica entre bactérias**

Estudos de interações antagônicas, ou seja, quando um microrganismo exerce ação inibidora ou bactericida para outras espécies de microrganismos, provavelmente ocorrem desde a época de Pauster e Joubert (LEWIS, 1928), portanto, desde o início da microbiologia, visando maior conhecimento das implicações biológicas do que a caracterização química desses inibidores. Muitos desses primeiros estudos exploravam a possibilidade de controlar doenças como o antraz e a difteria pelo uso de bactérias antagônicas não patogênicas (FLOREY, 1946). Embora mecanismos de inibição ou de substâncias fossem obscuras, parece muito provável que muitas das interações observadas eram causadas por substâncias que agora são conhecidas como bacteriocinas.

Segundo Jack e colaboradores (1995), a maioria, senão, todas as bactérias, são capazes de produzir várias substâncias no curso de seu crescimento *in vitro*, que podem ser inibitórias tanto para si quanto para outras bactérias. Essas substâncias poderão exercer efeito bactericida ou bacteriostático. Tais substâncias incluem:

- Toxinas;
- Enzimas bacteriolíticas como lisostafina, fosfolipase A e hemolisinas; subprodutos das vias metabólicas primárias como ácidos orgânicos, amônia e peróxido de hidrogênio e vários outros metabolitos decendários;
- Substâncias antibióticas como geramicina, valinomicina e bacitracina, que são sintetizadas por complexos multienzimáticos (sua biossíntese ao contrário dos agentes tidos como bacteriocinas, não é diretamente bloqueada por inibidores ribossomais da síntese de proteínas);
- Bacteriocinas (são proteínas antibióticas do tipo colicina, ou seja, moléculas, caracterizadas como peptídios antimicrobianos que destroem ou inibem o crescimento de outras bactérias taxonomicamente relacionadas com a cepa produtora (Jack et al., 1995),

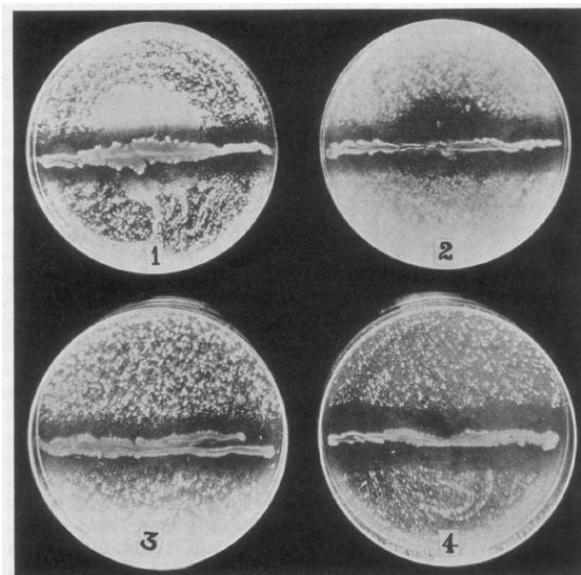
As primeiras bacteriocinas descritas foram as colicinas, que são ativas contra *Escherichia coli* (HARDY, 1975). No entanto, há muitas outras bacteriocinas produzidas por

bactérias gram-positivas, patogênicos ou não (TAGG, 1976). A partir da década de 1970, tornou-se evidente que substâncias antagonicas dessa natureza são onipresentes, apontando também que algumas substâncias, especialmente aquelas produzidas por bactérias gram positivas, encaixam-se perfeitamente no molde de colicinas clássicas. Uma grande variedade de substâncias, algumas vezes mal caracterizadas, produzidas por bactérias, também podem ser designadas como bactericinas. Alguns critérios devem ser observados para a determinação de bacteriocinas em bactérias gram-positivas e gram-negativas (TAGG *et al.*, 1976).

As bacteriocinas, proteínas catiônicas anfífilas, contendo pouca cisteína ou não são ribossomalmente sintetizadas e lançadas como peptídeos antimicrobianos que apresentam atividade contra bactérias estreitamente relacionadas. A produção de bacteriocinas é favorecida em condições de estresse, em taxas de crescimento mais baixas, ocorre melhor utilização de energia devido a uma maior disponibilidade de metabólitos para síntese dessas substâncias. Do contrário, com taxas de crescimento elevadas, existe uma falta de aminoácidos disponíveis para produção de bacteriocinas (VAN DEN BERGHE *et al.*, 2006).

Há alguns métodos tradicionais para a verificação de atividade antagonica que ocorre entre bactérias, sendo que o método de Garry (L.C) tem sido o mais utilizado, em sua forma tradicional ou com modificações (LEWIS, 1928). Na sua essência o teste é realizado a partir da semeadura de duas amostras distintas em meio ágar, onde cada espécie é colocada antiparalelamente ou alternadas a partir do centro, sendo que as mesmas se encostam. Na presença de inibição do crescimento das colônias de uma das amostras, são consideradas antagonicas. Para triagem, o teste geral para antagonismo é feito em meios sólidos e envolve a detecção de inibição de crescimento de um indicador de estirpe (passiva) causada pelo teste ativo (cultura). O teste mais simples e mais utilizado é o método direto, neste teste as culturas de ensaio e o indicador são cultivados simultaneamente e a demonstração do antagonismo depende da liberação de um inibidor (visualizado pela presença de halo) a partir da cultura teste indicador. A densidade do halo do indicador é um importante determinante da sensibilidade do método (KUTNER, 1966) (Figura 2), como foi observado em estudos iniciais de antagonismo bacteriano em *Pseudomonas fluorescens* contra bactérias de solo formadoras de esporos (LEWIS, 1928). Com esta técnica é possível a inoculação simultânea de várias bactérias.

**Figura 2.** Demonstração da atividade antagônica de diferentes espécies bacterianas contra *P. fluorescens* (LEWIS, 1928). 1: *Bacillus subtilis*; 2: *Bacillus mycoides*; 3: *Bacillus vulgatus*; 4: *Bacillus cereus*



### 3.4 Métodos fenotípicos e moleculares de identificação bacteriana utilizando 16S rRNA

Testes bioquímicos, nutricionais e fisiológicos são usados na taxonomia de bactérias desde a década de 20 (BUSSE *et al.*, 1996). As identificações fenotípicas bacterianas são baseadas em uma série de testes bioquímicos (BANDO, 2008), incluindo verificação de reações metabólicas, características de colônias e morfologia celular em esfregaços corados pelo método de Gram. Além de verificação de enzimas estruturais, pesquisas de produtos metabólicos e catabólicos (acetoína, indol, ácidos orgânicos) e verificação da sensibilidade dos microrganismos em diferentes compostos (MARTINEZ e TADDEI, 2008).

Até pouco tempo atrás a identificação bacteriana baseava-se somente nessas características. Isso gerava um problema, pois organismos não relacionados filogeneticamente podem apresentar características semelhantes, quando, por exemplo, ocupam o mesmo ambiente. Em 1996, Kirchoff admitiu que a identificação de novos isolados seja difícil se for baseada em critérios puramente fenotípicos e fisiológicos e, principalmente, se as características mostradas por um isolado em particular não são completamente idênticas às espécies já descritas. Portanto, técnicas fenotípicas juntamente com as técnicas moleculares são de fundamental importância para contribuir com a identificação de espécies bacterianas.

Microrganismos outrora não detectados em testes bioquímicos agora podem ser identificados via marcadores moleculares (BANDO 2008), não excluindo, no entanto, os métodos convencionais já consagrados e indispensáveis para validação de resultados advindos de técnicas de alto desempenho.

Das várias técnicas que utilizam ácidos nucleicos para estimar a composição da diversidade microbiana em habitats complexos, as mais eficiente são as que se baseiam no estudo da sequência do gene 16S rRNA (LIESACK *et al.*, 1997), pois estas se tornaram padrão na determinação de relações filogenéticas, na avaliação da diversidade em amostras ambientais e na detecção e quantificação de populações específicas (HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998). A escolha do 16S rRNA decorreu por apresentar todas as características necessárias a um marcador molecular ideal: possui uma distribuição universal, estando presente nos domínios Bacteria, Archea e Eukarya, (WOESE *et al.*, 1990) bem como estrutura e função conservadas entre os *taxa* e um tamanho grande o suficiente que permita o aparecimento de divergências na sequência. Por fim, o grande número de sequências de 16S rDNA disponíveis atualmente ( $\approx 190$  mil sequências segundo o *Ribosomal Database Project-II* rdp.cme.msu.edu), favorece ainda mais o uso desse gene como marcador molecular filogenético por permitir uma vasta gama de comparações.

Nesse contexto, as sequências de RNAs ribossômicos podem ser consideradas como cronômetros moleculares, sendo mais utilizados, mostrando um alto grau de constância funcional. Um relógio molecular pode ser definido como uma molécula cuja sequência muda aleatoriamente com o tempo segundo uma velocidade constante de mudança (nucleotídeos por milhão de anos). Baseados no produto, tempo vezes velocidade de mudança, pode-se determinar a relação filogenética entre duas sequências de organismos diferentes provindas de um ancestral comum (WOOSE, 1987). Os rRNAs ocorrem em todos os organismos em diferentes posições de suas sequências que mudam em taxas bastante diferentes, permitindo a medida da maioria das relações filogenéticas. Os rRNAs são moléculas grandes e consistem de muitos domínios (CLARRIDGE III, 2004; CHAKRAVORTY *et al.*, 2007).

O 16S rRNA é uma das moléculas que compõe, juntamente com outras 21 proteínas, a subunidade menor do ribossomo nos domínios Archaea e Bacteria. Sua estrutura secundária pode possuir pareamentos diferentes do proposto por Watson-Crick (A-U e C-G) e várias hélices oriundas do pareamento intracadeia que são numeradas a partir da extremidade 5' da molécula (WOESE *et al.*, 1983). O número total de hélices e suas localizações são características usadas para separar grupos filogenéticos (DAMS *et al.*, 1988).

Segundo Gray (1984) o gene 16S rRNA possui regiões com alta e baixa variabilidade, simultaneamente, as quais são denominadas de regiões variáveis (V) e regiões universais (U). Esse gene procariótico, possui 8 regiões universais (U1-U8) e 9 regiões variáveis (V1-V9), estas podem ser usadas para identificação de espécies (CHAKRAVORTY *et al.*, 2007), pois demonstram uma considerável sequência entre diferentes espécies bacterianas. Devido a essa característica é possível a amplificação de sequências-alvo utilizando primers universais (CHAKRAVORTY *et al.* 2007, LUDWIG e SCHLEIFER, 1994). A comparação de sequências de rRNA é uma ferramenta poderosa para deduzir relações filogenética evolutivas entre bactérias, arqueobactérias e eucariontes (WOESE *et al.*, 1990; WEISBURGE, 1991; CLARRIDGE III, 2004).

Por meio da utilização de sequências de 16S rRNA é possível obter maior confiabilidade nas análises moleculares para identificar e solucionar questões acerca de identificação de espécies bacterianas. Com o advento das técnicas de reação da polimerase em cadeia (PCR) (SAIKI *et al.*, 1988) e sequenciamento de DNA (SANGER *et al.*, 1977), de primeira e agora, nova geração, bem como o incremento exponencial de dados de nucleotídeos disponível na base corrente de do 16S rDNA, têm sido fundamentais na descoberta de novos microrganismos.

## 4. MATERIAL E METODOS

### 4.1 Coleta

Foram utilizadas para este trabalho amostras de abelhas sem ferrão da espécie *Melipona seminigra* coletadas em ninhos de criadouro (Meliponários). Cada ninho teve sua tampa aberta com auxílio de formão de apicultor. As abelhas que estavam sobre o disco de cria foram coletadas por catação manual (Figura 3), sendo utilizada luva estéril para tal. As abelhas foram colocadas em tubo falcon (Figura 3) também estéril até a soma de 20 indivíduos.

**Figura 3.** Coleta das abelhas por catação manual (a esquerda) e tubo falcon estéril contendo 20 indivíduos (a direita).



Foto: José Luiz Costa Mendes

As coletas foram feitas em 07 ninhos do Meliponário do GPA/ INPA na área urbana e 07 ninhos do Ramal do Brasileirinho no Km 12, zona rural de Manaus - AM, totalizando 14 ninhos (Tabela 1). As coletas ocorreram no período da tarde nos meses de abril, maio e junho de 2012. Sendo realizadas neste horário com intuito de encontrar o maior número de abelhas no interior do ninho, uma vez que as abelhas coletoras diminuem sua atividade externa ao ninho nesse período (KERR, 1996; BESMEIJER, 1997). Em seguida foi realizado o procedimento para isolamento bacteriano.

**Tabela 01.** Locais de coleta das abelhas

<b>Ninho</b>	<b>Data de coleta</b>	<b>Horário</b>	<b>Local</b>
166	09.04.12	14:00	GPA-INPA
195	13.04.12	14:20	GPA-INPA
176	13.04.12	14:40	GPA-INPA
147	17.04.12	14:20	GPA-INPA
190	17.04.12	14:40	GPA-INPA
02B	15.05.12	15:00	Brasileirinho
04B	15.05.12	15:20	Brasileirinho
06B	16.05.12	15:00	Brasileirinho
05B	21.05.12	15:00	Brasileirinho
07B	21.05.12	15:20	Brasileirinho
09B	23.05.12	15:00	Brasileirinho
11B	23.05.12	15:20	Brasileirinho
148	04.06.12	14:30	GPA-INPA
172	04.06.12	14:40	GPA-INPA

Locais de coleta das abelhas

#### **4.2 Preparo das amostras obtidas do tegumento de abelhas**

No laboratório, cada tubo falcon contendo 20 abelhas vivas coletadas foi submetido a -10°C durante 10 minutos para imobilização das mesmas. Após, com auxílio de luvas estéreis, suabes individuais estéreis foram umedecidos e passados no corpo de cada abelha e em seguida depositados em um tubo tipo falcon também estéril contendo 10 mL de solução Fosfato salina - PBS (NaCl 1,37mM, Fosfato 10 mM, HCL 2,7 mM, KCl 2,7mM) pH 7,4.

#### **4.3 Isolamento bacteriano**

Com o auxílio de pipeta foram transferidos 10µL, 50µL e 100 µL (a partir do obtido no item 5.2) para placas de Petri contendo ágar BHI (Brain Heart Infusion). Seguido de semeadura por superfície com alça de Drigalski, previamente esterilizada com álcool 100% mediante a chama de bico de Bunsen. As células foram espalhadas a fim de obter boa distribuição e isolamento bacteriano. Após foram incubadas em estufa bacteriológica a 30° C por 24 horas. A temperatura de incubação foi baseada na temperatura média interna dos ninhos que varia entre 28 e 32 °C (KERR *et al.* 1996).

Para construção de bacterioteca, em cabine de segurança biológica, cada colônia isolada foi inoculada com palitos estéreis em microplacas de 96 poços contendo 100µL caldo BHI, seguido das mesmas condições anteriores e período de crescimento. Após esse crescimento, cada placa foi repicada com auxílio de replicador bacteriológico previamente flambado para uma nova placa de 96 poços para ser utilizada nos ensaios descritos a seguir. Nas outras placas foram adicionados 100µL de glicerol 10% para estoque no ultrafreezer a -80°C.

#### **4.4 Testes de antagonismo contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.**

Para a realização de cada teste de interações antagônicas bacterianas frente a bactérias patogênicas American Type Culture Collection (ATCC), as culturas isoladas (indicadores) foram repicadas para placas de 96 poços contendo caldo BHI com auxílio de um replicador bacteriológico previamente flambado seguido de incubação a 30° C por 24 horas.

Os isolados foram inoculados em placas de Petri 150x15mm contendo ágar Muller-Hinton, na qual foi semeada a partir de suabe embebido na suspensão das culturas bacterianas ATCCS (Tabela 2) cedidas pela professora Dra. Luciana Leomil provenientes do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz) de Manaus, Amazonas. A absorvância da solução padrão 0,5 de McFarland variou de 0,08 a 0,10 utilizando um comprimento de onda de 625 nanômetros (ANVISA 2006). Em seguida, com auxílio de um replicador bacteriológico, os isolados foram repicados para a placa de Petri contendo o antibiótico Ampicilina 100mg/mL como controle positivo e a própria cepa ATCC foi utilizada como controle negativo. Em seguida foram incubados por 24 horas a 30° C por 24 horas.

Os testes foram feitos em triplicata e a análise das interações foi realizada mediante a presença ou ausência de halos. Para os isolados que apresentaram formação de halo em triplicata foram feitas semeaduras por esgotamento em placas de Petri contendo meio Agar Luria Bertani (LB). O material foi incubado mantendo-se nas mesmas condições anteriores e período de crescimento.

**Tabela 2.** Bactérias patogênicas *American Type Culture Collection* (ATCC).

<b>Microrganismo</b>	<b>Número da cepa ATCC</b>	<b>Morfologia - Gram</b>
<b>Staphylococcus aureus</b>	25927	Cocos – gram-positivo
<b>Enterococcus faecalis</b>	29212	Cocos - gram-positivo

Bactérias patogênicas *American Type Culture Collection* (ATCC) utilizadas para o teste de antagonismo.

#### **4.5 Identificação molecular**

##### **4.5.1 Extração de DNA genômico de bactérias**

Para extração de DNA genômico, utilizou-se o método de extração por fenol/clorofórmio (Sambrook e Russel, 2001) com modificações descritas a seguir. As células bacterianas isoladas foram inoculada em 5 mL de caldo LB a 30° C por 18 horas. Após esse crescimento, as células foram centrifugadas a 13.400 rpm por 3 minutos temperatura ambiente (esse procedimento foi realizado três vezes para concentração do sedimento).

Para a etapa de lise celular foi realizada a ressuspensão do sedimento em 400 mL de tampão TEN( 0,05M Tris-HCl, 0,05M EDTA, 0,1M ) e 40µl de Lisozima (20 mg/mL). Em seguida foi incubado por 01 hora em temperatura ambiente. Após foi adicionado 50µl de TRITON X-100 10% e 20µl de NaCl 3M seguido de incubação a 60°C por 5 minutos. Logo em seguida foi resfriado em temperatura ambiente, sendo então acrescentado 10µl de RNase A (10 mg/ml) e incubado por 30 minutos a 37°C. Em seguida foi adicionado 50µl de SDS 10% (homogeneizado) e 3µl de proteinase K (10mg/ml) para remoção de proteínas, e incubado por 15 minutos a 37°C.

Para o processo de lavagem das amostras, foi acrescentado 450µl de Fenol (para romper as células). Em seguida foi agitado gentilmente por 5 minutos e centrifugado a 13.400 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, obtendo-se as duas fases, a fase superior foi recuperada e acrescentado 450µl de Clorofórmio (agitando gentilmente por 5 minutos). Seguido de centrifugação a 13.400 rpm por 10 minutos a 4 °C. Para precipitação do DNA, foi acrescentado 40µl de NaCl 3M e vagarosamente etanol 100% a -20°C (misturado 30 vezes por inversão). O precipitado foi centrifugado a 13400 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o DNA foi hidratado acrescentando 1mL de etanol 70%. Após, o mesmo foi centrifugado por 13400 rpm durante 5 minutos a 4°C. O DNA foi secado em “speed vacuum” por 15 minutos. O sedimento foi ressuspendido com 30µl de tampão TE

(Tris-HCl 0,01M; EDTA 0,01M; pH8,0) e, após isso foi incubado a 56°C por 15 minutos para solubilização do DNA e armazenado por 18 horas a -20°C. Para visualização do DNA foi feita eletroforese em gel de agarose 0,8% em seguida o gel foi corado com brometo de etídio (0,5µg/mL) e visualizado e registrado em fotodocumentador.

#### **4.5.2 Identificação bacteriana por amplificação do gene 16S rRNA**

Para amplificação de parte do gene 16S rRNA (gene de uma região conservada de bactérias) foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores de acordo com Borneman e Triplett (1997): 530F (5' - TGA CTG ACT GAG TGC CAG CMG CCG CGG - 3') e 1492R (5' - TGA CTG ACT GAG AGC TCT ACC TTG TTA CGM YTT - 3'). Como controle de teste, foi utilizado o DNA bacteriano de *Escherichia coli* ATCC 25922. A reação de PCR teve um volume de 25 µL (2,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,25mM de dNTPs; 0,2 pmol/µL de cada iniciador; 0,03U/µL de *Taq* DNA polimerase; e tampão 10X) e DNA bacteriano entre 50 e 100ng. O sistema de amplificação foi realizado em termociclador Biocycle, e o perfil térmico de PCR foi de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos como segue: desnaturação das fitas-molde a 95°C por 40 segundos, pareamento dos iniciadores a 60°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos. E, enfim, um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos. Ao termino das ciclagens, os fragmentos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 0,8% e corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e fotografados sob a luz UV (Bio Agency 302 nm UV) para verificação dos fragmentos 16S rRNA amplificados, tamanho e concentração aproximada, utilizando o marcador de 1 kb da Promega.

