

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

RODRIGO AMARAL KULZA

**Análise da estrutura populacional de *Tetragonisca* (Hymenoptera,
Meliponini) por marcadores microssatélites e rede de interações**

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
MAIO - 2015**

RODRIGO AMARAL KULZA

Análise da estrutura populacional de *Tetragonisca* (Hymenoptera, Meliponini) por marcadores microssatélites e rede de interações

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^a Dr^a Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki.

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
MAIO – 2015**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Capes), pelo apoio financeiro concedido.

À professora doutora Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuk, pelo carinho, paciência, compreensão, orientação e confiança na minha capacidade para realizar este trabalho.

Às professoras doutoras Claudete Aparecida Mangolin e Maria de Fátima Pires Silva Machado, pela coorientação e carinho e pela paciência e compreensão durante a realização deste trabalho.

À minha mãe, Maria do Carmo Ortiz Amaral Kulzam e a toda minha família, pela compreensão e encorajamento.

Aos companheiros de laboratório, pelo auxílio, ensinamentos e por tornarem a rotina experimental mais divertida.

A todos os meus amigos, por dividirem comigo as alegrias e as tristezas da vida.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Abelhas sem ferrão	3
2.2. Aspectos gerais das abelhas <i>Tetragonisca</i>	4
2.3. Marcadores Moleculares	7
2.4. Microsatélites (SSR).....	8
2.5. A pesquisa em <i>Tetragonisca</i>	9
2.6. Redes de interações	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Material biológico	11
3.2. Extração do DNA nuclear.....	12
3.3. Amplificação dos locos microsatélites (SSR)	13
3.4. Análise dos dados.....	14
3.5. Análise das redes de interações	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1. Identificação morfológica.....	16
4.2. Análise molecular por microsatélites	17
4.2.1. Distribuição genotípica e alélica.....	17
4.2.2. Diversidade gênica	21
4.2.3. AMOVA.....	21
4.3. Redes de interação	24
5. CONCLUSÕES	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

RESUMO

KULZA, Rodrigo Amaral, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, maio de 2015. **Análise da estrutura populacional de *Tetragonisca* (Hymenoptera, Meliponini) por marcadores microssatélites e rede de interações.** Orientadora: Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki. Conselheiras: Claudete Aparecida Mangolin e Maria de Fátima Pires da Silva Machado.

A jataí (*Tetragonisca angustula*), amplamente distribuída pela América Latina e cujo mel apresenta diversas propriedades medicinais, é a abelha sem ferrão mais manejada pelos meliponicultores. Esta abelha apresenta variação na coloração de uma parte do tórax, denominada mesepisterno, que pode ser preto, amarelo ou misto, e classificada, dependendo do pesquisador, em duas espécies, *T. angustula* e *T. fiebrigi*, ou duas subespécies, *T. angustula angustula* e *T. angustula fiebrigi*. Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de elucidar essa questão taxonômica, utilizando-se demarcadores genéticos, como a técnica de locos de sequências simples repetidas (SSR), que permite a análise da estrutura e divergência genética populacional, possibilitando caracterizar as populações amostradas. O objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade genética das populações de *T. angustula* amostradas, utilizando a técnica SSR e verificar a interação de marcadores moleculares utilizados em outros trabalhos com as variantes morfológicas de *T. angustula*, para verificar a possível existência de um marcador que as diferencie geneticamente. Um total de 60 indivíduos (cinco por ninho) foi amostrado em Maringá, Cianorte e Terra Boa, estado do Paraná, sul do Brasil. O acesso à variabilidade genética foi realizado pela análise de quatro locos de microssatélites e os resultados mostraram que todos os locos se apresentaram polimórficos. O valor de $F_{ST}=0,1173$ obtido evidencia que as populações estão moderadamente diferenciadas e a análise de variância molecular indica que 76% da variação ocorre dentro das populações analisadas. O maior valor de delta K obtido por inferência bayesiana estimou o número real de populações em 3 ($K=3$). A análise das redes de interações permitiu verificar que existem mais interações com os marcadores isoenzimáticos, mas que nenhum dos marcadores moleculares analisados permitiu separar *T. angustula* em duas espécies.

Palavras-chave: jataí, SSR, diferenciação específica.

ABSTRACT

KULZA, Rodrigo Amaral, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, Maio, 2015. **Analysis of the population structure of *Tetragonisca* (Hymenoptera, Meliponini) by microsatellite markers and network interactions**. Adviser: Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki. Committee Members: Claudete Aparecida Mangolin e Maria de Fátima Pires da Silva Machado.

The jataí (*Tetragonisca angustula*) is the most stingless bee managed by beekeepers, whose honey has many medicinal properties and it's widely distributed throughout Latin America. This bee has a variation in the coloring in a part of thorax called mesepisterno which can be black, yellow or mixed, and depending on the researcher is classified into two species (*T. angustula* and *T. fiebrigi*) or two subspecies (*T. angustula angustula* and *T. angustula fiebrigi*). Several studies have been conducted in order to elucidate this taxonomic question using genetic markers, as the technique of simple repeated sequences loci (SSR), which allows the analysis of the population structure and genetic diversity, making it possible to characterize the sampled populations. The objective of this study was to analyze the genetic variability of populations of *T. angustula* sampled using the technique SSR and verify the interaction of molecular markers used in other works with the morphological variants of *T. angustula* to check whether there is a marker that differentiates genetically. A total of 60 individuals (five per nest) were sampled in Maringá, Cianorte and Terra Boa, Paraná state, south of Brazil. Access to genetic variability was performed by analysis of four microsatellite loci. The results showed that all loci displayed polymorphism. The value of $F_{ST} = 0.1173$ obtained shows that populations are moderately differentiated and analysis of molecular variance indicates that 76% of the variation occurs within populations analyzed. The largest delta value K obtained by Bayesian inference estimated the actual number of people equal to 3 ($K = 3$). The analysis of interaction networks has shown that there are more interactions with isozymes, but that none of the analyzed molecular markers allowed separate *T. angustula* into two species.

Keywords: jataí, SSR, specific differentiation.