#### **4.5.3 Precipitação dos produtos de PCR por PEG (polietilenoglicol)**

A purificação do DNA amplificado visa promover a eliminação de resíduos gerados ao final da reação de PCR, aumentando a qualidade das sequências produzidas. Foram transferidos para placas de PCR 50 µL de produto de PCR de cada amostra e adicionado o mesmo volume de PEG 20% (NaCl 2,5M, PEG 20%) seguido de incubação a 37 °C por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2500 rcf por 15 minutos em temperatura ambiente. Após, foi descartado o sobrenadante e a placa foi secada com papel toalha, seguido de centrifugação a 100 rcf por 1 minuto. Em seguida, foram acrescentados 125 µL de etanol 80% gelado em cada amostra e centrifugado a 1450 rcf por 2 minutos. Após, para remoção do etanol, descartou-se o sobrenadante e a placa foi centrifugada de forma invertida por 1 minuto a 100 rcf. Ao final da precipitação as amostras foram incubadas a 37°C

por 15 minutos. As amostras foram ressuspensas em 20  $\mu$ L água ultra pura. O produto purificado foi quantificado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g/ml), visualizado em UV e registrado em fotodocumentador.

#### **4.5.4 Reação de sequenciamento**

Na reação de sequenciamento foram utilizados 2  $\mu$ L de DNA purificado (50ng), em seguida para preparação do master mix da reação, adicionou-se 2 $\mu$ L de cada oligonucleotídeo iniciador, 2  $\mu$ L de tampão 5X (Tris-HCl 1M; MgCl<sub>2</sub> 1M) e 0,3 $\mu$ L de ABI BigDye (do kit de reação BigDye Terminator Cycle Sequencing Applied Biosystems). O volume final da reação de sequenciamento foi de 10 $\mu$ L. A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador (Applied Biosystems, 96 Well) com o seguinte protocolo: 25 ciclos de desnaturação a 96 °C por 10 segundos; anelamento a 50 °C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1:20 segundos.

Após a reação de sequenciamento foi realizada a precipitação dos produtos seguindo o protocolo de etanol/EDTA, adicionando-se sobre este 32,5  $\mu$ L de mix Etanol/EDTA (2.5  $\mu$ L EDTA 125mM; 30 $\mu$ L de Etanol 100%), em seguida o material foi agitado gentilmente por inversão e centrifugado durante 25 minutos em 2500 rcf a 4, em seguida foi secado para retirada do etanol e posteriormente foi adicionado 30 $\mu$ L de etanol 70%, novamente o material foi centrifugado por 15 minutos em 1450 rcf a 4°C em seguida foi deixado em estufa para incubação de 15 minutos a 37°C após a incubação foi ressuspensado em 10  $\mu$ L de formamida e foi gentilmente agitado em vórtex, em seguida o DNA foi desnaturado em termociclador a 95°C durante 1 minuto. Ao final as amostras foram submetidas à eletroforese capilar em sequenciador (ABI 3130- Applied Biosystems DNA sequence).

#### **4.5.5 Análises computacionais**

As sequências obtidas na reação de sequenciamento (Anexo) foram editadas retirando sequências não-alvo (“trimagem”), bem como avaliadas quanto a sua qualidade, utilizando o programa PHRED disponível no endereço (<http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>). Após a obtenção das sequências F(forward) e R (reverse) foi realizado alinhamento comparativo no banco de dados de genomas bacterianos depositados no “GeneBank” utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Searching Tool) (SHAEFFER *et al.* 2001) do “National Center for Biotechnology Information”(NCBI) e também foram comparadas com o banco de dados do “Ribossomal Database Project”(RDP).

## **4.6 Identificação Fenotípica**

A investigação das atividades metabólicas das bactérias “in vitro” é chamada de provas bioquímicas e são úteis para identificação de bactérias através das transformações químicas que ocorrem em um determinado substrato pela ação de um grupo de enzimas de um determinado microrganismo (BUSSE *et al.*, 1996).

### **4.6.1 Testes Bioquímicos para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas**

A identificação fenotípica bacteriana presuntiva foi realizada de acordo com o *V Manual de Microbiologia Clínica para Controle de Infecções de Serviços de Saúde*, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e Manual Bergey de Sistemática Bacteriológica (VOS *et al.*, 2009). Foram realizados 12 testes para bactérias gram-positivas e 14 testes para as gram-negativas, sendo 09 testes comuns para ambos.

#### **4.6.1.2 Coloração de Gram**

Colônias recém-crescidas e purificadas foram submetidas à coloração pelo método Gram. Através da coloração de Gram as bactérias podem ser classificadas em dois grandes grupos, Gram-positivas ou Gram-negativas. Os microrganismos gram-positivos são aqueles que retêm o corante cristal violeta devido ao aumento na quantidade de ácido teicóico e a diminuição da permeabilidade da parede celular aos solventes orgânicos, por conterem menos lipídeos na parede celular. A parede celular de bactérias gram-negativas possui grande quantidade de lipídeos (ALTHERTUM, 2008) que aumenta a permeabilidade aos solventes orgânicos permitindo a descoloração. Perdem, portanto, o cristal violeta, corando-se com o corante de fundo, safranina ou fucsina (MARTINEZ e TADEI, 2008).

Para realização do teste foi adicionada uma gota de 10µL de água deionizada em lâminas de vidro, com auxílio de uma alça bacteriológica foi retirada uma colônia bacteriana de culturas crescidas em placa de Petri e em seguida cada colônia foi friccionada para homogeneização sobre uma lâmina com água. Posteriormente foi feita a fixação por aquecimento do material em bico de Bunsen. Após a lâmina foi tratada por 1 minuto com o reagente cristal violeta seguido de rápida lavagem em água corrente. Na segunda etapa do processo as lâminas foram novamente cobertas por 1 minuto com o reagente Lugol, as quais foram descoradas com álcool-acetona por aproximadamente 15 segundos seguido de lavagem em água corrente. E finalizando o processo, foi adicionada solução de fucsina básica sobre as lâminas durante 30 segundos, novamente as lâminas foram lavadas em água corrente e

deixadas para secar em posição vertical em temperatura ambiente e visualizadas em microscópio óptico.

#### **4.6.1.3 Prova da Catalase**

Neste teste é verificado através da observação da reação da enzima catalase, que decompõe o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em oxigênio e água. Excluindo o gênero *Streptococcus*, e selecionando a maioria das bactérias aeróbias e as facultativas possuem essa enzima (FRANZOLIN, 2008). Para realização deste teste, com auxílio de uma alça de platina foram coletadas colônias isoladas de culturas bacterianas. Em seguida foi feita fricção do material em lâminas de vidro e sobre o esfregaço foi adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%, o resultado foi considerado positivo ao ser imediatamente observado formação de bolhas na reação.

#### **4.6.1.4 Teste da Oxidase**

O teste de oxidase verifica as hemoproteínas que contém ferro e funcionam como a última molécula na ligação da cadeia respiratória aeróbica, transferindo elétrons (hidrogênio) ao oxigênio com a formação de água. Esse sistema é encontrado em aeróbios e anaeróbios facultativos, este teste é importante na identificação de organismos que não possuem a enzima ou são anaeróbios obrigatórios é útil na identificação de colônias da família Enterobacteriaceae (todas negativas) e identificação de outros gêneros não fermentadores, como *Aeromonas*, *Pseudomonas* e *Pasteurella* (positiva) (FRANZOLIN, 2008). Para este procedimento foi feito um esfregaço de colônias bacterianas em papel filtro com auxílio de um bastão de vidro e posteriormente foi adicionada uma gota de reagente Kovacs para verificação da reação de oxidase. Colônias positivas indicam uma coloração rosada neste teste.

#### **4.6.1.5 Teste de Urease**

O substrato ureia é uma diamina do ácido carbônico, sendo frequentemente referida como uma carbamida. A hidrólise da ureia é catalisada por uma enzima específica uréase, rendendo duas moléculas de amônia ( $NH_3$ ). Em solução, a hidrólise da ureia fornece como produto final o carbonato de amônia. A uréase é um importante enzima relacionada a decomposição de compostos orgânicos, sendo considerada uma enzima constitutiva, pois é sintetizada pela bateria com ou sem presença da ureia.

A preparação do meio ágar urea Christensen se deu através da adição de urea 40% filtrada em filtros millipore 0,45  $\mu m$  no meio ágar urea base autoclavado, de acordo com as

recomendações do fabricante. Foram distribuídos 3mL do meio em tubos com rosca. Em seguida os tubos foram inclinados aproximadamente em ângulo de 45° para solidificação do meio. A inoculação das baterias a serem testadas seguiram as normas de semeadura em meio inclinado e incubadas a 35°C por 18 a 24 horas. O teste positivo (rosa escuro) significa que a bactéria possui a enzima urease, que hidrolisa a ureia em amônia, alcalinizando o meio e virando o indicador de pH vermelho-de-fenol de amarelo (pH 6,8) para rosa escuro (pH 8,0). No teste negativo, o meio permanece amarelo, mas com crescimento no meio, porque a bactéria se utiliza da peptona presente no meio.

#### **4.6.1.6 Teste em Agar citrato de Simmons**

Para o teste bacteriológico em citrato de Simmons, culturas bacterianas foram repicadas, com o auxílio de alça de platina, para tubos contendo meio ágar citrato de Simmons, preparado de acordo com as instruções do fabricante. Após a inoculação os tubos foram deixados em estufa bacteriológica sob as mesmas condições anteriores. Em seguida foi observado se ocorreu crescimento bacteriano. Como resultado positivo para bactérias que utilizam citrato como única fonte de carbono foi seguido o protocolo padrão do fabricante, o qual determina que os tubos contendo bactérias citrato positivo, mudam a coloração normal do meio de verde para a tonalidade azul. O teste negativo é a permanência da cor verde e sem crescimento, visto que nesse caso a bactéria não conseguiu utilizar a fonte de carbono e nitrogênio do meio, não sobrevivendo.

#### **4.6.1.7 Teste da glicose em meio OF (oxidação-fermentação)**

A fermentação é um processo anaeróbio em que a glicose é metabolizada até ácido pirúvico e, deste são produzidos diferentes produtos finais dependendo da espécie de bactéria, entre eles ácidos orgânicos. A respiração pode ser aeróbia ou anaeróbia por reações de oxido-redução da glicose. No entanto, há bactérias que não metabolizam a glicose.

O teste foi feito adicionando-se em meio OF autoclavado a quantidade de 5-10 gramas de glicose, filtrada em filtros millipore 0,45 µm, posteriormente o meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaio com rosca e deixados secar em fluxo laminar. Utilizando-se culturas bacterianas com crescimento de 24 horas em meio sólido, foi realizada a inoculação do material até o fundo dos tubos com auxílio de agulha bacteriológica.

Para verificação das reações de oxidação e fermentação é necessário que o material seja feito em duplicata, sendo cada reação verificada separadamente, visto que nos tubos para verificação de fermentação foi adicionado óleo mineral sobre a superfície do meio. Em

seguida os tubos foram incubados em estufa bacteriológica durante 24 horas em 30°C. Para as bactérias que foram positivas na reação de oxidação ocorreu alteração na coloração do meio de cultivo nos tubos, de verde escuro passou a ser amarelo, e para bactérias fermentativas, os tubos contendo meio de cultivo com óleo mineral na superfície também mudaram a coloração de verde escuro para amarelo.

#### **4.6.1.8 Teste em meio SIM**

Neste teste pode ser verificado destas três importantes características bacterianas descritas nos subitens a seguir. Com a utilização de agulha bacteriológica foi feito inóculo por punção central de colônias bacterianas crescidas em meio líquido, em seguida esse material foi armazenado em estufa bacteriológica durante 24 horas com temperatura de 30°C.

##### **4.6.1.8.1 Produção de ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S)**

Determina a liberação de ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S) por ação enzimática em aminoácidos sulfurados e tiosulfato de sódio, produzindo uma reação visível de cor negra, sendo esta uma reação positiva. Neste caso significa que a bactéria possui a enzima cisteína dissulfidrilase ou tiosulfato redutase, que age sobre os substratos específicos, produzindo o gás ácido sulfídrico, o qual reage com íons férricos, produzindo sulfeto ferroso, que precipita uma coloração negra. Não havendo esta coloração no meio, a reação é negativa.

##### **4.6.1.8.2 Motilidade**

Por ser um meio semi-sólido, as bactéria móveis crescem em todas as direções a partir da picada central, enquanto que bactérias imóveis só apresentam indicio de crescimento no local da picada (parte central do tubo).

##### **4.6.1.8.3 Indol**

O triptofano é um aminoácido que, quando degradado por certas bactérias, leva a formação principalmente dos seguintes produtos metabólicos intermediários: indol, escatol, (metilindol) e ácido idolacético. O indol é verificado se a enzima triptofanase liberada pelas bactérias agir sobre o triptofano contido no meio de cultura. Foi possível verificar a reação de indol quando adicionado cinco gotas do reativo (Kovacs) ao tubo com o inóculo bacteriano, o resultado é positivo se visível coloração vermelha em forma de anel no tubo (Franzolin, 2008).

## **4.6.2 Testes bioquímicos para bactérias Gram-positivas**

### **4.6.2.1 Teste de crescimento em Agar Chapman**

O Ágar Chapman ou Manitol Salgado é seletivo para o isolamento e contagem de estafilococos. Assim, com o intuito de confirmação do gênero *Staphylococcus* as amostras foram re-isoladas em Agar Chapman O indicador de pH é o vermelho de fenol, que indica uma reação positiva quando o meio ao redor das colônias se torna amarelo, e negativa quando permanece avermelhado. Cada colônia isolada recém-crescida foi semeada neste meio e incubada a 37° C por 18 - 24 horas.

### **4.6.2.2 Teste da coagulase em tubo**

Este teste baseia-se na presença de coagulase livre que reage com um fator plasmático formando um complexo que atua sobre o fibrinogênio formando a fibrina. Para o seguinte teste, colônias recém-crescidas no meio Agar Chapman foram inoculadas em um tubo de ensaio contendo 0,5mL de plasma de coelho com EDTA, incubadas por 18 – 24 horas a 35° C em estufa bacteriológica. O resultado positivo para este, foi observado pela formação de coágulo, e para o resultado negativo, a ausência do mesmo. O coágulo pode ser visualizado a partir de uma leve inclinação a 90° do tubo de ensaio.

## **4.6.3 Testes bioquímicos para Enterobactérias**

### **4.6.3.1 Teste em meio Ágar MacConkey**

O meio ágar MacConkey é um meio de cultura seletivo e diferencial, que possibilita diferenciar bactérias fermentadoras e não fermentadoras de lactose, selecionando também bacilos Gram-negativos. Pela presença de sais biliares e cristal violeta inibe o crescimento da maioria das bactérias Gram-positivas, contém vermelho neutro que cora bactérias fermentadoras de lactose, bactérias não fermentadoras de lactose não são coradas, ficando transparentes ou incolores no meio (FLOURNOY *et al.*, 1990). Neste teste células bacterianas purificadas e crescidas em meio líquido, foram inoculadas em placas de Petri contendo meio ágar MacConkey, preparado de acordo com as instruções do fabricante, em seguida o material foi incubado em estufa bacteriológica com temperatura de 30° C por 24 horas.

### **4.6.3.2 Teste da glicose**

Este teste determina a capacidade de um microrganismo fermentar a glicose incorporada a um meio base, podendo produzir ácido ou ácido com gás. Para a verificação da produção de gases bacterianos, o método utilizado foi através da adição de tubos de Durham invertidos em meio líquido vermelho de fenol. O material foi autoclavado durante 15 minutos a 121° C. A partir de colônias puras crescidas em 24 horas foram feitas inoculações nos tubos, utilizando-se alça de platina. A produção de gás foi evidenciada através das formações de bolhas no interior dos tubos de Durham invertidos, enquanto que a produção de ácido deu-se a partir da mudança da cor do meio de vermelho para amarelo.

#### **4.6.3.3 Teste da Lisina descarboxilase**

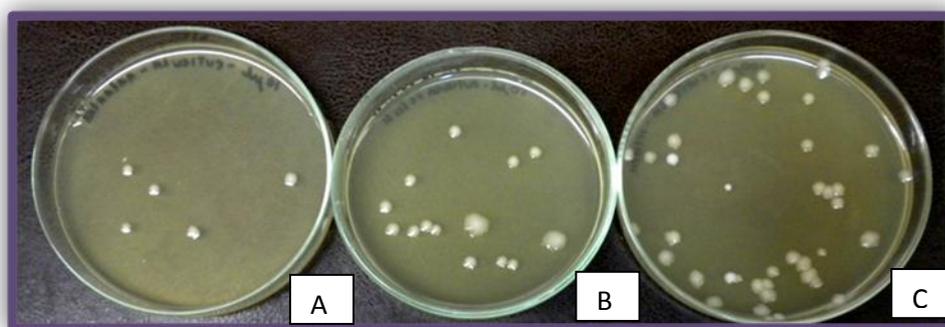
As enterobactérias capazes de descarboxilar a Lisina primeiro fermentam a glicose presente no meio, tornando-o amarelo (ácido). Uma vez o meio acidificado ocorre a ativação da enzima lisina-descarboxilase que provoca uma alcalinização do meio com nova mudança de cor, tendendo para o roxo. A prova é considerada negativa a través da mudança de cor para amarelo brilhante. O meio de cultura foi preparado de acordo com as recomendações do fabricante. Após a inoculação de colônias isoladas crescidas em 14 horas, adicionou-se 0,5 mL de óleo mineral para evitar penetração de oxigênio, pois esta reação só ocorre em anaerobiose.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Isolamento bacteriano

De 10 mL de solução preparada oriunda da lavagem da cutícula das abelhas foram realizadas três diluições: 10  $\mu$ L, 50  $\mu$ L e 100  $\mu$ L. A diluição de 100  $\mu$ L foi escolhida por apresentar maior número de unidades formadoras de colônias (UFC) e melhor distribuição isolada nas placas (Figura 4).

**Figura 4.** Diluição da solução proveniente da lavagem do tegumento das abelhas nas três diluições realizadas. A: 10 $\mu$ L, B: 50 $\mu$ L e C: 100 $\mu$ L. Detalhe para a placa C com maior número de UFCs isoladas.



Foram isoladas 1.049 UFCs da diluição de 100  $\mu$ L por contagem padrão em placa (Tabela 3) de 12 ninhos de meliponínios para construção da bacterioteca.

**Tabela 3.** Resultado do isolamento bacteriano dos 14 ninhos coletados.

Ninho	UFC	UFC/mL
06B (N06B)	88	$8,8 \times 10^3$
11B (N11B)	54	$5,4 \times 10^3$
07B (N07B)	26	$2,6 \times 10^3$
176 (N176)	89	$8,9 \times 10^3$
195 (N195)	96	$9,6 \times 10^3$
09B (N09B)	82	$8,2 \times 10^3$
02B (N02)	96	$9,6 \times 10^3$
04B (N04)	96	$9,6 \times 10^3$
147 (N147)	88	$8,8 \times 10^3$
190 (N190)	72	$7,2 \times 10^3$

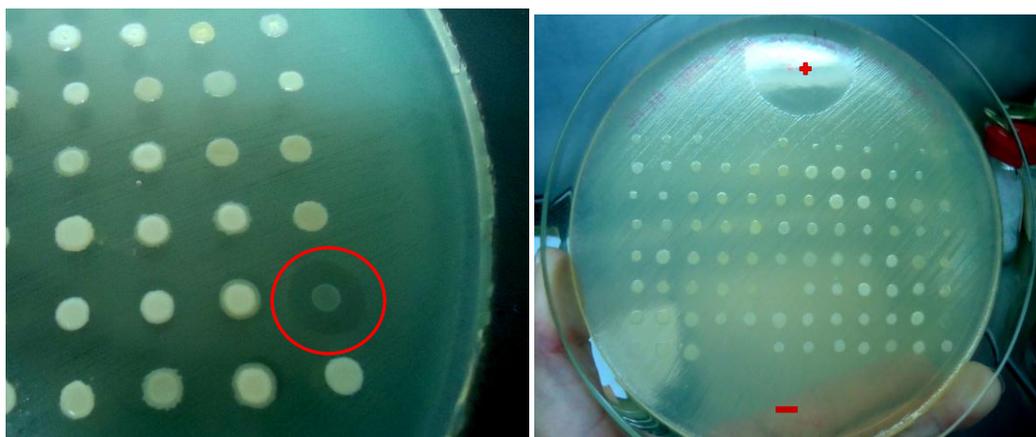
<b>05B (N05B)</b>	88	$8,8 \times 10^3$
<b>166 (N166)</b>	96	$9,6 \times 10^3$
<b>148 (N148)</b>	64	$6,4 \times 10^3$
<b>172 (N172)</b>	71	$7,1 \times 10^3$

Resultado do isolamento bacteriano dos 14 ninhos coletados.

## 5.2 Testes de antagonismo

Dos 1.049 isolados, 52 (4,95%) apresentaram formação de halo (Figura 5) em triplicata frente às linhagens de bactérias patogênicas (ATCCs), tendo a leitura realizada em 24 e 48 horas (Tabela 4), sendo considerados positivos para teste de antagonismo em placa. Cada isolado positivo foi identificado a partir da posição do poço da placa de 96 poços (Ex: G12) seguido do ninho de onde foi coletado (Ex: N166), portanto, G12N166. Os isolados 14 (G12 N166) e 23 (G3 N195) demonstraram inibir o crescimento das duas espécies ATCCs testadas.

**Figura 5.** Foto do teste de antagonismo. À esquerda: Resultado positivo do isolado 52 contra *S. aureus* ATCC 25927. À direita: Placa contendo a demonstração do teste de antagonismo bacteriano. Sinal (+): controle positivo (Ampicilina 100mg/ML) e sinal (-): controle negativo (*S. aureus* ATCC 25927).



**Tabela 4.** Resultado do teste de antagonismo dos 52 isolados.

Amostra	Isolado	S.A	E.F	Amostra	Isolado	S.A	E.F
1	D3-N195	S	N	27	B9-N6B	S	N
2	G12-N6B	S	N	28	D5-N166	S	N
3	H8-N166	S	N	29	C10-N166	S	N
4	E8-N166	S	N	30	D7-N166	S	N
5	C8-N166	S	N	31	G9-N166	S	N
6	E2-N166	S	N	32	E11-N166	S	N
7	A7-N166	S	N	33	F10-N166	S	N
8	E10-N166	S	N	34	G8-N166	S	N
9	C11-N1666	S	N	35	E12-N166	S	N
10	B6-N166	S	N	36	D10-N6B	S	N
11	B7-N6B	S	N	37	E2-N6B	S	N
12	G10-N7B	N	S	38	C11-N6B	S	N
13	C12-N166	S	N	39	B11-N9B	N	S
14	G12-N166	S	S	40	F8-N166	S	N
15	E9-N166	S	N	41	F11-N166	S	N
16	C12-N6B	S	N	42	D11-N166	S	N
17	C7-N166	S	N	43	F9-N166	S	N
18	G11-N166	S	N	44	G10-N166	S	N
19	B7-N166	S	N	45	B8-N166	S	N
20	H9-N166	S	N	46	D10-N166	S	N
21	SN-N166	N	S	47	H12-N166	S	N
22	D3-N6B	S	N	48	B10-N166	S	N
23	G3-N195	S	S	49	B11-N166	S	N
24	B12-N166	S	N	50	D9-N166	S	N
25	D2-N6B	S	N	51	A7-N6B	S	N
26	E3-N185	S	N	52	G8-N9B	N	S

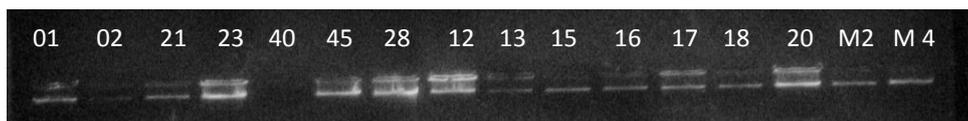
Resultado do teste de antagonismo dos 52 isolados. S.A = Formação de halo contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25927; E.F = Formação de halo contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; S= Sim,N= Não; Isolado: letra e número inicial corresponde a posição do isolado no poço (Ex: D3) seguido do ninho de onde foi coletado (Ex: N195), portanto D3-N195. Em vermelho estão os isolados que formaram halos contra as duas bactérias ATCCs testada.

Dos 14 ninhos estudados, seis ninhos (42,85%) apresentaram isolados que inibiram o crescimento das ATCCs testadas, sendo três (N195, N186 e N185) pertencentes ao GPA e três (N06B, N07B, N 09B) do Ramal do Brasileirinho. O ninho N166 apresentou maior número de isolados (36), ou seja, 69,23% do total. Dos 52 isolados, 48 (92,30%) inibiram o crescimento de *S. aureus*, 06 (11,53%) isolados inibiram *E. faecalis*, sendo que os isolados 14 e 23 inibiram o crescimento de ambos.

### 5.3 Extração de DNA genômico e amplificação do gene 16 S rRNA

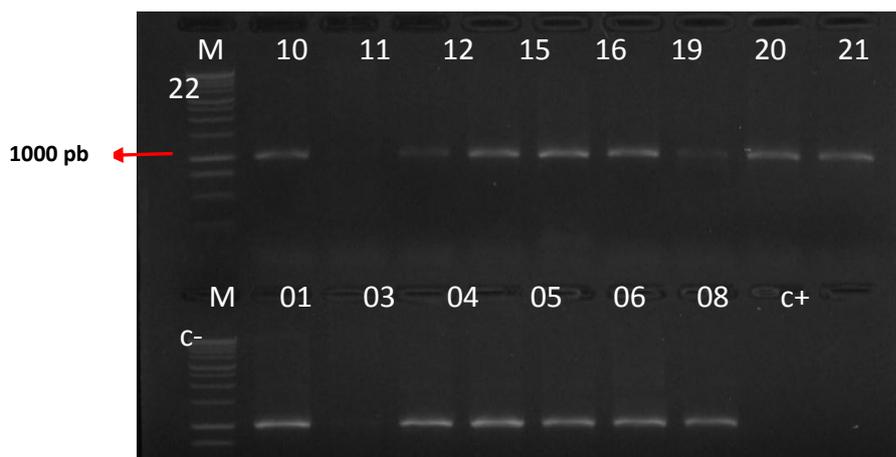
A extração de DNA foi realizada seguindo o protocolo de extração Fenol-clorofórmio conforme descrito no item 5.5. As amostras foram visualizadas em gel de agarose 0,8% e coradas com brometo de etídeo, visualizados em uv por meio de fotodocumentador (Figura 5). Como padrão de peso molecular foi utilizado o fago, Lâmbida ( $\lambda$ ) a 50 e 100 ng.

**Figura 6.** Foto da extração Fenol-Clorofórmio do DNA genômico em gel d agarose 0,8% com marcador de peso moléculas Lâmbida ( $\lambda$ ). M2 (50ng) e M4 (100ng).



Para amplificação do fragmento do gene 16S rRNA, o DNA genômico bacteriano extraído foi amplificado por PCR e comparado com marcador de peso molécula Ladder de 1 Kb (Figura 6). Após as amostras foram purificadas e utilizadas para a reação de sequenciamento.

**Figura 7.** Foto da amplificação do gene 16S rRNA por PCR em gel de agarose a 0,8%, mostrando o tamanho do fragmento de 1,000 pb. Controle positivo (C+): *E.coli* ATCC 25922. (C-): água deionizada. Marcador 1Kb Bioscience.

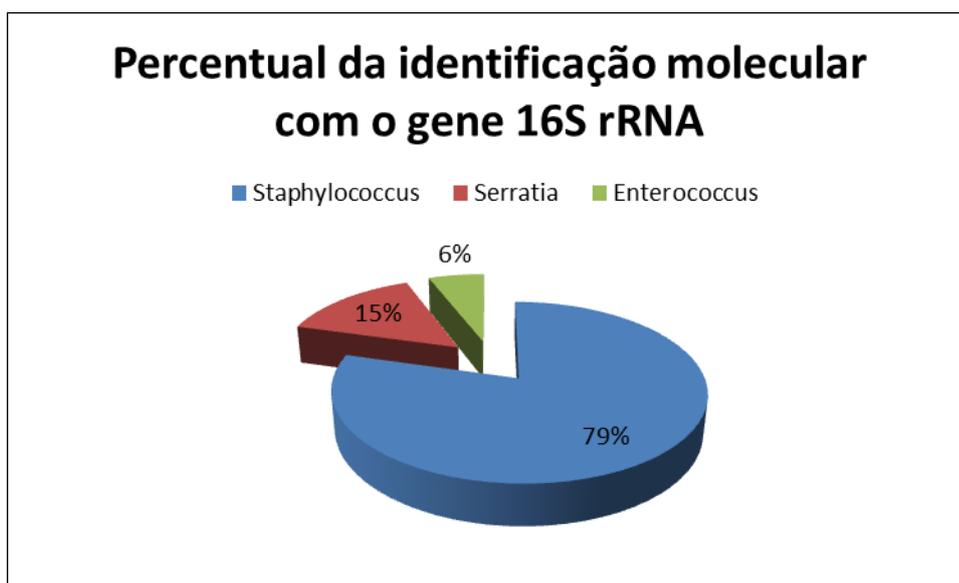


#### 5.4 Identificação molecular bacteriana

Das 52 amostras, 16 delas, os isolados 01, 23, 26, 28, 30, 06, 08, 12, 13, 21, 25, 26 27, 28, 34 e 39 não obtiveram sequenciamento e caracterização bioquímica satisfatória devido à necessidade de repetição dos ensaios, totalizando 16 amostras que deverão ser submetidas a análises posteriormente. Não houve insistências nessas amostras para preservar o cronograma dos trabalhos. As amostras identificadas a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA somaram 36. Os isolados 14 e 23 que apresentaram atividade contra as duas cepas ATCCs testadas foram identificados como *Staphylococcus sp.* e *Serratia sp.* respectivamente.

A identificação molecular foi realizada alinhamento comparativo entre espécies obtidos a partir do banco de dados do BLAST (Tabela 5). Na identificação molecular foram encontradas 03 famílias bacterianas: *Staphylococcaceae*, *Enterobacteriaceae* e *Enterococcaceae* (Tabela 5). Pertencentes a família *Staphylococcaceae* (77,7%), a mais representativa, foram identificadas 27 *Staphylococcus sp* (Gráfico 1), dos quais, 10 isolados foram identificados como *Staphylococcus cohnii*, e os outros 17 apenas a nível de gênero. Na família *Enterobacteriaceae* (19,44%) foram identificados 7 integrantes da família, sendo 5 pertencentes ao gênero *Serratia*. Os outros dois isolados (02 e 52) foram identificados apenas em nível de família. Pertencentes a família *Enterococcaceae* (5,5%) foram encontradas 02 amostras identificadas como *Enterococcus sp.*

**Gráfico 1.** Percentual de identificação molecular por gênero de bactérias isoladas do tegumento de *M. seminigra* a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA.



**Tabela 5.** Identificação molecular 16S rRNA de isolados de *M. seminigra*.

Identificação molecular 16S rRNA de isolados de <i>M. seminigra</i>							
Isolados	Família	Gênero	Espécie	Sentido	e-value	% cobertura	% ID
2	Enterobacteriaceae	-	-	F R	<b>0.0</b>	65%	69%
3	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. cohnii</i>	F	<b>0.0</b>	99%	99%
4	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	F R	<b>0.0</b>	82%	98%
5	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	F	<b>0.0</b>	85%	97%
7	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	F R	<b>0.0</b>	90%	98%
9	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	F	<b>0.0</b>	99%	99%
10	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	F	<b>0.0</b>	85%	97%
11	Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i>	<i>Serratia sp</i>	R	<b>0.0</b>	82%	99%
14	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	F	<b>0.0</b>	99%	99%
15	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. cohnii</i>	F R	<b>0.0</b>	96%	94%
17	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. cohnii</i>	F	<b>0.0</b>	97%	99%
18	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	F R	<b>0.0</b>	98%	99%
19	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	F R	<b>0.0</b>	89%	98%
20	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	F	<b>0.0</b>	98%	99%
22	Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i>	<i>Serratia sp</i>	FR	<b>0.0</b>	79%	97%
23	Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i>	<i>Serratia sp</i>	FR	<b>0.0</b>	87%	97%
24	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. cohnii</i>	F R	<b>0.0</b>	86%	98%
29	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. cohnii</i>	F R	<b>0.0</b>	89%	97%
31	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	F R	<b>0.0</b>	88%	96%
32	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	F R	<b>0.0</b>	71%	95%
35	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. cohnii</i>	F R	<b>0.0</b>	99%	98%
36	Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i>	<i>Serratia sp</i>	FR	<b>0.0</b>	90%	98%
37	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	F R	<b>0.0</b>	89%	98%
38	Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i>	<i>Serratia sp</i>	F	<b>0.0</b>	98%	99%
40	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	F R	<b>0.0</b>	84%	96%
41	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. cohnii</i>	F R	<b>0.0</b>	97%	99%
42	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	F R	<b>0.0</b>	98%	99%
43	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	F R	<b>0.0</b>	98%	99%
44	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. cohnii</i>	F	<b>0.0</b>	98%	100%
45	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	F R	<b>0.0</b>	84%	99%
46	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. cohnii</i>	F	<b>0.0</b>	99%	99%
48	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	F R	<b>0.0</b>	84%	98%
49	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	F R	<b>0.0</b>	90%	98%
50	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. cohnii</i>	F R	<b>0.0</b>	97%	99%
51	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	R	<b>0.0</b>	86%	87%
52	Enterobacteriaceae	-	-	R	<b>0.0</b>	87%	98%

Identificação molecular 16S rRNA de isolados de *M. seminigra*. Sentido: direção da fita de DNA 5'-3' sequenciada; e-value: índice estatístico contendo a probabilidade de erro do sequenciamento; % cobertura: percentual de cobertura; % ID: percentual identidade máxima.

## 5.5 Caracterização Fenotípica

### 5.5.1 Coloração de Gram

As características celulares dos isolados foram observadas após a coloração de Gram (figura 4). Foram analisadas no total 39 amostras, das quais 31 (79,48%) foram caracterizadas como cocos gram-positivos e 07 (20,52%) como bacilos gram negativos. As amostras 28,30 e 33 obtiveram apenas identificação bioquímica, sendo identificadas como cocos gram-positivos.

### 5.5.2 Testes bioquímicos

Foram realizados 09 testes bioquímicos para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas conforme descrito no item 5.6.1 (tabela 6 e 7).

#### 5.5.2.1 Bactérias gram-positivas

Para as bactérias Gram-positivas foram realizados ainda os testes de crescimento em ágar Champman, onde houve crescimento das 32 amostras e o teste de coagulase em tubo, onde apenas 06 amostras obtiveram resultado positivo. Portanto, através das provas bioquímicas pode-se caracterizar os isolados como *Staphylococcus sp*, sendo 24 pertencentes ao grupo dos *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) e 06 amostras pertencentes ao grupo *Staphylococcus* coagulase positivos (SNP) (Tabela 6). As duas amostras restantes foram identificadas como *Enterococcus faecalis* sp. Utilizou-se a chave de identificação do grupo 17 (Cocos gram-positivos) do Manual de Bergeys (VOS *et. al.* 2009) para caracterização das amostras.

**Tabela 6.** Identificação bioquímica de isolados Gram-positivos

Identificação fenotípica e molecular de isolados Gram positivos														
Isolado	Gram	Cat	Ox	Urea	Cit	Mot	H2S	Indol	OG	FG	Man	Coa	Espécie	Grupo
3	C+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
4	C+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
5	C+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
7	C+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
9	C+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCP
10	C+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
14	C+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCP
15	C+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
17	C+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
18	C+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
19	C+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCP
20	C+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
24	C+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
28	C+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
29	C+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
30	C+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
31	C+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	<i>Enterococcus sp.</i>	-
32	C+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
33	C+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
35	C+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
37	C+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCP
40	C+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
41	C+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
42	C+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
43	C+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
44	C+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
45	C+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
48	C+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCP
48	C+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
49	C+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
50	C+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	SCN
51	C+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	<i>Enterococcus sp.</i>	-

Identificação bioquímica de isolados Gram-positivos. Cat: catalase; urea: uréase; cit: citrato; mot: motilidade; H2S: ácido sulfúrico; OG: oxidação da glicose; FG: fermentação da glicose; man: manitol; coa: coagulase; SCN: *Staphylococcus* coagulase negativo; SCP: *Staphylococcus* coagulase positivo.

### 5.5.2.2 Bactérias gram-negativas

Para as bactérias Gram negativas foram incluídos os teste de crescimento em Agar MacConkey, onde as 07 amostras de bacilos Gram negativos cresceram no meio, sendo lactose negativas. Foram realizados ainda o teste no meio fenol red e descarboxilação da Lisina (Tabela 7). Utilizou-se a chave de identificação do grupo 05 (Bacilos gram-negativos aeróbios facultativos) do Manual de Bergeys (VOS *et. al.* 2009) para caracterização das

amostras. Os isolados foram identificadas como *Serratia liquefacies*, exceto a amostra 54, sendo apenas pertencente a família *Enterobacteriaceae*.

**Tabela 7.** Identificação fenotípica de Isolados Gram negativos

Identificação fenotípica de Isolados Gram negativos															
Isolados	Gram	lac	oxi	cat	OG	FG	mot	indol	H2S	ac	gás	uréia	lis	cit	IF
2	B-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	<i>Serratia liquefaciens</i>
11	B-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	<i>Serratia liquefaciens</i>
22	B-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	<i>Serratia liquefaciens</i>
23	B-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	<i>Serratia liquefaciens</i>
36	B-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	<i>Serratia liquefaciens</i>
38	B-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	<i>Serratia liquefaciens</i>
52	B-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	Enterobacteriaceae

Identificação bioquímica de isolados Gram-negativos pelos seguintes testes: Lac: lactose; oxi: oxidase; cat: catalase; OG: oxidação da glicose; FG: fermentação da glicose; mot: motilidade; H2S: ácido sulfídrico; ac: ácido a partir ad glicose; lis: lisina descarboxilase; cit: citrato.

## **6. DISCUSSÃO**

### **6.1 Abordagem geral**

Microrganismos procarióticos são muito difundidos em todos os ambientes da Terra, estabelecendo diversas interações com seres eucarióticos, incluindo insetos. Estas associações podem ser simbióticas, patogênicas ou de vetorização. Independentemente de cada tipo de interação, ela se inicia com sua adesão no hospedeiro, que pode se disseminar e ocasionar resposta imune ou simplesmente ficar em estado de agregação, fazendo parte da microbiota, e posteriormente voltar para o ambiente (SANCHEZ-CONTRERA, 2008).

De acordo com Moya e colaboradores (2008), vários estudos de associações simbióticas (comensalismo, parasitismo e mutualismo) têm sido realizados entre bactérias e intestino de insetos através de pesquisas em genômica e genética. Visto que mecanismos genéticos e moleculares utilizados pelos microrganismos estão relacionados para estabelecer a interação com o inseto.

O tegumento de abelhas, assim como os outros insetos sociais, apresenta uma barreira de proteção natural contra patógenos através de propriedades antimicrobianas (STOW, 2009), que pode também estar associada a uma microbiota resistente a esses compostos e que de alguma forma pode contribuir para a saúde das abelhas, de forma a inibir microrganismos competidores e até mesmo patogênicos. Os gêneros e espécies bacterianas encontrados neste estudo são amplamente relacionados com insetos sociais. No entanto, as interações bacterianas que ocorrem no tegumento de abelhas, bem como as substâncias produzidas pelas mesmas têm sido pouco exploradas, uma vez que relações de simbiose e/ ou mutualismo é muito comum em associações bacterianas e talvez possua implicações ao sucesso evolutivo dos insetos. Sabemos, portanto, que o tegumento de abelhas pode acarretar bactérias residentes ou esporádicas, sendo provenientes de plantas, do ambiente e de outros animais.

Estudos neste segmento devem ser realizados em maior amplitude, bem como o emprego de novas técnicas de sequenciamento para maior cobertura de identificação dos microrganismos presentes no tegumento de abelhas. Visto que o conhecimento desta população bacteriana pode ter grande importância nas relações ecológicas com esses insetos, pois o tegumento é a interface entre o inseto e o ambiente, precisando assim, de uma proteção natural que pode ser oferecida por seus próprios colonizadores.

## 6.2 Isolamento e teste de antagonismo

Vários estudos relatam a produção de substâncias tipo bacteriocinas em testes de antagonismo em meio sólido produzidas por bactérias gram-negativas, incluindo enterobactérias, e bactérias gram-positivas (*Staphylococcus sp.* e *Enterococcus sp.*) (TAGG *et al.*, 1975).

Testes de antagonismo realizados entre estafilococos são frequentemente citados na literatura, sendo inicialmente realizados por Florey e colaboradores (1946). Esse grupo bacteriano é bem conhecido devido à produção de várias substâncias inibitórias, incluindo fagos, enzimas bacteriolíticas e antibióticos (TAGG *et al.*, 1975). Tais interações antagônicas podem ter implicações biológicas para as abelhas sociais, bem como para a microbiota da superfície externa de outros animais (DILLON e DILLON, 2004), visto que possivelmente liberam substâncias antagônicas para eliminação de espécies competidoras e possivelmente patogênicas para o hospedeiro.