1. INTRODUÇÃO

As abelhas da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae) são conhecidas como abelhas sem ferrão, indígenas ou nativas (Camargo e Pedro, 2007). Apresentam distribuição tropical, ocorrendo nas ecozonas neotropical, afro-tropical ou etiópica, e indo-malaia (Michener, 2007). Essas abelhas apresentam importante papel ecológico, devido às suas relações ecológicas, com destaque à polinização. Esta é de grande importância ambiental e econômica, pois propicia a reprodução e manutenção da diversidade de espécies vegetais, além de fonte de renda para criadores, por meio da produção de mel (Kremen et al., 2007).

Dentre as abelhas da tribo Meliponini, a espécie mais conhecida e criada racionalmente é a *Tetragonisca angustula*, conhecida popularmente como jataí (Nogueira-Neto, 1997). É um grupo de abelhas que apresenta aparente plasticidade adaptativa para diferentes condições de nidificação, por exemplo, em buracos de muros, troncos ocos de árvores, caixa de luz, blocos de concreto ou de cerâmica, tubos de pvc e mesmo em cavidades subterrâneas superficiais (Aidar, 1999; Castanheira e Contel, 2005). Essa plasticidade promoveu sua adaptação inclusive ao meio urbano, o que não ocorreu com a maioria das espécies de abelhas nativas, que são exclusivas nidificadoras de ocos em troncos de árvores.

Atualmente, não existe um consenso sobre a classificação de *T. angustula*, com alguns autores classificando-a em duas subespécies (*T. angustula angustula* e *T. angustula fiebrigi*) (Schwarz, 1938), e outros em duas espécies (*T. angustula* e *T. fiebrigi*) (Camargo e Pedro, 2007). Ambas as classificações baseiam-se em diferenças morfológicas, separando-a por diferenças encontradas na pigmentação da região torácica, denominada mesepisterno (Oliveira et al., 2004; Castanheira e Contel, 2005).

Castanheira e Contel (2005) buscaram identificar diferenças entre as subespécies por meio da variação alélica da enzima hexoquinase. Oliveira et al. (2004) investigaram relações de parentesco entre as subespécies, por meio da comparação de regiões de DNA mitocondrial e morfometria multivariada. Estudos realizados com marcadores RAPD também demonstraram dois grupos distintos (Oliveira et al., 2004; Baitala et al., 2006). Embora estes estudos tenham

demonstrado grande variabilidade genética entre as populações, eles não forneceram base para separar as subespécies.

Ao utilizar isoenzimas esterases, Stuchi et al. (2012) obtiveram resultados que corroboram a denominação de espécie para *T. angustula* e *T. fiebrigi*, como descrito por Camargo e Pedro (2007), sendo encontrados em operárias de *T. fiebrigi* as esterases 1, 2 e 4 e em *T. angustula* as esterases 3 e 4.

A obtenção de marcadores genéticos que possam vir a diferenciar essas abelhas é uma ferramenta importante, pois estes irão contribuir com estudos sobre a distribuição desses meliponíneos nas áreas neotropicais, além de servir de base para o planejamento de estratégias de conservação, tanto no ecossistema como nos meliponários.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a estrutura e diversidade populacional de *Tetragonisca angustula* e *T. fiebrigi* com marcadores microssatélite. Juntamente com as análises moleculares, esta pesquisa buscou determinar o grau de interações de cada grupo dessas abelhas com os diversos marcadores moleculares descritos na literatura, na tentativa de encontrar um marcador ou alelo que melhor evidencie a diversidade dessas abelhas.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Abelhas sem ferrão

As abelhas possuem relações ecológicas que são de grande importância para a manutenção da integridade dos ecossistemas, dos recursos naturais e bem-estar humano (Kremen et al., 2007). Uma delas é a associação abelha-flor, que teve início há mais de 50 milhões de anos e, desde então, as abelhas dependem das flores para obtenção de substâncias utilizadas na alimentação, como, néctar para a demanda energética, e pólen, para a proteica (Velthuis, 1997), lipídios florais, como alimento e construção do ninho, fragrâncias, como atrativo para cópula e marcação de território (Roubik, 1992), e as plantas são beneficiadas quando polinizadas (Imperatriz-Fonseca et al., 1994).

A polinização é um processo crucial em quase todos os sistemas produtivos terrestres, até mesmo nas regiões mais remotas do Ártico e em desertos, além de sistemas de produção altamente gerenciados, como hidroponia e casas de vegetação (Kevan, 1999). O déficit de polinização resulta em perdas de produtividade e de qualidade dos produtos agrícolas (MMA, 2006), pois a polinização garante a manutenção da diversidade de espécies vegetais e propicia a fecundação cruzada, que preserva a variabilidade genética da comunidade vegetal, condição importante para a etapa de seleção em programas de melhoramento de plantas (Pinto, 2009).

A maioria das plantas cultivadas e das espécies de florestas tropicais é polinizada por insetos, principalmente por abelhas (Michener, 2007). As regiões neotropical (que compreende a América Latina) e indo-malaia são os locais com maior diversidade de abelhas da tribo Meliponini, popularmente conhecidas como abelhas sem ferrão (Camargo e Pedro, 1992). Essas abelhas, também denominadas de abelhas indígenas sem ferrão ou nativas, são mais comumente representadas no Brasil pelas jataís (*Tetragonisca* sp.), mandaçaia (*Melipona* sp.) e a irapuá (*Trigona* sp.), que apresentam hábito social avançado, com ninhos construídos geralmente em cavidades pré-existentes (occos de árvores e ninhos abandonados) e origem biogeográfica indeterminada.

No Brasil, estima-se que são encontradas 300 espécies de abelhas sem ferrão, distribuídas em diversos biomas, como o da Mata Atlântica, Cerrado, Floresta

Amazônica e Pantanal (Camargo e Pedro, 2007). Conforme o ecossistema, são responsáveis pela polinização de 40 a 90% das espécies vegetais nativas (Kerr, 1997), devido à baixa sobreposição na utilização de recursos florais entre *Apis mellifera* e os meliponíneos (Pedro e Camargo, 1991; Nogueira-Ferreira e Augusto, 2007).