Certo número de estudos que envolvem a produção de substâncias tipo bacteriocinas foi demonstrado em meios sólidos (JONES e EDWARDS 1966; HALLANDER, 1968; TRUST, 1970). Neste trabalho, o meio de cultura Muller Hinton demonstrou ser satisfatório, tendo em vista sua utilização em testes de sensibilidade por ser rico em proteínas e carboidratos, fornecendo o substrato ideal para bactérias gram-positivas e gram-negativas, aeróbias ou anaeróbias facultativas.

Contudo, não podemos especificar que substâncias foram produzidas pelos isolados, uma vez que necessitam de um estudo mais aprofundado e nosso intuito era somente selecionar bactérias antagônicas para identificação. Pode-se sugerir que existem relações de inibição de crescimento entre os isolados e as amostras ATCCs testadas, mesmo não sendo pertencentes ao mesmo gênero, como pode ser observado através a inibição se *Staphylococcus aureus* pelo *Enterococcus sp.* e *Serratia sp.* Talvez ainda existam interações antagônicas entres os isolados e outras bactérias ambientais, sendo necessário a realização de novos testes, inclusive com patógenos de abelhas, algo importante para a apicultura mundial. O método de cultura em placa, portanto, é útil para reconhecimento preliminar e seleção de bactérias com resultado positivo. (TAGG *et al.* 1976).

Segundo Contrera-Sanchez e Vlisidou (2008), associação entre bactérias e insetos inicia-se com a adesão do microrganismo ao hospedeiro, onde este pode estabelecer-se evitando resposta imune do hospedeiro. A bactéria pode fazer parte da microbiota do inseto

ou ser transmitida de volta ao ambiente ou ainda, ser transmitida para um novo hospedeiro. Alguns desses microrganismos apresentam uma gama de hospedeiros, sendo que muitas dessas associações são altamente especializadas e envolvem não apenas certas espécies de insetos, mas estágios de vida específicos do inseto hospedeiro. Este é um reflexo das propriedades do nicho ecológico ocupado pelos insetos e microrganismos associados, sendo essas interações simbióticas ou patogênicas.

Microrganismos podem contribuir enormemente para o desenvolvimento do sistema imunológico do hospedeiro, digestão e bem-estar geral (MAZMANIAN, 2005). No entanto, podem causar danos aos organismos que os abrigam. Segundo Mattila (2012), as bactérias são notavelmente abundantes em colônias de abelhas. A amplitude da flora bacteriana (e outros micróbios) que são encontrados em colônias de abelhas pode também desempenhar um papel na saúde e vitalidade desses organismos, bem como em nossos próprios corpos em relação aos produtos apícolas consumidos (DILLON e DILLON, 2004).

### **6.3 Identificação Molecular e fenotípica**

Os resultados da análise 16S rRNA deste trabalho, ajudaram no estabelecimento da interpretação dos resultados dos testes bioquímicos, levando até a identificação taxonômica de bactérias a nível de gênero (BOUDEWIJSNS *et al.*, 2006). O método molecular parece ser mais prático e rápido em relação aos testes bioquímicos, porém um não exclui o outro, pois são de importância fundamental pra identificação taxonômica em nível de espécie, pois se trata da investigação metabólica dos isolados.

### **6.4 *Staphylococcus sp.***

Os *Staphylococcus* Crescem bem em elevadas condições de cloreto de sódio (10%), resistindo à dessecação, podem conservar-se no ambiente por um período maior. Crescem bem em temperaturas entre 35°-37° C, podendo também ter crescimento entre 18° C a 40° C, o que permite que sobrevivam bem no ambiente (VAN DUIJKEREN *et. al*, 2004). São divididos em dois grupos conforme a produção da enzima coagulase. Essa enzima confere a capacidade de coagulação do plasma sanguíneo, protegendo a célula bacteriana contra o sistema imune do hospedeiro, rotineiramente utilizada na identificação dos *Staphylococcus*. Quando possuem esta enzima são definidos como *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP) podem ser identificados como *S. aureus*, de acordo com sua resistência a antibióticos, e quando negativos, como pertencentes ao ECN (ANTUNES *et. al*, 2008). Todavia para a distinção das espécies do grupo dos SCN é necessária uma série de provas bioquímicas que

podem chegar a identificação em nível de espécie. Apesar de vários artigos tratarem da combinação de métodos para essa identificação, estes ainda são muito difíceis de executar, pelo grande número de provas e representarem um custo maior ao laboratório, devido ao número de reagentes requeridos para os testes (ANTUNES *et. al.*, 2008; DE PAULIS *et. al.* 2003). Por isso, os métodos de identificação molecular baseada no gene 16S rRNA podem ser importante na identificação de bactérias. A utilização de diversas técnicas moleculares, entre elas a reação em cadeia da polimerase (PCR), tem permitido grande evolução nas análises rotineiras de laboratórios clínicos e industriais. Incluindo até mesmo a análise de indivíduos que não são cultiváveis (NILSSON e STRON, 2002).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* sobrevivem bem em presença de oxigênio, no ambiente ou no indivíduo colonizado, abrangendo insetos, animais (NAGASE *et. al.*, 2002; VAN DUIJKEREN *et. al.*, 2004) e seres humanos e também em regiões onde a concentração desse gás é menor, como no interior do indivíduo. Podem ainda ter uma gama de hospedeiros ou de nichos sendo de estreita ou ampla distribuição, dependendo particularmente da espécie ou das subespécies deste gênero, alguns organismos podem ser isolados de uma variedade de produtos animais ou de fontes ambientais, algumas espécies podem ser patógenos oportunistas de humanos e podendo ser facilmente transmitida de animal para animal e, em alguns casos a partir de animais aos humanos. (SCHLEIFER e BELL, 2009).

Bactérias associadas a abelhas estão amplamente distribuídas no solo, água e ar, como também em alimentos armazenados no ninho e superfícies de plantas (NADARASAH, 2011, GLINSKI e JAROSZ, 1995). As atividades externas de vôo estão associadas à coleta de pólen, néctar, resina, barro (forrageamento) e transporte de lixo pra fora do ninho (CARVALHO-ZILSE, 2007), bem como a microbiota associada a essas substâncias pode ser aderida à cutícula das abelhas, além de fazerem parte microflora simbiótica para maturação do mel de abelha que consiste de bactérias gram-negativas, gram-positivas, gram-variáveis e dependendo das condições, leveduras. A presença de *Staphylococcus* sp. no trato digestivo de abelhas é bastante documentada (GILLIAM e TABER 1991; GLINSKI e JAROSZ 1995; RADA *et. al.*; 1997). Tem havido um aumento nos estudos relacionados aos estafilococos coagulase-positivos (SCP) resistentes a antibióticos (MAPLE *et. al.*, 1989; TESSI *et. al.*, 1997) presentes na microflora intestinal de abelhas. Segundo Ebrahimi e Lotfalian (2005), *Staphylococcus aureus* isolados do intestino de *Apis mellifera* apresentam, em média, 80% de resistência a eritromicina e penicilina.

De acordo com GLINSKI e JAROSZ (1992), bactérias podem penetrar na cavidade interna do inseto a partir de seu tegumento (SIKOROWSK e LAWRAWNCE 1997). Portanto,

essa estrutura das abelhas pode abrigar bactérias residentes, ou simplesmente carregá-las para o ninho, agindo como vetores, podendo ser benéficas ou não (CONTRERA-SANCHEZ e VLISIDOU, 2008). A associação entre bactérias e superfície de abelhas (colonização do tegumento) tem sido pouco explorada, por isso a composição desta microbiota ainda é desconhecida. Segundo STOW e colaboradores (2007 e 2009), as defesas antimicrobianas da cutícula de abelhas aumentam conforme a sociabilidade, sugerindo que poucas bactérias sobrevivam a essa primeira linha de defesa. Formigas urbanas, como os gêneros *Solenopsis* e *Camponotus* entre outros, carregam em sua cutícula várias espécies bacterianas (CHADEE e MAITRE, 1990; FAWLER *et al.*, 1993), atuando como disseminadoras de bactérias incluindo *Staphylococcus sp.* patogênicos aos humanos. Sendo encontrados inclusive *Staphylococcus aureus* resistentes a Meticlina (MRSA) em hospitais (RODOVALHO *et. al*, 2007). Há relato de *Staphylococcus cohnii* isolados de pele de humanos, primatas, cloaca de répteis (DICKSON *et al.*, 2001 ; KLOSS e WOLFSHOHL, 1991), ácaros sinantrópicos (HUBERT, J. *et. al.*, 2012), sendo estes frequentemente presentes em ninhos de abelhas sem ferrão como inquilinos, responsáveis por desidratar fezes das abelhas, vivendo na lixeira dos ninhos (ROUBICK, 1989).

### **6.5 *Serratia sp.***

Sete isolados (15%) foram identificados molecularmente como pertencentes à família Enterobacteriaceae, sendo 5 pertencentes ao gênero *Serratia*. Na identificação fenotípica, seis isolados foram identificados como *Serratia liquefaciens* Ewards e Ewin 1972, sendo que cinco isolados inibiram o crescimento de *S. aureus*, e apenas um isolado (52) inibiu o crescimento *E. faecali.*. *S. liquefacies* é um patógeno oportunista capaz de colonizar uma variedade de superfícies como água, solo, peixes, trato digestivos de roedores, plantas, insetos, peixes e humanos (GRIMONT e GRIMONT, 1979). Pode estar associada a importantes patógenos nosocomiais e patógenos de plantas (GRIMONT e GRIMONT, 1981). Este gênero possui dez espécies distintas de acordo com o Manual de Bergey de Sistemática Bacteriana (GRIMONT e GRIMONT, 2006).

Há uma extensa literatura sobre *Serratia sp* associada a diversos insetos (GRIMONT e GRIMONT, 2006; BUCHER, 1963), com por exemplo, *S. marcensces* que foi repetidamente isolada de larvas de *Apis mellifera* doentes no Sudão (EL SANOUSSI *et. al.*, 1987). Na ordem Hymenoptera, onde encontram-se as abelhas, tem predominância as associações de *S. marcensces* , *S. protealacumans* e *S.liquefacies* (GRIMONT, 1979), sendo consideradas patógenos potenciais de insetos. As espécies citadas causam uma septicemia letal, após a

penetração na hemocele (BUCHER, 1960), em estudo envolvendo setenta espécies de insetos e foram consideradas susceptíveis a inoculação de *Serratia* (BUCHER, 1963).

Várias pesquisas revelam que doses por injeção intra-hemocélica de espécies de *Serratia* podem ser letais em estudos realizados com larvas de besouros e indivíduos adultos (GRIMONT e GRIMONT, 2006). Contudo, a hemolinfa de insetos, normalmente é bactericida para não patogênicos, mas não pode eliminar a multiplicação de patógenos em potenciais (STEPHENS, 1963). Esta espécie, assim como outras do mesmo gênero produz várias enzimas hidrolíticas para o meio circundante, incluindo duas proteases, pelo menos uma quitinase, lipase, fosforilase e nuclease (HINES *et al.*, 1988, GIVSKOV *et. al.*, 1988). Proteases ou quitinase de *Serratia* são muito tóxicas ao entrar na hemocele dos insetos , desempenham um fator de virulência ( KASKA 1976, LYSENKO, 1976) para com os insetos, danificando o epitélio do intestino médio, favorecendo a entrada de bactérias (SIKOROWSK e LAWRWNCE, 1997, KASKA, 1976).

A presença de cepas dessas espécies no intestino de insetos é oriunda de plantas. Já a multiplicação de *Serratia* no trato digestivo desses invertebrados ainda não foi estudada quantitativamente, no entanto, a presença de substâncias antibactericidas em folhas ingeridas pode interferir na multiplicação bacteriana. Algumas estirpes de *Serratia* foram consideradas resistentes a esses agentes (KUSHNER e HARVEY, 1962) e podem estar associadas a epizootias (GRIMONT e GRIMONT, 2006).

Até a conclusão deste trabalho, não há relatos da presença de *Serratia sp*, especificamente, no tegumento de abelhas. No entanto, este gênero está sempre relacionado à insetos saudáveis, doentes e mortos (ADAMO 2004, LABATTE 2004). *Serratia liquefaciens* é o principal grupo de *Serratia* não pigmentada associada a insetos, sendo esta característica pertencente à minoria do gênero (GRIMONT e GRIMONT, 1981). Tal característica fenotípica entre outras corrobora com as provas bioquímicas realizadas neste estudo. Esta espécie, assim como outras do mesmo gênero produz várias substâncias (HINES *et al.*, 1988, GIVSKOV *et. al.*, 1988).que podem inibir a presença de outras bactérias e fungos, como o que ocorre com *Serratia plymutica* que produz antibiótico inibindo o crescimento de *Candida albicans* (SHOJI *et al.* 1989).

## **6.6 *Enterococcus sp.***

Duas amostras (5,5%) foram identificadas como *Enterococcus sp*. Este gênero é constituído de bactérias gram-positivas, catalase negativo, não formadora de esporos e

anaeróbia-facultativa, capazes de viver em diversas tensões ambientais como temperaturas extremas (5°- 65°C), pH (4,5 – 10) e alta concentração de cloreto de sódio, o que lhe permite colonizar uma grande variedade de nichos. Possuem fatores de virulência como a proteína extra-celular Esp e de agregação (Agg) que ajudam a colonização no hospedeiro. Este gênero pertence ao grupo de Bactérias ácido-láticas (LAB), pois produzem bacteriocinas (FISHER e PHILLIP, 2009), sendo caracterizado pelo baixo teor de C+G (citosina e guanina), sendo 50% menor (KLEIN *et. al.*, 1998).

Como o gênero *Enterococcus* tem sido reconhecido desde 1899 como um organismo intestinal (STILES e HOLZAPFEL, 1997), a sua taxonomia e ecologia foram revistos por Klein em 2003. De acordo com a revisão, muitas tentativas têm sido feitas para diferenciar *Enterococcus* de *Streptococcus* a partir de 1937, quando Sherman classificou enterococos (estreptococos fecais) dentro de um subgrupo dos estreptococos. No entanto, métodos tradicionais como biotipagem e sorotipagem mostram que na verdade pertencem ao gênero *Enterococcus* (SAEED *et.al.*, 2002). Além disso, em 1984 com o avanço das técnicas moleculares através do sequenciamento do gene 16S rRNA, estabeleceu-se que 28 espécies de *Streptococcus*, migraram para um novo gênero: *Enterococcus* (FOULQUIE *et. al.*, 2006).

A literatura evidencia que este gênero ocorre aleatoriamente em algumas espécies e gêneros de insetos, sendo encontrado em várias partes de seu corpo (MARTIN e MUNDIT, 1973). Normalmente também habitam o trato digestivo de humanos, além de serem isolados de fontes ambientais e animais. (FISHER e PHILLIPS, 2009). Por muitos anos, acreditava-se que *Enterococcus* sp. era inofensivo para os seres humanos e considerado sem importância médica. Nos últimos tempos, os enterococos tornaram-se um dos patógenos hospitalares mais comuns, com pacientes com alta taxa de mortalidade de até 61% (De Fatima Silva Lopes *et. al.*, 2005). Atualmente algumas espécies têm sido utilizadas como probióticos e culturas iniciadoras (FOULQUIE *et. al.*, 2006), ou seja, bactérias viáveis que são adicionadas em produtos alimentícios com a finalidade de melhorar a qualidade sanitária, as características sensoriais e reduzir nitritos (BALDUINO *et. al.*, 1999), pois esse grupo de bactérias tem habilidade na produção de substâncias antimicrobianas e bacteriocinas.

## **7. CONCLUSÕES**

1. Testes fenotípicos e moleculares proporcionaram melhores resultados quando analisados em conjunto, visto que são complementares.
2. Os testes de antagonismos demonstraram ser satisfatórios para triagem de bactérias antagonicas, principalmente gram-positivas.
3. As espécies e os gêneros identificados neste trabalho corroboram com a literatura ainda insipiente e esparsa sobre microbiota associada a insetos, principalmente com as abelhas sociais, podendo ser encontrados no tegumento, ninho e no ambiente externo.

## 8. PERSPECTIVAS

Para ampliação do conhecimento da interação entre abelhas sem ferrão e micro-organismos apontamos alguns tópicos para continuidade desta pesquisa:

- **Testes contra bactérias Gram-negativas:** Para completar o diagnóstico de interações antagonistas da população bacteriana (bacterioteca) abarcada neste estudo é viável a identificação de atividades inibitórias para ATCCs gram negativas.
- **Testes contra patógenos de abelhas:** São recomendáveis para beneficiar o universo da criação não somente dos meliponíneos, mas de outros grupos (importantes para comercialização do mel e subprodutos das abelhas), visto que esta caracterização microbiológica, voltada para tegumento, ainda é insipiente.
- **Caracterização de substâncias inibitórias:** Uma vez confirmada a presença de atividade antagônica existente entre bactérias do tegumento de abelhas e bactérias ATCCs, torna-se imprescindível a caracterização das substâncias inibitórias para conhecimento de suas propriedades químicas e aplicações biotecnológicas.

## 9. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Atividades	2011										2012										2013					
	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M
Revisão bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Obtenção de créditos	x	x	x	x	x	x	x	x																		
Preparação do plano			x	x	x		x	x	x	x																
Entrega do plano											x															
Aula de qualificação												x														
Ajuste metodológico											x	x														
Coleta das amostras													x	x	x											
Isolamento bacteriano													x	x	x											
Teste de antagonismo																x	x									
Extração de DNA																	x	x								
PCR 16S rRNA																		x	x							
Purificação																		x	x							
Sequenciamento																				x	x					
Análise das sequências de DNA																				x	x					
Identificação fenotípica																					x	x				
Análise dos resultados																					x	x				
Redação da dissertação																					x	x	x	x		
Defesa																										x

## 10. ORÇAMENTO

### 10.1 Custeio 1 – Material de consumo - Reagentes e Kits

qtde	Descrição	Apresentação	Vl. Unit. (R\$)	Valor total (R\$)
2	Ácido acético C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> (L)	1 L	65,00	130,00
2	ácido Bórico	150g	150,00	300,00
2	Ácido clorídrico P.A. HCl (L)	1 L	12,00	24,00
2	Agarose	100g	500,00	1.000,00
5	Álcool etílico anidro C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (L)	1 L	12,00	60,00
1	Amido solúvel anidro (Merck) (500g)	1 frasco	450,00	450,00
1	Azul de metileno (100 g)	1 frasco	72,00	72,00
1	Cloreto de sódio NaCl (kg)	1 kg	20,00	20,00
2	DNA ladder 100Kb	100 Kb	560,00	1.120,00
2	DNA ladder 1Kb	1Kb	600,00	1.200,00
2	Edta	100g	50,00	100,00
10	Gelo seco (kg)	1 kg	10,00	100,00
1	Glicerina (L)	1 L	20,00	20,00
5	H <sub>2</sub> O Miliq (L)	1 L	80,00	80,00
1	Hidróxido de sódio NaOH (kg)	1 kg	15,00	15,00
3	Kit purificação de produto de PCR e gel de agarose	51 reações	800,00	1.800,00
2	PCR mix	250 reações	1.200,00	2.400,00
3	pGEMTeasy	50 reações	780,00	2.340,00
50	Pares de base (primers) PCRs, RT- PCR, Síntese 2ª fita cDNA	1 base	3,50	175,00
1	Red Gel (corante substituinte do Brometo de Etideo para geis de agarose)	1 frasco	980,00	980,00
1	Solução de pH 4,0 (250 mL)	1 frasco	19,00	38,00
1	Solução de pH 7,0 (250 mL)	1 frasco	19,00	38,00
1	Taq DNA Pol	100 unidades	280,00	280,00
5	tris base	100g	180,00	900,00
1	Kit Coloração de Gram.	4 frascos	80,00	80,00
1	Meio de cultura Muller Hinton	1 frasco	450,00	450,00
1	Meio de cultura BHI caldo	1 frasco	250,00	250,00
1	Meio de cultura BHI Agar	1 frasco	250,00	250,00
1	Fenol	1 frasco	60,00	60,00
1	Clorofórmio	1 frasco	60,00	60,00

<b>Subtotal custeio 1 – Material de consumo – Reagentes e Kits</b>	<b>14.792,80</b>
--	------------------

## 10.2 Custeio 2 – Material de consumo – Vidrarias e Plásticos

qtde	Descrição	Apresentação	Vl. Unit. (R\$)	Valor total (R\$)
1	Placas para microtitulação (ELISA)	100 placas	410,00	410,00
1	Microplacas para PCR	100 placas	300,00	300,00
2	Placas para qRT-PCR	100 placas	25,00	50,00
1	Ponteiras 10 uL	pacote de 1000unidades	70,00	70,00
1	Ponteiras 200uL	pacote de 1000unidades	70,00	70,00
1	Ponteiras 1000uL	pacote de 1000unidades	70,00	70,00
1	Ponteiras 10uL c/ filtro	pacote de 100unidades	150,00	150,00
1	Ponteiras 200uL c/filtro	pacote de 100unidades	150,00	150,00
1	Ponteiras 1000uL c/filtro	pacote de 100unidades	150,00	150,00
1	Rack multiuso estação de trabalho para setup de PCR entre outros	1 unid	26,00	26,00
1	Proveta plástico 10mL	1 unid	9,00	9,00
1	Proveta plástico 100mL	1 unid	35,00	35,00
1	Proveta plástico 1000mL	1 unid	150,00	150,00
2	Erlenmeyer plástico 50mL	1 unid	8,50	16,00
1	Proveta vidro 10mL	1 unid	7,00	7,00
1	Proveta vidro 100mL	1 unid	33,00	33,00
1	Proveta vidro 500mL	1 unid	75,00	75,00
1	Erlenmeyer vidro 50mL	1 unid	9,00	9,00
1	Erlenmeyer vidro 200mL	1 unid	25,00	25,00
1	Erlenmeyer vidro 500mL	1 unid	45,00	45,00
1	Copo de Becker vidro 100ML	1 unid	21,00	21,00
1	Copo de Becker vidro 500ML	1 unid	45,00	45,00
1	Erlenmeyer 250 mL	1 unid	25,00	25,00
1	Erlenmeyer 125 mL	1 unid	20,00	20,00
1	Becker 100 mL	1 unid	15,00	58,00
1	Copo de Becker vidro 1000ML	1 unid	58,00	58,00
10	Placas Petri, tam. grande, plástico, estéreis, pct com 20 und.	pacote com 20 Unid.	42,00	420,00
50	Tubo Falcon	1 unid	1,50	75,00
2	tubo de ensaio	Cx	50,00	100,00
3	Lâminas (caixa com 50 unidades)	1 cx	5,50	16,50
<b>Subtotal Custeio 2 – Material de consumo – Vidrarias e Plásticos</b>				<b>2.688,50</b>

### 10.3 Custeio 3 – Material de consumo – Material de escritório

qtde	Item	Descrição	Vl. Unit. (R\$)	Valor total (RS)
1	Material de escritório	(cartucho, papel, etiqueta, CD, entre outros)	200,00	200,00
<b>Subtotal Custeio 3 – Material de consumo –Material de escritório</b>				<b>200,00</b>

### 10.4 Custeio 4 – Passagens e Diárias

qtde	Item	Descrição do trecho	Vl. Unit. (R\$)	Valor total (RS)
1	Passagens aéreas	Manaus- Foz do Iguaçu - Manaus	1.200,00	1.200,00
6	Diárias		160,00	960,00
1	Passagens aéreas	Manaus-Ribeirão Preto - Manaus	1.200,00	1.200,00
6	Diárias		160,00	960,00
<b>Subtotal Custeio 3 – Passagens e diárias</b>				<b>4.320,00</b>

### 10.5 Orçamento Geral da Proposta

Rubrica	Subtotal (R\$)
Custeio 1 – Material de consumo - Reagentes e Kits	14.972,00
Custeio 2 – Material de consumo – Vidrarias e Plásticos	2.688,50
Custeio 3 – Material de consumo –material de escritório	200,00
Custeio 4 - Passagens e Diárias	4.320,00
<b>Total geral</b>	<b>22.000,50</b>

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABSY, M. L.; CAMARGO, J. M. F.; KERR, W.E.; MIRANDA, I. P. A. **Espécies de plantas visitadas por Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) para coleta de pólen na região do médio Amazonas.** Revista Brasileira de Biologia vol. 44, n 2, p. 227-237. 1984.
- ANDERSON, R. M. & MAY, R. M. **The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts.** Phil. Trans.R. Soc. Lond. v. 291, p. 451–524. 1981.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a antimicrobianos.** Módulo 2, p. C.1-4.2006.
- ALTERTHUM, F. **Morfologia e Estrutura da Célula Bacteriana.** In: TRABULSI, L. R. ALTERTHUM, F. (Eds). *Microbiologia*. Atheneu, São Paulo. p. 7-19. 2008.
- APONTE, O. I. C. **Arthropodes associated with colonies of stingless bees (Apidae: Meliponinae).** vol. 4, p. 3-6. 1996.
- ASSIS, M. G. P. **Criação prática e racional de abelhas sem ferrão da Amazônia.** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 46 p. 2001.
- BANDO, SILVA YUMI. **Taxonomia Bacteriana.** In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. Atheneu, São Paulo. p. 51-55. 2008.
- BALDUINO, R.; OLIVEIRA, A. S.; HAULY M. C. **Cultura láctica mista com potencial de aplicação como cultura iniciadora em produtos cárneos.** Ciênc. Tecnol. Aliment. vol.19, n 3. 1999.
- BEZERRA, J. M. D.; PERUQUETTI, R.C. e KERR, W. E. **Adaptive behavior of *Scotocryptus melitophilus* Reitter (Coleoptera: Leiodidae) to live with its host *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera:Apidae).** Revista Brasileira de Zoologia. vol.17, n. 1, p.199-203. 2000.
- BIESMEIJER, J.C. **Abejas sin aguijón: su biología y la organización de la colmena.** Universiteit Utrecht. Costa Rica. 77 p.1997.
- BOMAN HG, HULTMARK D. **Cellular immunity insect free.** Annu Rev Microbiol. vol. 41, p. 103-126. 1987.
- BUARQUE DE HOLANDA, S. **A Cera e o Mel.** Rio de Janeiro. RJ.1957.
- BUCHER, G. E. **Nonsporulating bacterial pathogens.** In: Steinhaus, E. A. **Insect pathology.** Anadvanced Treatise Academic Press. New York. vol. 2, p. 117–147. 1963.
- BUCHER, G. E. **Transmission of bacterial pathogens by the ovipositor of a hymenopterous parasite.** Journal of Insect Pathology. vol. 5, p. 277–283. 1963.

BUSSE, H. J.; DENNER, E. B. M.; LUBITZ, W. **Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem.** Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of Biotechnology*. vol. 47, p. 3-38, 1996.

CAMARGO, J.M.F., PEDRO, S.E.M. Meliponini Lepeletier, 1836. In: MOURE, J. S.; URBAN, D.; MELO, G. A. R. **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region.** Acesso em 28 Jul 2011. 2008.

CARVALHO-ZILSE, G. A.; KERR, W.E. **Natural substitutions of queens and flight distance of males in tiuba (*Melipona compressipes fasciculata* Smith, 1854) and uruçú (*Melipona scutellaris* Latreille, 1811)(Apidae, Meliponini).** *Acta Amazônica*. vol. 34, n.4, p. 649-652. 2004.

CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. A.; SODRÉ, G.S.; MARCHINI, C.; ALVES, R. M. O. **Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química.** Série meliponicultura. vol. 4. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI-BA. 32pp. 2005.

CARVALHO-ZILSE, G.A. **Meliponicultura na Amazônia. Anais do VII Encontro sobre Abelhas.** Ribeirão Preto. SP. 2006.

CARVALHO-ZILSE, G.; PORTO, L. E.; SILVA-NUNES, C.G.; PINTO, F. C. **Atividades de vôo de operárias de *Melipona seminigra* (Hymenoptera:Apidae) em um sistema agroflorestal da amazônia.** *Biosci. J.*, SP. vol. 23, n. 1, p. 94-99. 2007.

CASE, R.J.; BOUCHER, Y.; DAHLLOF, I.; HOLMSTROM, C.; DOOLITTLE, W. F.; KJELLEBERG, S. **Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies.** *Appl. Environ. Microbiol.* vol.73, n. 1, p. 278–288. 2007.

COENYE, T.; VANDAMME, P. **Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes.** *Microbiology Letters*. vol. 228, n.1, p. 45–49. 2003.

COLWELL, R. **Microbial diversity: the importance of exploration and conservation.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. vol.1, n.5, p. 302-307. 1997.

CHADEE, D.D.; MAITRE, A. **Ants:potencial mechanical vectors of hospital infections in Trinidad.** *Trasn Royal Soc Trop Med and Hyg.* vol. 84, n. 2, p. 297. 1990.

CHAKRAVORTY, S., HELB, D., BURDAY, M., CONNELL, N., ALLAN, D. **A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria.** *Journal Microbiological Methods*. vol. 69, n. 2, p.330–339. 2007.

CLARRIDGE, J. E. **Impact of 16S rRNA gene sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases.** *Clinical Microbiology Reviews*. vol. 17, p. 840-862. 2004.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; NARUTO, E.; PIRANI, J.R. **Flores e abelhas em São Paulo.** EDUSP. 1993.

COUTINHO, H. L. C; OLIVEIRA, V.M.; MANFIO, G. P. **Diversidade microbiana em amostras ambientais.** In: GARAY, I. E DIAS, B. Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais. Editora Vozes, Petrópolis. p. 215-232. 2001.

CRUZ-LANDIM, C. **Bacteria present in the intestinal tract of *Melipona quadrifasciata anthioides* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae).** J. Hym. Res. vol. 5, p. 264-272. 1996.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: Morfologia e funções de sistemas.** UNESP. São Paulo. p.185-188. 2009.

DAMS, E.; HENDRIKS, L.; VAN DE PEER, Y.; NEEFS, J-M.; SMITS, GEERT.; VANDENBEMPT, I.; WACHTER, R. **Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences.** Nucleic Acids Res., v. 16, p. 87-173, 1988.

DICKINSON, V.; DUCK, T.; SCHWALBE, c.; JARCHOW, J.; TRUEBLOOD, M. **Nasal and cloacal bacteria in free-ranging desert tortoises from the western United States.** Journal of Wildlife Diseases, vol.37, n.2, p. 252, 2001.

DILLON, R.J. e DILLON, V.M. **The Gut Bacteria of Insects: Nonpathogenic Interactions.** Annual Review of Entomology. vol. 49, p. 71-92. 2004.

DWYER, G. e ELKINGTON, J. S. **Using simple models to predict virus epizootics in gypsy moth populations.** J. Anim.Ecol. vol. 62, p.1-11.1993.

GRIMONT, P. A. D. e GRIMONT, F. **The genus *Serratia*.** Annu. Rev.Microbiol. vol. 32, p.221-248. 1978.

EBRAHIMI, A. e LOTFALIA, S. H. **Isolation and antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* and coagulase positive *Staphylococcus aureus* from honey bees digestive tract.** Iranian Journal of Veterinary Research. vol.6, n.2. 2005.

EICKWORT, G.C. **Association of mites with social insects.** Annu. Rev. Entomol. vol. 35, p.469-488.1990.

EL SANOUSSI, S. M.; EL SARAG, M. S. A.; MOHAMED, S. E. **Properties of *Serratia marcescens* isolated from diseased honeybee (*Apis mellifera*) larvae.** Journal of General Microbiology. vol.133, p. 215-219. 1987.

EVANS, J.D. e ARMSTRONG, T.C. **Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease.** BMC Ecology. vol. 6, n.4, 9pp. 2006.

EWALD, P. W. **Evolution of infectious disease.** Oxford University Press.1994.

FILSHIE, B. K. e CAMPBELL, C. I. **Design of an insect cuticle associated with osmoregulation: The porous plates of chloride cells in a mayfly nymph.** Tissue and cell. v.16, n. 3, p. 789-803. 1984.

FISHER, K. e PHILLIPS, C. **The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*.** Microbiology. vol. 155, p.1749-1757. 2009.

FLOREY, H. W. **The use of micro-organisms for therapeutic purposes.** Yale J. Biol.Med. vol.19, p.101-117. 1946.

FLOREY, H. W.; E. CHAIN, N. G.; HEATLEY, M. A.; JENNINGS, A. G.; SANDERS, E. P. ABRAHAM.; M. E. FLOREY. **Antibiotics from bacteria In The antibiotics.** Oxford University Press. London. vol.1, p. 417-565. 1949.

FLOURNOY, D. J.; WONGPRADIT, S.; SILBERG, S.L. **Facilitating Identification of Lactose-Fermenting Enterobacteriaceae on MacConkey Agar.** Proceeding of the Oklahoma Academy Science. vol.70, p. 5-8. 1990.

FLOREY, H. W. **The use of micro-organisms for therapeutic purposes.** Yale J. Biol.Med. vol.19, p.101-117. 1946. *In:* TAGG, J. R.; DAJANI A. S.; WANNAMAKER, L. W. **Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria.** Bacteriological Reviews. vol. 40, n. 3, p. 722-756. 1976.

FOULQUIE MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. **The role and application of enterococci in food and health.** Int J Food Microbiology. vol. 106, p.1–24. 2006.

FRANCINI, I. B.; SFOÇA, D. A.; SOUSA, A. C. B.; CAMPOS,T.; CIDADE, F. W.; M. ZUCCHI, I.; SOUZA, A. P.; NUNES-SILVA, C.G.; CARVALHO-ZILSE, G.A. **Microsatellite loci for an endemic stingless bee *Melipona seminigra merrillae* (Apidae, Meliponini) from Amazon.** Conservation Genet Resour. vol. 1. p. 487–490. 2009.

FRANZOLIN, MARCIA REGINA. **Fundamentos da Identificação Bioquímica das Bactérias.** *In:* TRABULSI, L. R.; Alterthum, F (Eds). *Microbiologia.* Atheneu, São Paulo. p. 463-476. 2008.

FOWLER, H. G.; BUENO, O. C.; SADATSUNE, T. **Ants as potencial vectors of pathogens in hospitals in state of São Paulo, Brazil.** Insect Sci Applic. vol.14, p. 367-370. 1993.

GILLIAM, M. **Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees.** FEMS Microbiology Letters. vol.155, p. 1-10.1997.

GILLIAM, M. e TABER, S. **Diseases, peste and normal microflora of honey bees (*Apis mellifera*) from feral colonies.** Invertebrates Pathology.vol. 58, p. 286-289. 1991.

GILLIAM, M.; D. ROUBIK e LORENZ, B. **Microrganisms associated with pollen, honey and brood provision in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*.** Apidology. vol. 21, p. 89-97. 1990.

GIVSKOV, M.; OLSEN L.; MOLIN, S. **Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for an extracellular phospholipase from *Serratia Liquefacies*.** Journal Bacteriol. vol. 170, p. 5855-5862. 1988.

GLINSKI, Z. e JAROSZ, J. ***Varoa jacobsoni* as carrier of bacterial infections to a recipient bee host.** Apidologie. vol.23, p. 25-31. 1992.

GLINSKI, Z. e JAROSZ, J. **Mechanical and biochemical defenses of honeybees.** Bee World. vol.76, p. 110-118. 1995.

GRAY, M. W.; SANKOFF, D.; CEDERGREN, R. J. **On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA.** Nucleic Acid Research. vol.12, p. 5837-5852.1984.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F.; DULONG DE ROSNAY, H. L. C. **Characterization of *Serratia marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. plymuthica*, and *S. marinorubra* by electrophoresis of their proteinases.** Journal of General Microbiology. vol. 99, p. 301–310. 1977.

GRIMONT, F. e GRIMONT P. A. D. **The Genus *Serratia*.** Prokaryotes. vol. 6, p. 219–244. 2006.

HAINÉ, E. R.; MORET, Y.; SILVA-JOTHY, M.; ROLFF, J. **Antimicrobial Defense and Persistent Infection in Insects.** Science. vol. 32, p. 1257-1258. 2008.

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

HAMILTON, W. D. **Kinship, recognition, disease, and intelligence: constraints of social evolution.** In Animal societies: theories and facts. p. 81–102. 1987.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. **Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms.** Microb. Ecol. v. 35, p. 1–21, 1998.

HEARD, T.A. **The role of stingless bees in crop pollination.** Annual Rev Entomol. vol. 44, p.183–206. 1999.

HEPBURN, H. R. **Structure of integument.** In: KERKUT, G.A. E GILBERT, L.I. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, vol. 3. Pergamon Press. Oxford. 1-58 pp. 1985.

HINES, D.A.; SAURUGGUER, P. N.; IHLER, G. M.; BENEDIK, M.J. **Genetic analyses of extracellular proteins of *Serratia marcescens*.** Journal Bacteriol. vol. 170, p. 4141-4146. 1988.

HÖLLDOBLER, B. & WILSON, E. O. **The ants.** Harvard University. Press. Cambridge. 1990.

HUBERT, J.; KOPECKÝ, J.; PEROTTI, M. A.; NESVORNÁ, M., BRAIG, H. R.; SÁGOVÁ-MARECCKOVÁ, M.; MACOVEI, L.; ZUREK, L. **Detection and Identification of Species-Specific Bacteria Associated with Synanthropic Mites.**Invertebrate Microbiology. Microb Ecol. 2012. vol.63, p.919–928.

HUNTER-CEVERA. **The value of microbial diversity.** Current Opinion in Microbiology. vol. 1, p. 278-285. 1998.

IMPERATRIZ-FONSECA. V. L. e DIAS, B. F. S. **Serviços aos ecossistemas, com ênfase nos polinizadores e polinização.** USP. São Paulo. 2004.

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. **Bacteriocins of gram positives bacterias.** Microbiology reviews. v. 39, n 2, p 171-200. 1995.

JEYAPRAKASH. A, HOY M. A., ALLSOPP, M. H: **Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences.** Journal Invertebr Pathol. vol.84, p. 96-103. 2003.

KASKA, M. **The toxicity of extracellular proteases of the bacterium *Serratia marcescens* for larvae of greater wax moth, *Galleria mellonella*.** J. Invertebr. Pathology. p. 2167- 2271. 1976.

KEVAN, P. G. e IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. **International Pollinators Initiative: The São Paulo Declaration on pollinators.** In: Pollinating Bees: The Conservation Link Between Agriculture and Nature. p. 325-331. Ministry of the Environment. Brasília. 2006.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha Uruçu (Biologia e Conservação).** Coleção Manejo da Vida Silvestre. v.30, n.2. 146 p.1996.

KIRCHOFF, G.; SCHLOTTER, M.; ABMUS, B.; HARTMANN, A. **Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes.** Soil Biol. Biochem., n. 5/6, p. 853-862, 1997.

KLEIN, G.; PACK, A., BONAPARTE, C.; REUTER, G. **Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria.** Int J Food Microbiol vol. 41, p. 103–125. 1998.

KLEIN, G. **Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract.** Int J Food Microbiology. vol. 88, p. 123–131. 2003.

KLOSS, W. E. e WOLFSHOHL, J. F. ***Staphylococcus cohnii* Subspecies: *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* subsp. *nov.* and *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticum* subsp. *nov.*** International journal of systematica bacteriology. vol. 41, n. 2, p. 284-289. 1991.

KUSHNER, D. J. e HARVEY, G. T. **Antibacterial substances in leaves: Their possible role in insect resistance to disease.** Journal of Insect Pathology vol. 4, p.155–184. 1962.

KUTTNER, A. G. **Production of bacteriocines by group A streptococci with special reference to the nephritogenic types.** J. Exp. Med. vol. 124, p. 279-291. 1966. In: TAGG, J. R., DAJANI A. S.; WANNAMAKER, L. W.. **Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria.** Bacteriological reviews. vol. 40, n. 3, p. 722-756. 1976.

LA SCOLA, B.; ZEAITER, Z.; KHAMIS, A.; RAOULT, D. **Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: the *Bartonella* paradigm.** Trends Microbiol, v.11, n 7, p. 318-321, 2003.

LAWNICZAK, M. K. N., BARNES, A. I., LINKLATER, J. R., BOONE, J. M., WIGBY, S. W. & CHAPMAN, T. **Mating and immunity in invertebrates.** Trends Ecol. Evol. vol. 22, p. 48–55. 2007.