2.2. Aspectos gerais das abelhas *Tetragonisca*

Dentre as espécies de meliponíneos mais comuns e manejadas, está a jataí (*Tetragonisca angustula*, Latreille, 1811) (Moure, 1961). São abelhas bastante mansas, podendo ser criadas racionalmente em áreas rurais ou urbanas. Como apresentam ferrão atrofiado, seu manejo é facilitado, dispensando o uso de equipamentos de proteção e possibilitando o emprego de mão de obra familiar, inclusive no meio urbano (Nogueira-Neto, 1997).

A jataí é uma espécie de abelha generalista (visita flores de várias espécies de plantas), apresenta comportamento altamente eussocial, que implica em sobreposição de gerações, divisão do trabalho com um sistema de castas, cuidado cooperativo da prole e diferenças morfológicas entre rainhas e operárias (Michener, 2007). As operárias de *T. angustula* caracterizam-se morfológicamente pelo corpo pequeno (aproximadamente 4-5 mm de comprimento) e por apresentarem a corbícula (concauidade na tíbia posterior) extremamente pequena (Michener, 2007). Em abelhas altamente eussociais, todas as operárias são morfológicamente iguais. Contudo, em *T. angustula* existe um grupo de operárias “guardas” (protegem o ninho) que apresentam pernas maiores e cabeças menores do que as forrageiras (Grüter et al., 2012).

A colônia dessas abelhas é constituída por uma rainha, responsável pelo desenvolvimento da mesma, realizando uma postura de até 50 ovos por dia na época de boa florada; zangões, que têm a função de fecundar a rainha na época de procriação; e pelas operárias, que realizam todo o trabalho da colônia, semelhante às operárias da abelha europeia (*Apis mellifera*) (Kerr et al., 1996).

A morfologia da entrada do ninho é tipicamente um tubo com 3 a 4 cm de comprimento, construído de cerume (Figura 1) (Nogueira-Neto, 1997). O ninho de jataí é constituído por discos de cria horizontais, envoltos por um invólucro de cerume, formado por várias lamelas (Figura 2), com função termorreguladora

(Campos, 1980). Depósitos de própolis dentro do ninho são encontrados juntamente com a cera para fechar buracos e para construir as paredes das células do ninho, no qual ficam os ovos e os potes de alimento (Kerr et al., 1996).



Figura 1 - A - Enxameamento em torno de uma isca e de uma caixa rústica de criação em uma fazenda, no município de Terra Boa, onde foi realizada coleta de abelhas. B – Caixa rústica de criação de abelhas jataí, presentes em um sítio na cidade de Cianorte. C – Ninho natural encontrado em oco de parede em um sítio na cidade de Terra Boa. D – Entrada de um ninho natural em oco de parede em prédio da Universidade Estadual de Maringá.

O mel dessas abelhas é composto essencialmente de levulose, uma substância mais doce que a sacarose e, apesar de a quantidade produzida por colônia ser baixa, é muito apreciado, pois seu sabor é peculiar (Lopes et al., 2005). Apresenta efeitos imunológico, antiinflamatório, analgésico, sedativo, expectorante, hipossensibilizador e antibacteriano (Breyer, 1983).

No Catálogo de abelhas Moure, Camargo e Pedro (2007) classificam o gênero *Tetragonisca* como parte da tribo Meliponini, sendo composto pelas espécies *T. buchwaldi*, *T. weyrauchi*, *T. angustula* e *T. fiebrigi*.



Figura 2 – Ninho de *T. angustula* em caixa rústica mostrando: A – Potes contendo o mel e o invólucro de cerume formado por lamelas, encobrindo os discos horizontais de cria. B – discos horizontais de cria evidenciados após a retirada do invólucro de cerume, rainha e operária.

T. angustula está distribuída desde o Sul do México até a Argentina, podendo ser encontradas por todo o território brasileiro, enquanto que *T. fiebrigi* está restrita à Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil, nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo (Nogueira-Neto, 1997).

Castanheira e Contel (2005) propuseram que *T. angustulae* *T. fiebrigi* fossem classificadas como duas subespécies, *T. a. angustula* e *T. a. fiebrigi*, podendo ser separadas morfologicamente pela coloração do mesepisterno na região torácica, com *T. a. angustula* apresentando coloração negra e *T. a. fiebrigi* coloração amarela. Estas autoras ainda descreveram a existência de híbridos, que apresentam mesepisterno negro com manchas amarelas (Figura 3).

O fato dessas abelhas apresentarem ampla gama de lugares para nidificação, tendo adaptado-se ao meio urbano, somado à sua importância ecológica e econômica, torna de suma importância a resolução dessa incerteza taxonômica. O conhecimento do nível de variação genética e da sua distribuição entre e dentro de populações é fundamental para o manejo de espécies naturais visando a sua conservação e exploração comercial (Dias e Kageyama, 1991). Dessa forma, os estudos da biologia de populações, que envolvem aspectos demográficos, ecológicos e genéticos, são necessários, pois permitem obter dados que esclareçam sobre táxons controversos, que resultam em diferentes medidas de conservação e de manejo (Haig, 1998).