LIESACK, W.; JANSSEN, H. P.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L.; STACKEBRANDT, E. **Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques.** In: Modern Soil Microbiology. VAN ELSAS,

- J. D.; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. Marcel Dekker, Inc. New York, 712 p, 1997.
- LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. **Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis**. FEMS Microbiology Reviews, v. 15, p. 155-173, 1994.
- LYSENKO, O. Chitinase of *Serratia marcescens* and its toxicity to insects. J. Invertebrate Pathology. 27: 385-386. 1976.
- NETO, E. M. **Morfogênese do tegumento de *Apis mellifera*: construindo o exoesqueleto adulto**. Dissertação de mestrado. Ribeirão Preto. USP. 70p. 2008.
- MACHADO, J.O. **Simbiose entre as abelhas sociais brasileiras (Meliponinae, Apidae) e uma espécie de bactéria**. Ciência e Cultura vol. 23, n. 5, p. 625-633. 1971.
- MAPLE, P. A.; HAMILTON-MILLER, J. L.; BARNUFFIT, W. **World wide antibiotic resistance in Methicilin resistant *Staphylococcus aureus***. Lancet. vol. 2, p. 537-540. 1989.
- MARTINEZ, M. B.; TRABULSI, L. R. **Enterocateriaceae**. In: TRABULSI, L. R. A. **Microbiologia**. Atheneu, São Paulo. p. 271-279. 2008.
- MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C. R. **Métodos de diagnóstico**. 2008. In: TRABULSI, L. R. A. **Microbiologia**. Atheneu, SP. p. 117-125.
- MATTILA. H. R.; RIOS, D.; WALKER-SPERLING, V. E.; ROESELERS, G.; NEWTON, I. L. G. **Characterization of the active microbiotas associated with honey bees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse**. Plosone. v.7, n. 3, 11p.. 2012.
- MAYRAND, D. e GRENIER, D. **Bacterial interactions in periodontal diseases**. *Bulletin De'l Institut Pasteur*, Paris, v. 96, p. 125-133, 1998.
- MCCALLUM, H.; BARLOW, N.; HONE, J. **How should pathogen transmission be modelled?** Trends Evol. Ecol. v. 16, p. 295–300. 2001.
- MEDINA, C. M.; GONZALEZ, A. J. B. **Memórias del IX Seminario Americano de Apicultura**. México. 46-50 p. 1995.
- MELO, G.A.R. **Notes on the nesting biology of *Melipona capixaba* (Hymenoptera, Apidae)**. J. Kansas Entomol. Soc. v. 69, n.2, p. 207-210. 1996.
- MICHENER, C.D. **Biogeography of the bees**. Annals of the. Missourui Botanic Garden. vol. 66, p. 277-347. 1979.
- MICHENER C.D. **The bees of the world, 2nd edn**. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 953 p. 2007.
- MORAN, N.A., PLAGE, G.R., WILCOX, J.L., SANDSTRÖM, J.P. **A genomic perspective on nutrient provisioning by bacterial symbionts of insects**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.vol. 100, p. 14543-14548. 2003.

MOYA, A.; PERETO, J.; GIL, R., LATORRE A. **Learning how to tive together: genomic insights into prokaryote-animal symbiosis.** Nature Rewiew Genetic, 9: 218-229. 2008.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão.** São Paulo. Nogueirapis. 445 p. 1997.

NUNEZ, C.V.; OLIVEIRA, M.L.; LIMA, R. D; DIAZ, I. E. C.; SARGENTINI, E. Jr.; PEREIRA, O. L Jr; ARAÚJO, L. M.; **Chemical analyses confirm a rare case of seed dispersal by bees.** Apidologie. v. 39, p. 618–626. 2008.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L, D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. **Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos.** Muliciência: construindo a história dos produtos naturais. 2006.

PALLI, S. R. e LOCKE, M. **The synthesis of hemolymph proteins by the larval epidermis of an insect Calpodes ethlius (Lepidoptera: Hesperiiidae).** Insect Biochemistry. v.17, n.3, p. 711-722. 1987.

POTT, A., POTT, V. **Plantas do Pantanal.** EMBRAPA/CPAP. Corumbá. MT. 320 p. 1994.

RADA, V.; MACHOVE, M.; HULK, J. **Microflora in the honey bee digestive tract: counts, characteristics.** Apidologie. v. 28, p.357-365. 1997.

RAPPE, M. S. e GIOVANNONI, S. J. **The uncultured microbial majority.** Annu. Rev.Microbiol. v.57, p. 369-394. 2003.

RODOVALHO, C. M.; SANTOS, A. L.; MOREIRA, M. T. et al. **Urban Ants Transportation of Nosocomial Bacteria.** Neotropical Entomology. vol. 36, n. 3, p. 454-458. 2007.

ROSA, C. A. e PETER, G. **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts.** Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 339 p. 2006.

ROSENGAUS, R. B.; MAXMEN, A. B.; COATES, L. E.; TRIANELLO, J. F. A. **Disease resistance: a benefit of sociality in the dampwood termite *Zootermopsis angusticollis* (Isoptera: Termopsidae).** Behav. Ecol. Sociobiol. vol. 44, p. 125–134.1998.

ROUBICK, D. W. **Nesting and reproductive biology.** Ecology and Natural History of Tropical Bees.Cambridge Univ. Press. 514p.1989.

RUBY, E.; HENDERSON, B., MCFALL-NGAI, M. **We Get By with Little Help Our (Little) Friends.** Sience. vol. 303, p.1305-1307. 2004.

SADD, B. M. e SCHMID-HEMPEL, P. **Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure.** Curr. Biol. vol.16, p. 1206–1210.2006.

SALT, G. **A contribution to the ethology of the Meliponinae.** Trans. Ent. Soc. Lond. p. 431-470. 1929.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SANCHEZ-CONTRERAS, M.; VLISIDOU, I. **The Diversity of Insect-bacteria Interactions and its Applications for Disease Control**. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. vol. 25, p. 203-244. 2008.

SCHIMID-HEMPEL, P. **Parasites in social insects**. Princeton University Press. 1998.

SAEEDI, B.; HALLGREN, A.; JONASSON, J.; NILSSON, L.; HANBERGER, H.; ISAKSSON, B. **Modified pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of enterococci**. APMIS. vol. 110, p. 869–874. 2002.

SCHLEIFER, KARL-HEINZ; BELL, JULIA A. **Family Staphylococcaceae** Fam. Nov. 2009. *In*: VOS, P.D.; GARRITY, G.; JONES, D.; KRIEG, N.R.; LUDWING, W; RAINEY, F.A.; SCHLEIFER, K-H; WHITMAN, W.B. Bergey of Sistematic Bacteriology, The Firmicutes. vol.3.p 392-426. 2009.

SCHNEIDER, P.M., **Purification and properties of three lysozymes from hemolymph of the cricket, *Gryllus bimaculatus* (De Geer)**. Insect Biochemistry. vol.15, p. 463–470. 1985.

SHAEFFER, A. A.; ARAVIND, L.; MADDEN, T. L.; SHAVIRIN, S. SPOUGE, J.L; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V.; ALTSHUL, S. F. **Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and others refinements**. Nucleic Acids Research. vol. 29, n.14. p. 2994-3005. 2001.

SHOJI, J.; HINOO, H.; SAKASAKI, R.; KATO, T.; HATTORI, T.; MATSUMOTO, K.; TAWARA, K.; KIKUSHI, J.; TERUY, Y. **Isolation of CB-25-I, an antifungal antibiotic, from *Serratia plymuthica***. The journal of antibiotics. vol. XLII, n. 6, p. 869-874. 1989.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. 1ª Ed. MMA e Fund. Araucária, Belo Horizonte. MG. 253p. 2002.

SIKOROWSKI, P. P.; LAWRENCE, A. M. **Major diseases of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* in Mississippi fields and insectaries**. MAFES Technical Bulletin, Mississippi. Vol. 58, p. 218. 1997.

SNELL-CASTRO, R.; GODON, J-J.; DELGENÈS, J-P.; DABERT, P. **Characterization of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis**. FEMS Microbiology Ecology, v. 52, n 2, p. 229-242, 2005.

STEINHAUS E. A. **A study of the bacteria Associated With Thirty species of insects**. The microbiology of insects. Journal of Bacteriology. vol.42, n.6, p.757-790. 1941.

STEPHENS, J. M.. **Bactericidal activity of hemolymph of some normal insects**. Journal of Insect Pathology. vol. 5, p. 61–65. 1963.

STILES, M. E. & HOLZAPFEL, W. H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int J Food Microbiology.36:1–29.

STOW, A.; BRISCOE, D.; GILLINGS, M.; HOLLEY, M.; SMITH, S.; LEYS, R.; SILBERBAUE, T.; TURURNBULL, C.; BEATTIE, A. **Antimicrobial defences increase with sociality in bees**. Biology letters. vol. 3, p. 422-424.2007.

STROSCHEIN, Marcos Roberto Dobler. **Caracterização de bactéria fixadora de nitrogênio em *Lupinus albus***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria.

Centro de Ciências Rurais. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo. RS, Brasil. 82 p. 2007.

TAGG, J. R.; DANAJI, A.S.; WANNAMAKER L. W. **Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria**. Bacteriological Reviews. vol. 40, n. 3, p. 722-756. 1976.

TANADA, Y. & KAYA, H. K. **Insect pathology**. Academic press. 14:21 p. 1993.

TESSI, M; SALS, M.S.; CAFFER, M.I. **Drug resistance of Enterobacteriaceae isolated from chicken**. Journal of Food Protection. vol.6, n. 08, p. 1001-1005. 1997.

TOMKINS, D. M. e BEGON, M. **Parasites can regulate wildlife populations**. Parasitology Today. vol.15, p. 311–313. 1999.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: **Improving the sensivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice**. Nucl. Acids Res., v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TRIANELLO, J. F. A., ROSENGAUS, R. B., SAVOIE, K. **Development of immunity in a social insect: evidence for the group facilitation of disease resistance**. Proc. Natl Acad. Sci.USA. vol. 99, p. 6838–6842. 2002.

VAN DEN BERGHEA, E.; SKOURTASA, G.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. **Streptococcus macedonicus ACA-DC 198 produces the lantibiotic, macedocin, at temperature and pH conditions that prevail during cheese manufacture**. International Journal of Food Microbiology. vol. 107, n. 2, p. 138-147. 2006.

VIEIRA, F. C. B; ARAÚJO, D. M; CARVALHO, Y. M. B; SANTOS, A. V. Meliponicultura: uma alternativa sustentável/rentável para as comunidades ribeirinhas/rurais do estado do Amazonas. Anais do Fórum ambiental da Alta Paulista. vol. IV. Cd-ROM. 2008.

VOS, P.; GARRITY, G.; JONES, D.; KRIEG, N.R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F.A.; SCHLEIFER, K.-H.; WHITMAN, W.B. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. vol 3. *The Firmicutes*.1450 p. 2009.

WEISBURG W.G., BARNS S.M., PELLETIER D.A., DAVID J. LANE D.J. **16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study**. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, p. 697-703. 1991.

WILLE, A. **Biology of the stingless bees**. Annual Review of Entomology. P.28-41. 1983.

WOESE, C. R. **Bacterial evolution**. Microbial Review. vol. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

WOESE C.R, KANDLER O., WHEELIS M.L. **Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya**. Proc. Evolution. vol. 87, p.4576-4579 .1990.

ZASLOFF, M. **Antimicrobial peptides of multicellular organisms**. Nature. vol. 415, p. 389–395. 2002.

ZAHRADNÍK, J. **Bees and wasps**. Silverdale Books. Czech Republic. 192p. 1991.

ZIENTZ, E.; FELDHAAR, H., STOLL; S., GROSS, R. **Insights into the microbial world associated with ants.** Arch Microbiol. vol.184, p. 199–206. 2005.

## **ANEXOS**

02-F

GGGCTCGGGGGGGTTCGCAAAGCGGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCAT  
GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGA  
CTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACATACTTTATGAGGTCCGCTTGTCTCGCGAGGTGCGT  
TCTCTTTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCCCACCTT  
CCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCCTAACCGCTGGCAACAAAGGATAAAGGTTGCGCTCGTT  
GCGGGACTTAACCCAACATTTACACAACACGAGCTGACGACAGCCCTGCGCCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAAAGCGCC  
AAAGCATTCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAAAAAGAAGTAAGGGTTCTTCTCGTTGAATCTAAATAAAAACAACATG  
ACTCCACCGCGTGTGGGGGCCCCCGCTTTTTTATTTTGTAGGTTTTTATAATTTTTGGCGGTGCTCCCCCGGCGG  
GATGGAAGGTTATAAGGGGTGTGCTCCTGGGAGGCACACCGCCCTTCCAGGGGAAACCACCCCCCCCCCACTTTA  
GACAATTTCTGTTTTTGTGGACGGGGGGGAGGGAAACCTCAGCCCGAGGGCGTTAATTTTTCTCTATCTCTCTTGTCT  
TCCTTCTCCCCCCCCCCCCCCCCCTTCTCCCTTCTCCCTCCCCACCCTCCCGCACGGCGCTACCC

>02-R

GGGCTCGGGGGGGTTCGCAAAGCGGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCAT  
GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGA  
CTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACATACTTTATGAGGTCCGCTTGTCTCGCGAGGTGCGT  
TCTCTTTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCCCACCTT  
CCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCCTAACCGCTGGCAACAAAGGATAAAGGTTGCGCTCGTT  
GCGGGACTTAACCCAACATTTACACAACACGAGCTGACGACAGCCCTGCGCCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAAAGCGCC  
AAAGCATTCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAAAAAGAAGTAAGGGTTCTTCTCGTTGAATCTAAATAAAAACAACATG  
ACTCCACCGCGTGTGGGGGCCCCCGCTTTTTTATTTTGTAGGTTTTTATAATTTTTGGCGGTGCTCCCCCGGCGG  
GATGGAAGGTTATAAGGGGTGTGCTCCTGGGAGGCACACCGCCCTTCCAGGGGAAACCACCCCCCCCCCACTTTA  
GACAATTTCTGTTTTTGTGGACGGGGGGGAGGGAAACCTCAGCCCGAGGGCGTTAATTTTTCTCTATCTCTCTTGTCT  
TCCTTCTCCCCCCCCCCCCCCCCCTTCTCCCTTCTCCCTCCCCACCCTCCCGCACGGCGCTACCC

>03-F

TTGGGGTGGCAGCTGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGGCGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC  
ACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGG  
TGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTGCAGCTGATGTGCGAAAG  
CGTGGGGATCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCGGTAACAGATGAGTGTAGTGTAGGGGGTTTCCGC  
CCCTTAGTCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAC  
GGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCAAGAACCTTACCAAACTTTGACATCCTTT  
GACAACCTAGAGATAGAGCTTCCCTTCCGGGGACAAAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCT  
GAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTAAGCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTG

>04-F

GGCCCCAAGCTATAAGCAAGCGTTTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA  
AGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGT  
AGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTGCAGCTGATGTGC  
GAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGTAGTGTAGGGGGTT  
TCCGCCCTTAGTGTGCTGACGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAA  
TTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCAAGAACCTTACCAAACTTTGACAT  
CCTTTGACAACCTTAGAGATAGAGCTTCCCTTCCGGGGACAAAGTGCAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT  
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTAAGCTTAGTTGCCAGCATTAAGTGGGCACTTAA  
GTTGACTGCCGGTGACAAACCGGGAGGAAGTGGGGAATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGATTTGGGGCTAC  
ACACCGTGTACAAATGGAAAAAACCAAAGGGGGAAGCCTAAACCCCGCCAGGGGGCCAGGCCAAAAATCCCCAAA  
AAAAGGTTGTGTTTCTCTCCAGGGTTTCCCGGGGAAAAATTTGTTTGGAGGAAGCCCCGGCCGGCCCCAACCC  
ACCTCTCTCTCG

>06-F

AAAAACTGGCGAGGGATGCAGCGTTATCAGGATTACTGGGCGTAAAGCGCACGAGCGGTTTGTTAAGTGCAGATGT  
GAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGTAGAATCCAGG  
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGG  
TGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGTGATTTGGAGGTTGTGC  
CCTTGAGGCGTGGCTTCCGAGCTAACCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGCGCCGCAAGGTTAAACTCAAATG  
AATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCAAGAACCTTACCTACTCTTGAC  
ATCCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGT  
GTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCTTTTGTGTCAGCGGGTTCCGGCCGGGAACT  
CAAAGGAAACTGCCTAGTGATAAACTGGAAGGAAAGGGGGGGATGACCTCCAATTCCTCTGGGCCCTTTACGAAT  
TAGGGGCTACCCCCGTTGCTTAAAAATGGGCATTTATTACAAAAAACCACCCCCCCCCCCCCGAAAAAACC  
CCAAACGGGAAACCCCCCTATAAAAAAAGGTTAGTGGGTGCGCGGGGAAAA

>06-R

GGTCCTTGTGGGTCCACAGTGCAGGAAAGCGGCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGC AACCCACTCCCATGG  
TGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACT  
TCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACATACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTTCGCTTC  
TCTTTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCC  
TCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGAAACCGCTGGCAACAAAGGATAAAGGTTGCGCTCGTTGC  
GGGACTTAACCCAACATTTCAACAACAGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAA  
TCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCA  
CCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTTCTTTGATTTTTATCCTTTCGCGCCGCACTCCCCCGGCGCTCCGATTAATGTG  
TTTAGTTCCCGAAGCGAGGCTCGGGGGGAGAACCCCAAATCCCAAATCGGTTTTCTTGTGGGGGGGAGAGGGGTA  
TGGTTTTCTTTGTTTGGTTTTTCTCCCCCTTTTCGCCCCCTCCGCCCCCGAGAAGTATTTTCGTTCTTCGCGGGTGG  
GGGGGGGGGGGGCGCCCCCCCCCGCGGCTTTGGGTTGTGGGTGTTATAAAATTTCCCCCTCCTCC

>08-F

CCGGTGCCATGCCATAAGCAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAGCGCGCTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTG  
AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGT  
GTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGT  
GCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTCTAAGTGTAGGGGG  
TTTCCGCCCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGG  
AATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGAC  
ATCCTTTGCAACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTC  
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCT  
AAGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAAGGAAGTGGGGATGACGTTCAAATCTCCTGGCCCTTTATGATTTTGGGG  
CTACCCCGCTGCCTTCAAATGGAACAATAACAAAAGGGGCCACCTTAAAACCCCGGGGGGCCCATGGCAAAAACC  
CCCCATAAAAAAAGTTTTTTTTTTCTTCCAAGGTTTTTTTCGGGGGGGAATTTT

>08-R

ATTTCTTTTGTCCCAACCTTCGACGGCTAGCTCCATAAATGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTCTTACTCTCGTGG  
TGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTACCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAGCT  
TCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAAGTGAACAACCTTTATGGGATTTGCATGACCTCGCGGTTTAGTCTGC  
CCTTTGTATGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCC  
TCCGTTTGTACCCGGCAGTCAACTTAGAGTGCACCACTTAATGCTGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTGCG  
GGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCGCCCGAAGGGGAAGG  
CTCTATCTCTAGAGTTGTCAAAGGATGTCAAGATTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCC  
ACCGCTTGTGCGGGTCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTTCGCGTCTACTCCCAGGCGGAGTGTCTAATGCG  
TTAGCTGCAGACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGGTGGACTACCAGGGTAATC  
TAATCCTGGTTTATGATCCCCACGCCTTTTCCCCACATTCAGCGTCCAGTTTAAAAAAAACCCAAAAAAGGTCCCC  
CCCTTTCCCCCCCCCGGGGGGGGGTTTTTCCCCCTCCCA

>10-F

AGGGGGGAAGGCGTTATCCGGTATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCA  
CGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGT  
GAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGC  
GTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCC  
CCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACG  
GGACCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTG  
ACAACCTAGAGATAGAGCCTTCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGCGT  
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTG

>11-F

CAAATACTCTGCAGGCAGCGTTTTCCGGTATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA  
GCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTGTA  
CGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCG  
AAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTT  
CCGCCCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT  
TGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATC  
CTTTGACAACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGT  
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAAG  
TTGACTGCCGGTGACAAACCGGGAGGAAGTGGGGGATGACGTTCAAATCATCATGCCCTTTATGATTTGGGGCTACA  
CACCGTGTACAATGGGACAAATACCAAAGGGCCAGCTTAAACCCCGCAAGGTTCCATGGCAAAAATCCCCCATAAAA  
AAGTTTTGTTTTCTCCTTTTTTTTCGGGAAAATGTGGTGTAGATCCCCCGGCCCCACCCCTCCCCCAACCA  
CCCCCTACCATCACCCACTATGAGGA

>12-R

CGTTCCTTCTAGTCCCACCGTGCGGCGGCGGCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCACCCACTCCCATGG  
TGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACT

TCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACATACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTC  
TCTTTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCC  
TCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCTGGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGC  
GGGACTTAACCCAAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAA  
TCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCA  
CCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACTTTCGCGCCGACTCCCCAGGCGGTGATTTAACGCGT  
TAGCTCCGGAAGCCACGCTCAAGGGCACAACCTCCAATCGACATCGGTTTACAGCGGTGGACTACCAGGGTATTT  
TATTCCTGTTTGGCTCCCCCCCCCTTTTCCCCCCTGGAACCGGGCAGTTCCTTCCCCCCCAGGGGGGGCCCCCCCC  
TTTTCCCCCCCCCGGGGGTTTTTTTTCCCCCTCCCCCAAAAAAATTTCTCCC