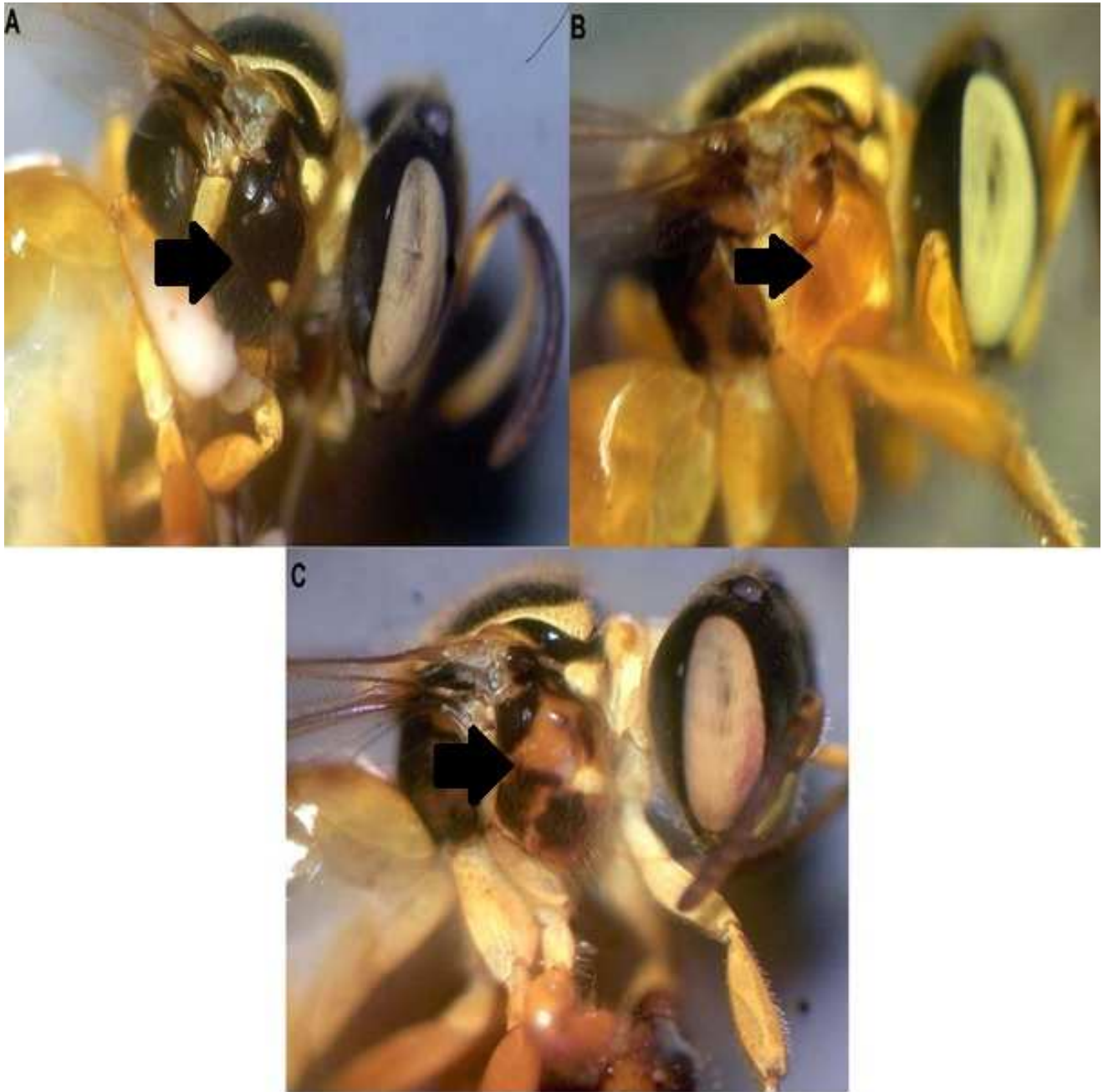


Figura 3 – Vista lateral do tórax de três operárias de jataí e classificação segundo Castanheira e Contel (2005) pela coloração do mesepisterno (setas). A – mesepisterno preto de *T. angustula*. B – mesepisterno amarelo de *T. fiebrigi*. C – mesepisterno de coloração híbrida.

2.3. Marcadores moleculares

Existem diversas estratégias para a avaliação da variabilidade genética. Dentre elas, as análises com base em caracteres morfológicos e fenotípicos são pioneiras, mas não são totalmente resolutivas e confiáveis, pois o número de caracteres é limitado, além de haver forte influência dos fatores ambientais e

diferenças de acordo com o estágio de desenvolvimento do organismo (Marques, 2002). Dessa forma, a análise genética dessas abelhas por meio da utilização de marcadores moleculares na tentativa de distinção das espécies é de grande importância.

Um marcador molecular pode ser definido como todo e qualquer fenótipo decorrente da expressão de um gene, como no caso de proteínas, ou de um segmento específico de DNA (correspondentes a regiões expressas ou não do genoma), cuja sequência e função podem ou não ser conhecidas (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Após a elucidação da estrutura molecular do DNA na década de 1960, o uso de marcadores moleculares de DNA tornou-se importante ferramenta na avaliação da variabilidade genética. Esses marcadores são de grande aplicabilidade, pois auxiliam na melhor compreensão dos genomas, podendo ser utilizados em testes de paternidade, na caracterização de variabilidade genética e na elucidação de relações genéticas existentes entre genótipos. Auxiliam ainda no desenvolvimento de metodologias para o manejo e conservação da variabilidade genética existente em bancos de germoplasmas e possibilitam a identificação de genes ou a associação de marcas relacionadas a importantes características de interesse biológico e agrônômico (Hayden et al., 2010).

2.4. Microssatélites (SSR)

Os microssatélites, também conhecidos por locos de sequências simples repetidas (SSR), ou repetições curtas em *tandem* (STR), são repetições de 1 a 6 pares de bases (pb), distribuídas aleatoriamente no genoma dos eucariotos e procariotos (Jacob et al., 1991). As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo a seleção de *primers* específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos (Schlötterer, 2000). O polimorfismo é detectado quando existe diferença no comprimento do segmento, sendo que cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco. O produto da amplificação é separado por eletroforese em géis de agarose de alta resolução ou em géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata (Borém et al., 2009).