>15-F

AGGGGTGGGCAAGCGTTATCCGGTATTATTGGGGCGTAAGCGCGCTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC  
ACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGG  
TGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAACGACGCTGATGTGCGAAAG  
CGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTCCGC  
CCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGAC  
GGGACCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAATCTTGACATCCTTT  
GACAACCTAGAGATAGAGCCTTCCCCCTCGGGGGACAAAGTGCAGGTGGTGCATGGTTGTGTCAGCTCGTGTG  
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGTT

>16-F

CAAACAGGTAGGTGGCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAGCGCGCTAGGCGGTTTTCTGGGGTCTGATCCCCTT  
TCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGACCCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAG  
CGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAACGACGCTGATGTGCGA  
AAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTTC  
CGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCGGGGAGTACGACCGCTAGGTTGAAACTCATAGGAATT  
GACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAAAACCTTACCAATCTTGACATC  
CTTTGACAACCTCGAGAGGATAGAGCCTTCCCCCTCCGGGGACAAAATGACAGGTGGTGAATGGTTGTTGTCGTAACCTC  
TGTCGAAGGAAGTTTGTAGTTAAGTCTCCCCAACACACGTC AAC

>16-R

AATTCATTTTGTCCACCCTTCGACGGCTGGCTCCATAAATGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTCCAAATTCGCGG  
GGTGACGGGCGGGGTGTACAAGACCCGGAACCGTATTCACCGTACCATGCTGATCTACAATTACTAGCGATTCCGGCT  
TCATGTAGTCAAGTTGCACACTACAATCCAACTGAAAACAACCTTTATGGAATTTGCATGACCTCGCGGCTTACCTGC  
CCTTTGTATGTCCATTGAACCACGTGTGTAGCCAGATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGCTTCCCCACCTTCC  
TCCGTTTGTACCCGGCAGTCAACTTAAAGTGCCAACCTTAATGCTGGCAACTAAGCTTAAAGGGGTGCGCTCGTTGC  
GGACTTAACCAACATCTCAGCACGAGCTGACCACCACCGTGCACCACCTGTCACCTTTGCCCCGAAGGGGAAC  
GCTCTATCTTAGAGCTGTGGAAGGATGTACAGATTTGGGAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAATTAACCCGTTGCTC  
GACCGCTTGTGCGGCTCCCCGTC AATTCATTGAGTTTCAACCTTTCGCGACGCACTCCGCGAGGAGTGTGAAATGC  
GTTAGCTGCATGACTGACGGGCACAACCCACTAACCTTCTCACTCATCGTTGACGGGGGGGGCAAGCAGGGTTAT  
CTAATTCCTGTTTTCGCCCCCCTTCCCTTTCCCACAACTCAACCGGTTAAAAAAAACCCAAAAAAAAGAC  
CCCCCCCCCCTTCCCCCCCCCGGGGGGGTGTCC

>19-F

CTGGCCACGGACATTAGGCAGCGTTTTTCCGGAATTATTGGGCGTAAGCGCGCTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTG  
CAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGT  
GTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAACGACGCTGATGT  
GCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGG  
TTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGG  
AATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAATCTTGAC  
ATCCTTTGACAACCTTAGAGATAGAGCCTTCCCCCTTCGGGGGACAAAGTGCAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTCAGCTC  
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCAC

>20-F

AATGGATGGGTGGGACGCTTATCCGGTATTATTGGGCGTAAGCGCGCTAGGCGGTTTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAG  
CCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAG  
CGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAACGACGCTGATGTGCGA  
AAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTTC  
CGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATT  
GACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAATCTTGACATCC  
TTTGACAACCTTAGAGATAGAGCCTTCCCCCTTCGGGGGACAAAGTGCAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTCAGCTCGT  
CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTAAGCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACCTAA

>20-R

CATTTCTTTTGTCCCAACCTTCGACGGCTAGTCCATAAATGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTACAACTCTCG  
TGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGAACGTATTCACCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCA  
GCTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAACCTGAGAACAACCTTTATGGGATTTGCATGACCTCGCGGTTTAGC

TGCCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCT  
TCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCAACTTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTT  
GCGGGACTTAACCAACATCTCAGCACAGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGGA  
AGGCTCTATCTCTAGAGTTGTCAAAGGATGTCAAGATTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGC  
TCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTIONCCCCAGGCGGAGTGCTTAA  
TGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTTAGGGGGGGAACTACCAGGG  
GTATCTAAATCCCTGGTTTTGGATCCCCCGCCCTTTCCCCCAATTCCCACCGTTCCAGGTTAAAAAAAACCACA  
AAAAAAGCCCCCCCCCTTTCCCCCCCCCCCCCTCGGGGGGGGGTGTGTTTTCTCTCCCCCTCTCCTTGCCCTT  
ATCTTAA

>21-F

TTAGGCTGGTTGGCAGCGNTATCCGGTATTATTGGGCGTAAGCGCGCTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC  
CCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGC  
GGTGAATGCGCAGAGATA TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGATGTGCGAA  
AGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCC  
GCCCTTAGTGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCGTTGGGAGTACGACC GCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTG  
ACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAATCTTGACATCCT  
TTGACAACCTCTAGAGATAGAGCCTTCCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTC  
GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTAAGCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGTT  
GACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGGCTACACAG  
TTGCTACATGGGACAAAACAAAGGGGCCAGCTAAACCCCGGAGGTTCTGGCCAAAATCCCCCATAAAAGTTTTT  
GTTTTCTCAATTTTTTTCGGGAAAATTTGTGGAGATCTCCCCGGCCCCCCCCACTCCCCC

>21-R

AAATCATTTTTGTCCACCTTCGACGGCTAGCTCCATAAATGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTCAAAACCTCTCGTG  
GTGTGACGGGGCGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTACCGTAGCATGTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAGC  
TTCATGTAGTTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAACCTGAGAACAACCTTTATGGGATTTGCATGACCTCGCGGTTTAGCTG  
CCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTC  
CTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCAACTTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTGC  
GGGACTTAACCAACATCTCAGCACAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGGAAG  
GCTCTATCTCTAGAGTTGTCAAAGGATGTCAAGATTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTC  
CACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTIONCCCCAGGCGGAGTGCTTAAATGC  
GTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGAACTACCAAGGTATC  
TAAATCCTGTTTTGATCCCCACGCCTTTCCCCACTTCCAGCGGTGAGTTAAAAAAAACCAAAAAGTCCCCCCTT  
TCCCCCCCCGGGGGGGGTGTTCCCCCCCCCCTTTTTTTTTTCTCTTGTGG

>22-F

GGGGGCGGGTAAAGGCGGCCGCTAGGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCA  
TTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAG  
GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAG  
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGTGACGCTAACGC  
ATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACC GCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGA  
GCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAATCTTGACATCCTTTGACAACCTTAGAGATAGAGCCT  
TCCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCATGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC  
AACGAGCGCAACCTTAAGCTTAGTTGCCAG

>24-F

GGCCCATAGCCACTAATGCAGCGTTATCGGGATTAGCTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGT  
GAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGG  
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGG  
TGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGC  
CCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACC GCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATG  
AATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGAC  
ATCCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGT  
GTTGTGAAATGTTGGGTTGAGTCCCGCCCCACCTCAACCTTATTCTTTTTTGCCTCGGTCCCGCCCCCACC GGA  
AGGGAAAATTTTCTGCGGTAAACCCCGGGAGAAACCGTGCACATAAAGCAACCCACCCCTAAATACCCCATTTT  
GGTTTACGTGGTGGGCAATCCTCATGGGTATAATAAATTTCTGTTTTTTTTCCCCCCCCACACCCTTTTCTCAA  
CACCCATAAAGCGACTTCTTAATTTCTTTTTCTTTGGCCGTGGGGGGGGGGGGGGGGGG

>24-R

CATTCCTGTAGTCCACCGTGGGGAGGCGCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATG  
GTGTGACGGGGCGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGTAGCATTTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGAC  
TTCATGGAGTTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGACTACGACATACTTTATGAGGTCGCTCTCGCGAGGTGCGCTT  
CTCTTTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTC  
CTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCAACCCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTG

CGGGACTTAACCCAACATTTTCAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCA  
ATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTCATCGAATTAACCACATGCTG  
CACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGGGGCCGGACTCCCCGGGGGGCGATTTTATGG  
CGTTTGTCTCCGGGAGGCCACGCCTTCCGGGGGACGACCCCCAAATCAACATCGTTTTTACGGCGGGGGGGCGCCCC  
GGGCGAACGAAACCCAGAGTTTTGGTTTTCCACCGCCCTTCCGGCCTTTGGGAAACGGTCAAGGGGTTTTTTCCAT  
TTTTCCCGTGGGGGGGGCCCGGGGGGGGGTGTGTGCGCCCC

>25-F

ATCGGGAAGGTGCAGTCGTTATCGAGATTACTGAGGCGTNAGCGCACGAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATC  
CCCCGGCTCAACCTGGGAACCTGCATTTGAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGC  
GGTGAATCGCTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAA  
AGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGA  
GGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAATGAATTGA  
CGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACTACTCTTGACATCCAG  
AGAATTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGCTCAGCTCATGTGTG  
AAATGTTCCGTTAAGTCCCGGCACGACCGCAACCCTTTTCCTTTTGTTGCCCTCCGCGCGGCCCGCCACCTGAGGGG  
AAATTTCCCGGTGATAAACCTGGAAGAGACGCTCGCAAGGGGCCCAACCCCCCAAACCCCCCTTTTGTTTAAGG  
GGGGGAACAATGCCCGGGGAAATTTTAATCTTTTTGTTTTGCCCCCCCACCCTTTTTTCCCAAACCCAAGGAGA  
AGATTTTTTTTTTTTTTCTTCGTCCGGGGGGGGGGGGGGCGCCCCCCCCCTCCCTCGCCCCCGCCCGGGGGGTGT  
T

>25B-R

CAGTTCGTGGATCACACAGTGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCACCCACTCCCATGGTG  
TGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTC  
ATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACATACTTTTGGAGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTGCTTCTCT  
TTGTATATGCCATTGTAGCAGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCACCTTCTCC  
AGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCGCGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGG  
ACTTAACCCAACATTTTCAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCGCGAAGGCACCAATCC  
ATCTCTGAAAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTCATCGAATTAACCACATGCTCCACCG  
CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGGCGCCGTACTCCCACGCGGTGATTTAACCGCTTAG  
CTCCCGAAGCCACGCCCTCAGGGGCACAACCCTCAAATTCGACATCGTTTTACCGGGGTGAACTACCAGGGGTAT  
CCTAAATCTGGTTTTGCTCCCCCCCCCTTTTTCCCCCTTGAACGGTCCGGGTCTTCTCGTCCCAGGGGGG  
GGCCCCGGCCCTTTTTCCCCCCCCCCCCGGGGGAAATATTTTCCCCC

>26-F

GGCACAAGCTAGAAGGGCAGCGTTACCGGAATATTGGGCGTAAGCGCGGTAGGCGGTTTCTTAAAGTCTGATGTGAA  
AGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGT  
AGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTGCAGCTGATGTGC  
GAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTT  
TCCGCCCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCGTTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAA  
TTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAATCTTGACAT  
CCTTTGACAACCTTAGAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGCAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTCAGCTCGT  
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTAAGCTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAA  
GTTGACTGCCGGTGCACAACCGGAGGAAGGTGGGGGATGACGTCCAAATCATCATGCCCCCTTATGATTTGGGGCTAC  
ACACCTTGCTTACAATGGGAACAAAACAAAGGGGGCCACCTAAAACCCCCCGAGGGGCCCTTGCCCAAATCCCC  
CAAAAAAAGTTTTTGTTTTTCCCCCCCCAAAATTTTTTCGGGGGAAATTTTG

>26-R

AATTCATTTTGGTCCACCTTCGACGGCTAGCTCCATAAATGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAACTCTCGT  
GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTACCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAG  
CTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAAGTGAACAACCTTTATGGGATTTGCATGACCTCGCGGTTAGCT  
GCCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT  
CCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCAACTTAGAGTGCCTAACCTAATGCTGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTG  
CGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGGAA  
GGCTCTATCTTAGAGTTGTCAAAGGATGTCAAAGATTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCT  
CCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGGCGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGTATTG  
CGTTAGCTGCAGACTAAGGGGCGAAACCCCCAACACTTAACTCATCGTTTTACGGCGGGGAACTAACCAGGGA  
AATCAAATCTGTTTTGATCCCCCCCCCTTTCCCCCATTTCCCCCGTCCACTTTTAAAAGAAACAAAAA  
ATCCCCCCCCCTTCCCCCCCCCCCCCTGGTGGGGGTGTGGTTGTTGTTCTTTCTTC

>31-F

CGCGATAGGTGCAGCGTTATCCGGTATTAGTGGGCGTAAGCGCGCTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGATAGCCC  
ACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGG  
TGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTGCAGCTGATGTGCGAAA  
CGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTCCGC  
CCCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGAC  
GGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTT  
GACAACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGCAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGCT  
GAGATGTTTGGTTAAGTCCCACGAGCGCAACCCCTAAGCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGTTGA  
CTGCCGTGACAAACCGGAAGAAGGGTGGGGGAATGACGTCAAATCATCATTTGCCCTTTATGATTTGGGGTACCC  
ACCTTGCCCTACAAATGGAACAAATAACAAAAGGGCCACCCATAAACCCCCCGAGGGTCCCCGGCCAAAATCTCCCC  
CCTAAAAAAAATTTTTTTTTTTTCTCCTCACAAAATTTTC

>31-R

CAACTCATGTTGGTCCCACCTTCGACGGCTAGTCCATAAATGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAAACTCTCG  
TGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGAACGTATTACCGTAGCATGCTGATCTACGAATAACAAGCGATTCC  
AGCTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAAGTGAACAACCTTTATGGGATTTGCATGACCTCGCGTTTAG  
CTGCCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTGATCCCCACC  
TTCCTCCGTTTGTACCCGAGTCAACTTAGAGTGCCAACTTAATGCTGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGTCTGCT  
TGCGGGACTTAACCCAACATCTCCCGACCGAGCTGACGACCACCTGGCCCCCTGGTCAATTTGCCCCGAAGGGG  
AAGGGCTCTATCTCAAGATTTGTCAAGGGATGTAAAAATGGGAAGGGTTCCTCGCTTCCCTTCAAATAAAACCACGG  
GCTCCACCGCTGGTGCAGTCCCCGCTATTTCTTTTATTTCACCTTGCAGCCGCTCCCCCGGGCGGAGTGTCTTA  
ATGCTTTAGCTGCAGCACTAAGGGGGCGAAAACCCCTTAAACACTTTACCCTTCTTCGTTTTACGGGCGGGGAACA  
ACCAGGGGTTAACTAAATCCCGGGTTTTGGAACCCCCCCCCCTTTTTTCCCCCAAACCTTACACCCGTTTC  
CCATATTTTTTAATAAAAAA

>33 - F

AATTCATCTTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGT  
GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAACGATTCCGGCTT  
CATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGAAGAAGCTTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAACGACT  
CGTTGTACTTCCCATTGGAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCTCCCCACCTTCTT  
CCGGTTTGTACCCGCGAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGG  
GACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTC  
TATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAATTAACCACATGCTCCACC  
GCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCAGGTCGTACTCCCCCGGGGAGTGCTTAATGCGTTT  
GCTGCAGCAACTGAAGGGGGGAAAACCCCTCCACCCTTATCAATCCTCCTTTTACGGGCGTGGGAGAACCAGGGGG  
AGCCTAATCCGTGTTTGGGCCCCCCCCCTTCTTAAGCCCCCAACCCGGCCCAATTTAAAAAATAAAAAA  
AAAAAATAAACACACCCCCCTTCTCCCC

>33-R

AATTCATCTTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGT  
GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAACGATTCCGGCTT  
CATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGAAGAAGCTTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAACGACT  
CGTTGTACTTCCCATTGGAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCTCCCCACCTTCTT  
CCGGTTTGTACCCGCGAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGG  
GACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTC  
TATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAATTAACCACATGCTCCACC  
GCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCAGGTCGTACTCCCCCGGGGAGTGCTTAATGCGTTT  
GCTGCAGCAACTGAAGGGGGGAAAACCCCTCCACCCTTATCAATCCTCCTTTTACGGGCGTGGGAGAACCAGGGGG  
AGCCTAATCCGTGTTTGGGCCCCCCCCCTTCTTAAGCCCCCAACCCGGCCCAATTTAAAAAATAAAAAA  
AAAAAATAAACACACCCCCCTTCTCCCC

>34-F

GCGGGGCGAGCTGTTATCCGGCATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTCAAAGCCCACG  
GCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGA  
AATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTGCAGCTGATGTGCGAAAGCGT  
GGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCC  
TTAGTGTGTCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGG  
GACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGAC

AACTCTAAAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGAAAAAGTGACAGGGGGTGTGGTTGCCGCCCCCTCGTGTGCGTGA  
GAGTTGGGGTAAGTCCC GCCCCCCGCCAACCCCTTTATCTTTTTTGCCCGCATAGGTTGCCCCCCCTTAATTTGC  
TTCCCCTGGACAAACCCCGAGAAAAAGGGGGGAGAAACCCCCAAACCCCTTCTCCCCCTTTTTTTGTGGGGGGCC  
ACCACCGTCTAATTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAGGGGGCCCCCTCACCCCTCCCCCGGGGGCGGCAAAAAAAAAA  
CCACCCAAAAAAAAAAAAATTTGTTCTCTCCCTCTCCCTCTCGTGTGTTTGGTGTGTTTGGGG

>34-R

CAATTCATCTTGTCCCACCTTCGACGGCTAGCTCCATAAATGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAACTCTCGT  
GGTGTGACGGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAG  
CTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAACGAGAACAACCTTTATGGGATTTGCATGACCTCGCGGTTTAGCT  
GCCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGGGTAGCCCAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT  
CCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCAACTTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAAGCTAAGGGGTTCGCGCTCGTTG  
CGGGATTTACCCCAATATCTCACGACACGATGTGAACAAACACGTGCCCCCTTTTGTCTTTTTTCCCCCAAAAGGGA  
AGATGCTCTTCTCTAGAAGTTGTCAAAGAAGAACAATAATTTGAGAAGGTTTCTCCCTCGCTTTCTAAAAAAAAA  
AAACAAAAATGCACCCGCGGGTGGGGGGCGGCCCGCCCCCTATTTTTTTTTTTTTTTTGTATCTCTCCGCGGGCGG  
CCCCCCCCCCCCCCCCAGAGGGTGTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTGTTTTGGGCCACCCAGGGAAGGGGGAAAAA  
AACCCCCACACCAACCCCCACCCCTTCTTTTTTCCCCTTTTTCCGTTGTTGGTTGGTGAGCGGGAACAATAAAGAA  
AAAAAGGGCGCAATTCGCCTTATGTTTTTGTGTTTTTTTTTCCCTCTCTTCCCCCTCCCCCTCTCCCCCCCCCTC  
TCTCCCCCTTTTCTTACCT

>37-F

CAATACAGATAGCTGGCAGCGTGTACCGGAATTTATGGGCGTAAGCGCGCTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTCAT  
TTTCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACATGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGT  
AGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACGTCATGATGTGC  
GAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTT  
TCCGCCCCCTTAGTGTGACGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAA  
TTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACAT  
CCTTTGACAACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGT  
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC

>37-R

AATTCATTTTTGGTCCCCCTTCGACGGCTAGCTCCATAAATGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAACTCTCGT  
GGTGTGACGGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAG  
CTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAACGAGAACAACCTTTATGGGATTTGCATGACCTCGCGGTTTAGCT  
GCCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT  
CCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCAACTTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTG  
CGGGACTTAACCCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGCAACCCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGGAA  
GGCTCTATCTCTAGAGTTGTCAAAGGATGTCAAAGATTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCT  
CCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTCAACCTTTCGCGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGTAAATG  
CGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATGTTTACGGGCGTGGACTACCAGGGTT  
ATTCTAATCCTGTTTGGATCCCCACGCCTTTTCCCACCAATTCACCGGTCAATTTTACAAAAACCCAAAAAAGC  
CCCCCCCCTTTTTTCCCCCCCCCTGGGGGGGGGTTTTTTTCCCCTC

>38-F

AAAATAGGGAAAGGGGTGCAGCGTAAATCGGTATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAAGTGT  
GCAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGTCATTTGAAACTGGCAAGCTATGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATCCAG  
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAG  
GTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTG  
CCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACCTCAAA  
GAATTGACGGGGCCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTTTGA  
CATCCAGAGAACTTTCCAGAGATGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCG  
TGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGCCGGGAAC  
AAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAAGTCAATGATGTTGCCCCCTTACGAGT  
ACAGTGTACAAAGGCATATACAAAAGAAGAACCCGACCCCCCGGAGAACCAAGCCGACCTCCATAAAAAGTAGGGT  
CGGGTAATTCCCGGAATTTGGGAAGATCCTTGGGCCCCCCCACCCTCCCC