Os marcadores SSR constituem a classe mais polimórfica de marcadores moleculares atualmente disponíveis. Muito frequentes, distribuídos ao acaso, são caracteres mendelianos e codominantes que permitem a mais completa cobertura de qualquer genoma eucarioto (Strassmann et al., 1996). Todas estas características reunidas fazem com que os marcadores baseados em SSR sejam ideais para o mapeamento genético e físico de genomas, bem como para a identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

2.5. A pesquisa em *Tetragonisca*

Diversas pesquisas envolvendo marcadores bioquímicos e moleculares foram realizadas com *T. angustula*, com o intuito de analisar a estrutura genética de populações dessa espécie. Análises envolvendo o uso de PCR-RFLP (Koling e Moretto, 2010) e divergência cariotípica entre *T. angustula* e *T. fiebrigi*, com a presença de cromossomos B ocorrendo em *T. fiebrigi* (Barth et al., 2011) sustentam a separação específica descrita por Camargo e Pedro (2007). Pesquisas utilizando marcadores isoenzimáticos realizadas por Stuchi et al. (2012) reforçam a classificação sugerida por Camargo e Pedro (2007) em dividir em duas espécies, *T. angustula* e *T. fiebrigi*, ao verificar diferenças no número de esterases, no padrão de migração eletroforética, na afinidade por substrato e na termoestabilidade.

Por outro lado, por meio do sequenciamento de regiões de DNA mitocondrial e análise de microssatélites, Francisco et al. (2014) relataram a ocorrência de hibridação entre *T. angustula* e *T. fiebrigi*, e que a divergência entre as espécies é recente e com introgressão assimétrica, sugerindo a classificação de subespécie.

Santos (2014) analisou a variabilidade genética em amostras de *T. angustula*, *T. fiebrigi* e híbridos de três estados brasileiros (Paraná, Rondônia e São Paulo), utilizando a técnica PCR-RFLP. Ela verificou que *T. angustula* e *T. fiebrigi* não estão totalmente separadas, havendo hibridação entre elas e que esta ocorreu entre fêmeas de *T. angustula* e machos *T. fiebrigi*.

Em estudos realizados utilizando o marcador RAPD, não foi possível a diferenciação específica, somente populacional (Oliveira et al., 2004; Alves et al., 2006; Baitala et al., 2006).

2.6. Redes de interações

Redes de interações é uma metodologia que utiliza meios gráficos para facilitar a compreensão da dinâmica das relações mutualísticas, pois permitem uma representação de sua complexidade e uma avaliação de toda a estrutura das interações (Bascompte e Jordano, 2007). A metodologia possui ampla aplicabilidade, sendo largamente utilizada em estudos administrativos, de impacto ambiental e ecológicos (interação planta-polinizador, hospedeiro-parasita), na internet, como em redes sociais e nas vias metabólicas no interior das células (Albert e Barabasi, 2002). Dessa forma, a abordagem de redes permite estudar problemas aparentemente bem diferentes e explicar processos fundamentais como derivados de princípios comuns (Amaral e Ottino, 2004).

Diferentes padrões estruturais podem ser observados em redes de interações. Eles permitem a inferência sobre os processos que organizam as redes estudadas e auxiliam na predição de como a estrutura das interações entre os elementos do sistema modulam processos de interesse (Guimarães Junior, 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

Foram utilizadas operárias adultas de *T. angustula* e *T. fiebrigi*, coletadas em quatro localidades do estado do Paraná: Maringá (seis ninhos), Cianorte (um ninho), Terra Boa (quatro ninhos) e Malú (um ninho), distrito de Terra Boa (Figura 4). As abelhas foram coletadas, de forma aleatória, em garrafas pet posicionadas no canudo dos ninhos, preferencialmente ninhos naturais ou caixas racionais que não haviam sido divididas. A coleta procedeu-se até que chegasse a um número próximo de vinte abelhas por ninho. Estas foram sacrificadas por congelamento em freezer e estocadas em frascos com álcool 70%. Estes continham etiquetas com os seguintes dados para preenchimento: data da coleta, município, estado, georreferenciamento, número do ninho, se o ninho era natural ou estava em caixa rústica, ninho dividido ou não, espécie (diferenciada pela coloração do mesepisterno) e número de indivíduos coletados. Após a coleta, os frascos com as abelhas coletadas foram mantidos em temperatura ambiente até a extração do DNA.

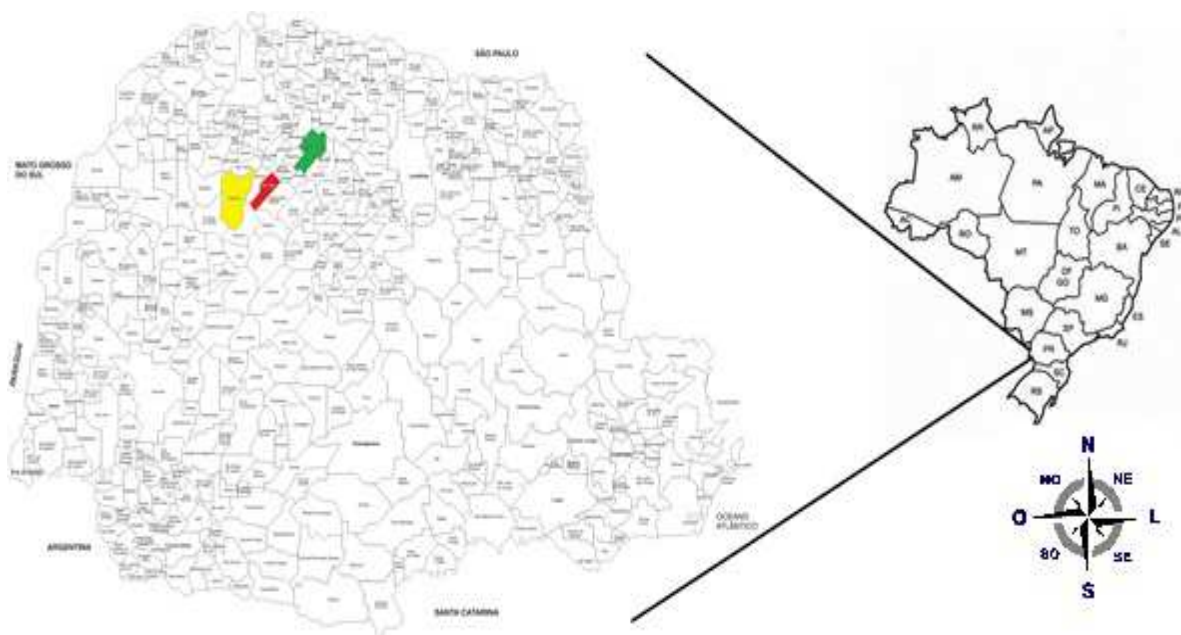


Figura 4 – Representação geográfica dos locais de coleta no estado do Paraná, sul do Brasil, das abelhas *Tetragonisca angustula* analisadas. Maringá em verde, Cianorte em amarelo e Terra Boa em vermelho.

A análise morfológica foi realizada de acordo com a coloração do mesepisterno proposta por Camargo e Pedro (2007) e os resultados estão apresentados no Quadro 1. Dos doze ninhos coletados, seis eram naturais, provenientes de ocos de árvores ou de buracos e canos expostos em paredes. Os outros seis ninhos são provenientes de caixas racionais que os criadores informaram que não haviam sido divididas, apenas usaram iscas para que as abelhas se instalassem nelas.

Quadro 1 – Cidade de coleta, classificação das abelhas coletadas pela coloração do mesepisterno, de acordo com Camargo e Pedro (2007) e coordenadas geográficas do ninho em que a coleta foi realizada

Cidade/estado	Ninho	Coordenadas geográficas	
		Latitude (S)	Longitude (W)
Maringá (PR)	<i>T. fiebrigi</i>	23° 40' 48.178"	51° 93' 92.217"
	<i>T. fiebrigi</i>	23° 40' 22.987"	51° 94' 07.753"
	<i>T. fiebrigi</i>	23° 40' 47.332"	51° 93' 95.289"
	<i>T. angustula</i>	23° 35' 56.437"	52° 06' 97.421"
	Híbrido	23° 35' 56.437"	52° 06' 97.421"
	Híbrido	23° 35' 56.437"	52° 06' 97.421"
Cianorte (PR)	<i>T. angustula</i>	23° 39' 24.955"	52° 32' 23.107"
Terra Boa (PR)	<i>T. angustula</i>	23° 44' 52.345"	52° 25' 39.280"
	<i>T. angustula</i>	23° 44' 52.345"	52° 25' 39.280"
	<i>T. angustula</i>	23° 44' 51.565"	52° 25' 34.816"
	Híbrido	23° 44' 51.565"	52° 25' 34.816"
Malú (PR)	<i>T. angustula</i>	23° 40' 16.860"	52° 22' 47.910"

3.2. Extração do DNA nuclear

A extração do DNA nuclear foi realizada seguindo metodologia descrita por Yu et al. (1993), com modificações. Foi utilizado o DNA do tórax de cinco operárias de cada ninho.

Os tórax foram homogeneizados e macerados, individualmente, em tubos de 1,5 mL, contendo 300 µL de tampão de lise, composto por 200 mM TrisHCl (1M pH 8,0); 50 mM EDTA (0,5 mM pH 8,0); 250 mM (NaCl 5M); 0,5% SDS [10%] e 4 µL de Proteinase K. Esse homogeneizado foi incubado, por 60 minutos, em banho-maria, a

65°C, seguido de centrifugação, por 10 minutos, a 12.000 rpm (10.000 *xg*), e o sobrenadante foi transferido para novo tubo com igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Posteriormente, foi realizada nova centrifugação nos mesmos padrões e repetida a transferência do sobrenadante para novo tubo com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) para desnaturar as proteínas presentes na extração, que ficam insolúveis à fase aquosa em que se encontra o DNA. O sobrenadante final foi transferido para um novo tubo, contendo 250 µL de isopropanol gelado, para a precipitação do DNA e incubado a -20°C *overnight*. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 *xg*, por 10 minutos, e o sobrenadante descartado. O DNA precipitado foi lavado com 1,0 mL de etanol 70%, a -20°C, e deixado para secar em temperatura ambiente. Após a secagem, o DNA foi ressuspendido, por duas horas, em 30 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA), tratado com RNase (10 µg/mL) e mantido por duas horas em temperatura ambiente antes de ser armazenado em freezer a -20°C.

A quantificação do DNA foi avaliada por meio do espectrofotômetro Picodrop (modelo PICOPET01), seguindo as recomendações do fabricante.

3.3. Amplificação dos locos microssatélites (SSR)

As amplificações via PCR foram realizadas em termociclador “Biosystems, Veriti 384” conforme protocolo original descrito por Brito et al. (2009). O processo de amplificação foi iniciado com uma desnaturação inicial, a 94°C, por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de 30 segundos, a 94°C, anelamento por 30s em temperatura específica para cada *primer* (Quadro 2), extensões, por 30 segundos a 72°C, e 5 minutos a 72°C para extensão final.

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 4% (preparado com 50% de agarose MS8 e 50% de agarose comum) a 60 V, utilizando o volume total da reação (20 µL) adicionado a 2 µL de *load* (azul de bromofenol [0,25%] e glicerol [30%]). Para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado marcador de peso molecular de DNA *Ladder* de 100pb (Invitrogen). Após a eletroforese, os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL), por 60 minutos, seguindo com a revelação das bandas por luz ultravioleta e os géis fotodocumentados em sistema L-Pix HE da Loccus biotecnologia.

Quadro 2 - Pares de *primers* de microssatélites, descritos por Brito et al. (2009), que foram utilizados para amplificação de regiões do DNA de *Tetragonisca angustula* e *T. fiebrigi* e suas respectivas temperaturas de anelamento. F – sequência *forward*; R – sequência *reverse*

Par de <i>primers</i>	Loco	Número de repetições	<i>Primers</i> (5'→3')	Temperatura ótima de anelamento
1	<i>Tang11</i>	(GA) ₂₂	F:TATTCCTATTCACGCGATGC R:AGACGATATGGTGGCATTCA	53°C
2	<i>Tang12</i>	(GA) ₂₄	F:CCAGATGCAACCCTTTGACT R:AGGCCCATCGAAGACCAT	53°C
3	<i>Tang77</i>	(CT) ₁₆ CC(CT) ₃	F:CGTTTGAACGATGAACTGGA R:CCTATTTCCGACGCTCTGTC	55°C
4	<i>Tang78</i>	(CT) ₂₃	F:CGAATACGATCTGCACTCCTC R:ATTCACGACGATACGCCACT	55°C

3.4. Análise dos dados

As análises dos dados moleculares envolveram a interpretação dos fragmentos de DNA nuclear obtidos pela eletroforese em gel de agarose.