>38-R

GGGGTGTGGAATCCACAGTGCCTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTTGCAACCCACTCCCATG  
GTGTGACGGGGCGGTGTGTACAAGCCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATTTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGAC  
TTCATGGAGTTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACATACTTTATGAGTCCGCTTGTCTCGCGAGGTCGCTT  
CTCTTTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTC  
CTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTG  
CGGGACTTAACCCCAACATTTCAACACAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCCA  
ATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCC  
ACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTTCGCGCCGTAACCTCCAGGCGGTCGATTTAACCGG  
TTAGCTCCGGAAGCCACGCTCAAGGGCACAACCTCCAAATCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAAGGTATCTAA  
TCCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCCACCTTGAACCGTCAATTTCTTTCTCGTCCCAGGGGGGGCCCCCTTCCCCC  
CCCCGGGGTTTTTTTCCCCCTCCCCAAAAATCTTTTTTCTCCCCCCTTTTTTTTT

>39-F

TGGGTGGGCAGCGGTTATCCGGTATTATTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCA  
CGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGT  
GAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGC  
GTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTTCCGCC  
CCTTAGTGTGTCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACG  
GGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTG  
ACAACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGACGCTCGTGTGCGT  
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTATTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGTTGAC  
TGCCGGTGAAACAACCGGAAGGAGTGGGGATAACGCCAAATCCTCTGCCCTTATGATTTGGGGCTCCCCACCTCCC  
TACAATGGAAAAATAAAAAAGGGCCCCCTAAACCCCCCAGGGCCCGGGCCAAAACCCCCAAAAAAATGAATTC  
CCGGTTTTCTGGGAAATGGGGGGGGGTGGGGGGCGCCCCCCCCCGCC

>39-R

ACTCATCTTTGTCCACCCTTCGACGGCTGGCTCCATAAATGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTG  
GTGTGACGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTACCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAGC  
TTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAACCTGAGAACAACCTTTATGGGATTTGCATGACCTCGCGGTTT  
CCCTTTGTATGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTC  
CTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCAACTTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAAGCTTAAGGTTGCGCTCGTTGC  
GGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCGAAGGGGAAG  
GCTCTATCTCTAGAGTTGTCAAAGGATGTCAAGATTTGGTAAAGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTC  
CACCCTTGTGCGGTCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGCTACTCCCAGCGGAGTGCCTAATGC  
GTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTTACGGCGTGGACTACCAAGGGTA  
TCTAAATCTGTTTTGACCCCCCGCTTTTCCACATCAACCCGTCAAATTAAAAAACAAAAAAAGCCCC  
CCCCTGCCCCCGGGGGGGGGTTTTTCCCTCCCCCATTATT

>40-F

GAGAGGGGTAGGGAGAAGACGTTATCCGGTATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAAGTGTGAA  
ATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATCCAGGTGT  
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGC  
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGATTTGGAGGTTGTGCCCT  
TGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAATGAAT  
TGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATC  
CAGAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT  
GTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCG

>42-F

CCCACACGCCACAAGGGAAGCGTTTTCCGGTATTATTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGCCAT  
AGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGT  
AGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGC  
GAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTT  
TCCGCCCTTAGTGTGTCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAA  
TTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACAT  
CCTTTGACAACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGACGCTCGT  
GTCGGGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTAAGCTTATTTGCCAGCATTAAATTTGGGCACTCTAA  
GTTGACTGCCCGTGACCAACCGGGAGGAAAGGGGGGGATGAACTCAAACCACCATGCCCCCTTTATGATTTGGGG  
CAACACCCCGTGCCAAACAAGGGGAAAAAACAAGGGGGGCGCCAAAACCCCCGCGGAGGGCCAGGGCCAAAAC  
CCCCCAAAAAAAGTTTTGGGATCCCCCTCACAATTTTTCCCC

>42-R

TGTTTTTTTATCCCTCCCCCATATTTGTCCCCTTCGACGGCTAGCTCCATAAATGGTTCACCGGCTTCGGGTG  
TTCTAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGACAAGACCCGGGAACGTATTACCGTAGCATGCTGATCTACGATTA  
CTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAACCTGAGAACAACCTTTATGGGATTTGCATGACC  
TCGCGGTTTGTGTCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAA  
TCATCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGCGAGTCAACTTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAAGCTTAAGG  
GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTC  
CCCCGAAGGGGAAGGCTCTATCTCTAGAGTTGTCAAAGGATGTCAAGATTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAAT  
TAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTTGTAGTTTCCACCTTGGGGCGTACTCCCCAG  
GGGGAGTGTCTAATGCGTTTAGCTGCAGCACCCTAAGGGGGGGGAAACCCCCCTAACCACTTTAGCACTTATCGTTTT  
TACGGGGGGGGAACTACCCGGGGTATTCTAAACTCCTGGGTTTGGAAACCCACACCCCCCTTTTCCGCGCCTTTC  
ACCGCCGCTCAACAGTTAACACGAAAAGCACACGAAAAAAGGGCTCCCGCCCC

>43-F

GCACTGCACTGAGGGAAGCGTTTCCGGTATTATTGGGCGTAAGCGCGCGTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG  
CCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAG  
CGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAACGACGCTGATGTGCGA  
AAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTTC  
CGCCCCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATT  
GACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCC  
TTTGACAACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCTTCCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGT  
CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC

A>43-R

CACCCGCTTGGCCCCACCTTCGACGGCTAGCTCCATAAATGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAACTCTCGT  
GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCCCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAG  
CTTCATGTAGTGCAGTTGCAGACTACAATCCGAAGTGAACAACCTTTATGGGATTTGCATGACCTCGCGTTTACT  
GCCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT  
CCTCCGTTTGTACCCGGCAGTCAACTTAGAGTGCCTAATAAGTCTGGCACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTG  
CGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGGAA  
GGCTCTATCTCTAGAGTTGTACAGGATGTCAAGATTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCT  
CCACCGCTTGTGCGGGTCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGGCGTACTCCCCAGGCGGAGTGTATGG  
CGTTTAGCTGCCGACTAAAGGGGGGGAAACCCCTAACACTTTAACCTCCATCGGTTTAAAGGGGGGGGACCAA  
ACCAAGGTATTCTAATTCCTTGTTTTGGACCCCCCCCCCTTTTCCCCCAACTTCCAACCCGGCTCCA  
AAGATTAATAAAAAAAGAAAAACCCAAAAA

>44-F

AGGGGGGGGACGCGATTATCCGGTATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCC  
CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCG  
GTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAACGACGCTGATGTGCGAAA  
CGGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTTCCG  
CCCCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA  
CGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTT  
TGACAACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCTTCCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGC  
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGT

>44-R

AACTCATTGTTGGTCCACCTTCGACGGCTAGCTCCTAAAAGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAACTCTCGTG  
GTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCCCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAGC  
TTCATGTAGTGCAGTTGCAGACTACAATCCGAAGTGAACAACCTTTATGGGATTTGCTTGACCTCGCGGTTTCGCTG  
CCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTC  
CTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCAACTTAGAGTGCCTAATAAGTATGGCACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTGC  
GGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGGAA  
GCTCTATCTCTAGAGTTGTCAAAGGATGTCAAGATTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTC  
CACCGTTGTGCGGGTCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGTATTGCTG  
GTTAGCTGCCGACTAAGGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTTAGGGGGGGGGACTACCAGGGG  
TATCTAAATCTGTTTTGAAACCCCCCCCTTTTCCCCCAATCCAGCCGTCAAAATTAACAAAAACAAAAA  
GTTTCCCCCTTTTCTCCCCACCTGGGGGGGTGTTTTTTT

>45-F

CCCGTGCAGGGGGCAGCGGTTTCCGGGATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG  
CCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAG  
CGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAACGACGCTGATGTGCGA  
AAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTTC  
CGCCCCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATT  
GACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCC  
TTTGACAACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCTTCCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGT  
CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCAGCATT

>45-R

CCCCAATGGTTTTGGCTCCACCTTTCGACGGCTAGCTCCATAAATGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGCCCTTCA  
TCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGCTACGATTCCCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGA  
TTCCAGCTTCATGTAGTGCAGATTGCAGACTACAATCCTCAACTGAGAACAACCTTTATGGGATTTGCATGACCTCCGC  
GGTTTAGCTGCCTTTTGTATTGTCAATTGAAGCATGTGTGTAGCACAAATCATAAGGGGCATGATGATATTGACTTCT  
TCCCTACCTTCTCTCGGTTGGTAACTGGAAGTCAACTTAATAGTGTCTACTAATTTGCGGGTAATCAACCTTAAGGG  
GTTTGTGCTCGGTGCGGAAATTAACCTAAACATCTACACGTCTCTCGATGATTAATTTCTTTTTTCCACTCTTCATTCT  
TGCTCCCCCAAGGTGAAGTTTCTTTCTATCAAGACGTTCAACCAATGTAATAATTTCTTAACCATTACTTCAAATA

ATTTTTACAAACCAAACCTAATAACTCATACCATTTGGTTTCTTCTCCACTACACCTCCTCACAATAAAGTTTAAAC  
TTTTTTTCTCGATTCTATCTCCTCAAGGCTAGCTATTTTTACAATCTCTTTGTGCGCCGGAAGAATTGCTAAAACGA  
ATAAATGAAATATACATAAAAAAAATCGAAATTATGATATCTTACTTGAGACTTTTTCTAGCTCCCCGAAAGCGACTAA  
AGCAGAAACATAATTCGAAATTATAGATTTGAATTGTATTTGTCTGACCTATTCATATCATTTGTTTCATATCTTGAC  
ATGTTAATTTTCGTTTCTTGATTG

>46-F

AAGGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC  
ACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGG  
TGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAG  
CGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTCCGC  
CCCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAC  
GGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTT  
GACAACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTCTG  
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTAAGCTTAGTTGCCAGC

>47-F

GGCCCGACTAGGAGGCAAGCGTTTCCGGTATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGA  
AAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTG  
TAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTG  
CGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGT  
TTCCGCCCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGATGAAACTCAAAGGA  
ATTGACGGGACCCCGCACAAAGCAGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCACCCCTATAACCTCCCTACTCTGTGTC  
CTCCCTCGAGAATTCATATATATAGCCTTCCCCTCGGGGAAAAAATATCCTGGGGTGTATTTTTTTTTTTAATAA  
TATATAAAATATGTTTCAACTATTTGGAGGGTTACATAAAATTTCTTATTAATTCACACCCCTAGTGTCTGCTCCT  
CCCCAGGGGAGAATTTCCAATTTGATTTTGTCTTATGTATATATGTGGTGGAAAAAAACACCTCACACCCCTTTC  
ACACCCCTCCTTGGTGTACTCGCGCCCGGGACACCCACGCCCTCCATCCAAACCTCCTCTGTTTTTTTTACCCCTT  
CCCTCCTCCCCCTTTCTTCCCCCACCCTCACTCCTCCCAAATGCCCCACTACAATCTCTTCTCCATCTTA

>47-R

AATTCATTTTGGTCCCACCTTCGACGGCTAGCTCCATAAATGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAACTCTCGT  
GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATGTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAG  
CTTCATGTAGTTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAACTGAGAACAACCTTTATGGGATTTGCATGACCTCGCGGTTAGCT  
GCCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTATCCCCACCTT  
CCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCAACTTAGAGTGCCTAACCTAATGCTGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTG  
CGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCCGAAGGGGAA  
GGCTCTATCTCTAGAGTTGTCAAAGGATGTCAAAGATTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCT  
CCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCCTGCTACTCCCCAGGCGGAGTGTAAATG  
CGTTAGCTGCAGCTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGGTTTACGGCTGGGACTTACCAGGGG  
TATCTAAATCCCGGTTTGGAAACCCCTCCCTTTTCCCACAAATTAAGGCCGTTAAATTTAAAAAACCAC  
CAAAAAAAGGGCCCGCCCTTCTCTTCCCCCCCCCACACCGCTCTGGGTGGGGGGT

>48-F

AGGGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCA  
CGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGT  
GAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGC  
GTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTCCGC  
CCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACG  
GGACCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTG  
ACAACCTCTAGAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTCTG  
AGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTAAGCTTAGTTGCCAGC

>50-F

ATGGGCGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC  
ACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGG  
TGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAG  
CGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTCCGC  
CCCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAC  
GGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTT  
GACAACCTCTAGAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTCTG  
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTAAGCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTGGGCACCTAAGTTGA  
CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAGGGTGGGATGACGTCAAATCATGCCCCCTTATGAATTTGGCTTCCACAGT  
GGCCTACAATGAAAAATACAAAGGGGCCACTAAACCCCGAGGGTCTCGCCAAACCCCCATAAAAAATTTTTTTT

TCCAAATTTTGGGAATTTTGTGTTGATTTCCCTCCGGCACCCCCCTCCCCACCCACCTACCCCCGACGAAAAAAAA  
ACACGCCTTTGTG

>50-R

AAATTCATTTTGGTCCCCCTTCGACGGCTAGCTCCATAAATGGTTACTCCACCGCTTCGGGTGTTACAACTCTCG  
TGGTGTGACGGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCA  
GCTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAACCTGAGAACAACTTTATGGGATTTGCATGACCTCGCGGTTTAGC  
TGCCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCT  
TCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCAACTTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTT  
GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTTGTCCCCGAAGGGGA  
AGGCTCTATCTCTAGAGTTGTCAAAGGATGTCAAAGATTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGC  
TCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTTCGCGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGTAAAT  
GCGTTAGCTGCAGCATAAGGGGGCGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGCGGTGGAATACCAGGGTAT  
CTAAATCTGGTTTGAACCCCAACCCCTTTTCCCCACATCAACCGGCCAATTTTAAAAAACCCAAAAAAGTCCCCC  
CTTTTCCCCCCCCCGGGGGGGGGTTTCCCTCCCCCAATTATTTTT

>51-F

ATATGCATGGGGGCAAGCGTTATCCGGGATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTCAA  
AGCCACCGCTCAACCGTGGAGGGTCAATGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGT  
AGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAACGACGCTGATGTGC  
GAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTT  
TCCGCCCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAA  
TTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACAT  
CCTTTGACAACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGT  
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTAAGCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACCTAA  
GTTGACTGCCGGTGACAAACCGGGAGGAGGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACA  
ACGTGCCTACAATGGAACAAAACAAAGGGGCACCCAAAACCCCGGAGGGTTCATGGCAAAATCCCCCAAAAAAAGT  
TTTTTTTTTCCAACAATTTTTCGGGAAAATGTTGGATGATCTTTCTGCGCCCCACCCCCCCCCCCCCCAACAACCTCT  
ACACCAACACCACCATATAGGA

>51-R

CAAATTCCTTTTGGTCCCACCTTCGACGGCGAGCTCCATAAATGGTTACTCCACCGCTTCGGGTGTTACAACTCTCG  
TGGTGTGACGGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCA  
GCTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAACCTGAGAACAACTTTATGGGATTTGCATGACCTCGCGGTTTAGC  
TGCCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCT  
TCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCAACTTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTT  
GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTTGTCCCCGAAGGGGA  
AGGCTCTATCTCTAGAGTTGTCAAAGGATGTCAAAGATTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGC  
TCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTTCGCGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGTAAAT  
GCGTTAGCTGCAGCATAAGGGGGCGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGCGGTGGACTACCAGGGGT  
ATTCTAATCCTGTTTGGATCCCCACGCCTTTTCCCCACATCCACCGGTCAGATTAAAAAACCCAAAAAAGTCCC  
CCCTTTTCCCCCCCCCGGGGGGGGGTTTCCCTCTCCACAAA

>52-F

AACAGCTAAGTGGGCAGCGGTTACCGGTATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG  
CCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAG  
CGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAACGACGCTGATGTGCGA  
AAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTTC  
CGCCCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATT  
GACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAAATCTTGACATCC  
TTTGACAACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGT  
CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTAAGCTT

>52-R

AGTCTTTTTTGTCCCCACCTTCGACGGCGTGTCCATAAATGGTTACTCCACCGCTTCGGGTGTTACAACTCTCGT  
GGTGTGACGGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAG  
CTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAACCTGAGAACAACTTTATGGGATTTGCATGACCTCGCGGTTTAGCT  
GCCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT  
CCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCAACTTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTG  
CGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTTGTCCCCGAAGGGGAA  
GGCTCTATCTCTAGAGTTGTCAAAGGATGTCAAAGATTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCT  
CCACCGCTTGTGACGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTTCGCGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGTAAATG  
CGTTAGCTGCAGCATAAGGGGGCGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGCGGTGGACTACCAGGGTAT  
CTAAATCTGGTTTGGATCCCCACGCCTTTTCCGCCACATCCACCGGTCAGTTTACAAAAACCCAAAAAAGGGCCCCC  
CTTTTCCCCCCCCCTGGGGGGGGGGTTTCCCTCCCCACCA

>53-F

CCAAACAGCAAGAGGGCAAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT  
GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATG  
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTGCAGCTGAGG  
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGCTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGG  
GTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAG  
GAATTGACGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGA  
CATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCTTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCG  
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCCTCATTTAGTTGGGCACCTCT  
ACGAGCTTCCCGGTGACAAACCGGAGGAAAGGTGGGGATGAACTTCAAATCATTCATGCCCCCTTAATGACCTGGGG  
CTACACCCCGTGGTTACAAATGGGGAAAGTACAAACCGAGGGTCGCCTAAAAACCCGCGAAGGGCCCTTGGCCAAA  
AATCCCTCTTTTTAAAAAGGGCTTTTTTCCTTCCCAAATTTTTTTTCGGGGGAAAAT

>53-R

CCAATTCATTCTATCCCACCTTAGCGGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCACCAGCTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTG  
GTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTACCAGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGC  
TTCATGCGAGTGGGTTGCAAGCTGCAATCCGAACCTGAGAGAACTTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGA  
CTCGTTGTACTTCCCATTTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTC  
CTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGC  
GGGACTTAACCAACATCTCAGCACAGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGC  
TCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTTCGAATTAACCACATGCTCCA  
CCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGT  
TTGCTGCAGCACTGAAGGGGCGAAACCTCCAACACTAGCACTCCTCGTTTACGGGCGGGACTACCAGGGGAATCT  
AAATCCTGGGTTTGTCTCCCCACCCCTTTTTCAAGCCCCAGCCGTACAGTTTACAAAAACCAAGAAAAAACCCCC  
CCTTTTTCCCCCCCCCGTGGGGGGGGTTTTTTTCCCTTCCCT

>54-R

CCGGTTCAGGAATCCACAAGTGGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGC AACCCACTCCCATG  
GTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTACCAGTAGCATTTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGCAC  
TTCATGGAGTTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGACTACGACGCACTTTATGAGGTCGCTTGCCTCGCGAGGTCGCTT  
CTCTTTGTATGCGCCATTTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTC  
CTCCGGTTTATACCGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTG  
CGGGACTTAACCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCAGGACCA  
AAGCATCTCTGCTAAGTTCCTGGATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCC  
ACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGACTTAACCGG  
TTAGTCCGGAAGCCACGCCCTCAGGGCACAACCTCCAAGTCGGAATCGTTTACGGGGGGGACTAACCAGGGGATC  
TAATCCTGGTTTTGTCTCCCCACGGCTTTTTCCCCCCCCGAAACCGTTCCAGTCTTTTCGTCCCCAGGGGGGGCCCC  
CCTTTTTTCCCCCCCCCGGGGGTTTTTTTTTCCCCCCCCCCCCACAGAAAA

>54-R

CCGGTTCAGGAATCCACAAGTGGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGC AACCCACTCCCATG  
GTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTACCAGTAGCATTTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGCAC  
TTCATGGAGTTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGACTACGACGCACTTTATGAGGTCGCTTGCCTCGCGAGGTCGCTT  
CTCTTTGTATGCGCCATTTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTC  
CTCCGGTTTATACCGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTG  
CGGGACTTAACCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCAGGACCA  
AAGCATCTCTGCTAAGTTCCTGGATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCC  
ACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGACTTAACCGG  
TTAGTCCGGAAGCCACGCCCTCAGGGCACAACCTCCAAGTCGGAATCGTTTACGGGGGGGACTAACCAGGGGATC  
TAATCCTGGTTTTGTCTCCCCACGGCTTTTTCCCCCCCCGAAACCGTTCCAGTCTTTTCGTCCCCAGGGGGGGCCCC  
CCTTTTTTCCCCCCCCCGGGGGTTTTTTTTTCCCCCCCCCCCCACAGAAAA