Foram calculadas as medidas de proporção de locos polimórficos, número médio de alelos, heterozigosidade observada (H_O) e heterozigosidade esperada pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_E). Para determinar a significância da diferenciação genética entre as populações, foi realizada a análise de multi-*loci* utilizando os índices de fixação F_{IS} e F_{ST} calculados pelo *software* POPGENE versão 1.32 (Yeh et al., 1999). A análise de variância molecular (AMOVA) foi obtida pelo *software* GenAlex versão 6.501 (Peakall e Smouse, 2012).

A estimativa do número real de populações foi realizada de acordo com Evanno et al. (2005), utilizando a estatística de delta $K = \ln(P(X/K))$ entre sucessivos valores de K (número de populações) e onde X = probabilidade de observar os dados. A estimativa foi feita com valores de K variando de 2 a 8 e o valor de K utilizado foi aquele que apresentou maior valor de delta K . Esta estimativa foi realizada utilizando o *software* *Structure* 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) e estrutura *Harvester* (http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/). O *burn-in* foi fixado em 3 mil repetições e o Método de Monte Carlo via cadeias de Markov (MCMC) em 30 mil. O número estabelecido de iterações foi 10.

3.5. Análise das redes de interações

As análises foram feitas utilizando-se dados de seis trabalhos do Laboratório de Genética Animal da Universidade Estadual de Maringá. Esses trabalhos

compreendem análises moleculares com diferentes populações de *Tetragonisca* sp. utilizando microssatélites (Bronzato, 2011; o presente trabalho), isoenzimas (Ruiz, 2006; Silva, 2002; Stuchi et al., 2012) e PCR-RFLP (Santos, 2014).

Os dados coletados foram transformados em uma matriz binária para a construção da rede de interações qualitativa, estabelecendo que, quando o indivíduo apresentou determinado alelo, ele recebeu o número 1 (presença do alelo), e quando o alelo não estava presente em um indivíduo, recebeu o número 0 (ausência do alelo).

Os cálculos e os grafos das redes de interações foram obtidos a partir do pacote *bipartite* (Dormann et al., 2008) do *software* R versão 2.14.1 (R Development Core Team, 2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação morfológica

As abelhas coletadas foram separadas em duas populações, com base na distância geográfica entre os ninhos. A primeira população foi constituída pelas abelhas coletadas na cidade de Maringá e a segunda pelas abelhas coletadas nas cidades de Cianorte e Terra Boa, uma distância de 20 km entre as cidades. A cidade de Maringá está a 74 e 64 quilômetros de Cianorte e Terra Boa, respectivamente (Figura 5).

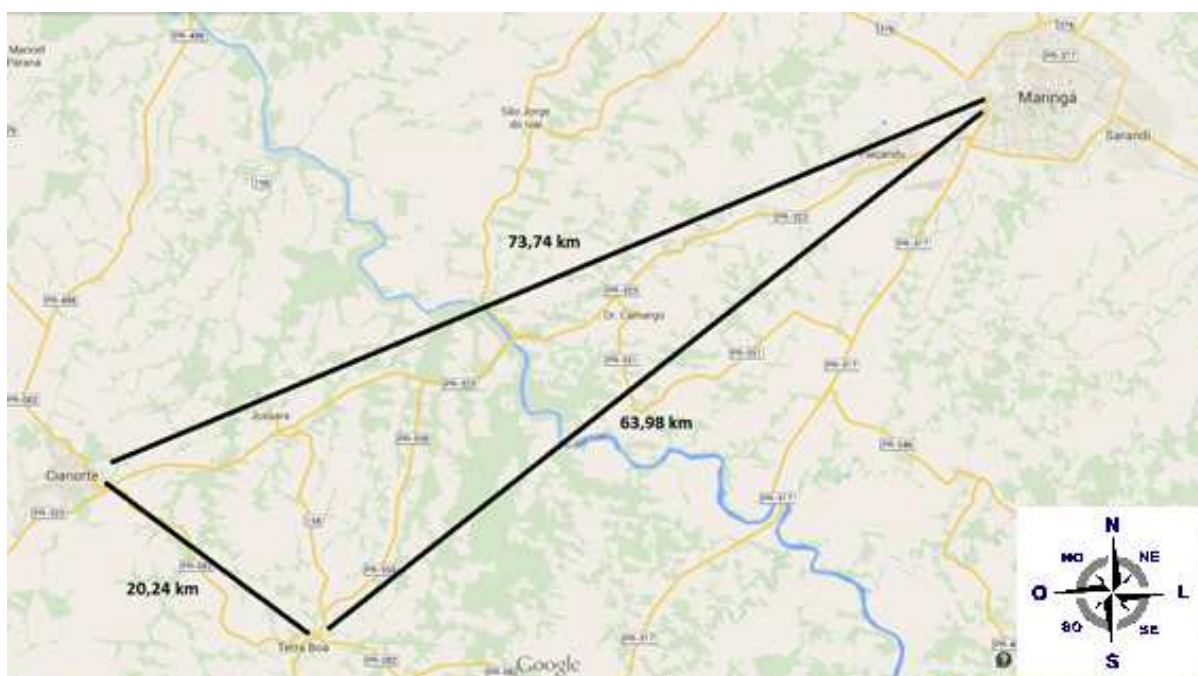


Figura 5 – Mapa marcando a distância entre as cidades em que foram realizadas as coletas.

Na cidade de Maringá, foram coletadas abelhas de seis ninhos. Três deles eram naturais e as abelhas coletadas foram classificadas como *T. fiebrigi*. Os outros três ninhos eram de caixas rústicas, provenientes da Fazenda Experimental de Iguatemi, sendo um com abelhas classificadas como *T. angustula* e os outros dois com abelhas com coloração híbrida.

Na segunda população considerada, as abelhas coletadas na cidade de Cianorte foram classificadas como *T. angustula* e são provenientes de um ninho natural em que o canudo da entrada do ninho estava em contato com o chão, com o

ninho instalado na raiz de uma árvore derrubada. Em Terra Boa, foram coletadas abelhas de quatro ninhos: dois ninhos naturais e um ninho de caixa rústica, que continham abelhas classificadas como *T. angustula*, e outro ninho também de caixa rústica, formado por abelhas de coloração híbrida. Em Malú, distrito de Terra Boa, foram coletadas abelhas de um ninho em caixa rústica, classificadas como *T. angustula*.

4.2. Análise molecular por microssatélites

4.2.1. Distribuição genotípica e alélica

Todos os 4 locos analisados mostraram-se polimórficos na genotipagem dos 60 indivíduos, apresentando um total de 15 genótipos. As duas populações evidenciaram número diferente de genótipos, com um total de doze genótipos na população 1 e dez na população 2. Além disso, a população 1 exibiu um genótipo heterozigoto a mais em relação à população 2 (três e dois genótipos heterozigotos, respectivamente).

Conforme apresentado no Quadro 3, a análise dos quatro locos nessas populações revelou apenas 12 alelos, número bem inferior aos 53 detectados por Brito et al. (2009) com os mesmos quatro locos.

Diferentemente do número de genótipos, a população 2 apresentou maior número de alelos em relação à população 1: onze alelos na população 2, contra dez na população 1 (Quadro 3). O número de alelos detectados por loco variou de dois (*Tang11* e *Tang77*) a quatro (*Tang12* e *Tang78*), com uma média de 3 por loco. Brito et al. (2009), utilizando os mesmos marcadores, obtiveram uma média de 13,25 alelos por loco, variando de 10 a 16 alelos ao analisar 19 ninhos. Acredita-se que o menor número de alelos encontrados no presente trabalho se deve à proximidade geográfica dos ninhos em que as abelhas foram coletadas, quando comparado ao trabalho de Brito et al. (2009) que se utilizaram de abelhas coletadas de ninhos de diversas regiões do Brasil.

No loco *Tang11*, o alelo de 180pb foi o que apresentou maior frequência nas duas populações, variando de 43,33% a 95%. O alelo de 180pb do loco *Tang12* aparece somente na população 1, numa frequência de 6,67%. Esse alelo está

presente em homozigose em dois indivíduos de um mesmo ninho, classificado como híbrido. Por outro lado, o alelo de 210pb deste mesmo loco está presente somente na população 2, numa frequência de 10%. Ele também está presente em homozigose, porém em três indivíduos de um ninho natural, classificado como *T. angustula*. Neste loco, o alelo mais frequente é o de 200pb, variando de 56,67% a 83,33%.

Quadro 3 - Frequência alélica nas populações estudadas, heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e)

Loco	Pop. 1		Heterozigosidades para a Pop. 1		Pop.2		Heterozigosidades para a Pop. 2	
	Alelo (pb)	Frequência			Alelo (pb)	Frequência		
<i>Tang11</i>	180	0,9500	0,0333 (H_o)		180	0,4333	0,0667 (H_o)	
	190	0,0500	0,0966 (H_e)		190	0,5667	0,4994 (H_e)	
<i>Tang12</i>	180	0,0667			180	*****		
	190	0,3667	0,0667 (H_o)		190	0,0667	0,0000 (H_o)	
	200	0,5667	0,5492 (H_e)		200	0,8333	0,2960 (H_e)	
	210	*****			210	0,1000		
<i>Tang77</i>	210	0,3000	0,0000 (H_o)		210	0,2667	0,0000 (H_o)	
	220	0,7000	0,4271 (H_e)		220	0,7333	0,3977 (H_e)	
<i>Tang78</i>	220	0,5000			220	0,1667		
	250	0,4667	0,0667 (H_o)		250	0,5167	0,0333 (H_o)	
	280	0,0333	0,5401 (H_e)		280	0,3000	0,6254 (H_e)	
	310	*****			310	0,0167		

No loco *Tang77*, o alelo de 220pb é o mais frequente nas duas populações, aparecendo com 70% na população 1 e com 73,33% na população 2.

No loco *Tang78*, o alelo mais frequente é o de 250pb, variando de 46,67%, na população 1, a 51,67%, na população 2. Por outro lado, o alelo de 310pb deste

loco aparece exclusivamente na população 2, com frequência igual a 1,67% na forma heterozigota do ninho de Cianorte.

Os valores de heterozigosidade observada e esperada presentes nestas populações são menores do que os observados por Brito et al. (2009).

Em ambas as populações, a heterozigosidade observada é menor do que a esperada, havendo excesso de homozigotos, o que ocasionou desvio das proporções de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$). Esses resultados foram confirmados com os valores de F_{IS} (índice de fixação) positivos e próximos de 1 (Quadro 4), que demonstram haver excesso de homozigotos nas duas populações analisadas.

Quadro 4 – Índices de fixação dentro (F_{IS}) e entre as populações (F_{ST}) e total (F_{IT}) para todos os alelos polimórficos e indivíduos analisados

Loco	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
<i>Tang11</i>	0,8294	0,8828	0,3129
<i>Tang12</i>	0,9198	0,9274	0,0955
<i>Tang77</i>	1,0000	1,0000	0,0014
<i>Tang78</i>	0,9127	0,9193	0,0747
Média	0,9210	0,9302	0,1173

Por meio do valor de F_{ST} , podemos observar que as populações estão moderadamente diferenciadas, pois o valor estimado foi de 0,1173 e, de acordo com Wright (1969), valores de F_{ST} entre 0,05 e 0,15 indicam diferenciação moderada. Esse grau moderado de diferenciação de populações que estão próximas pode ser consequência de dois processos: a fecundação por um único macho e a filopatria da fêmea.

Na maioria dos meliponíneos, as rainhas são fecundadas por apenas um macho, condição denominada de monoandria (Peters et al., 1999). Este comportamento gera menor variabilidade genética dentro de uma colônia, quando comparado ao comportamento poliândrico presente em *A. mellifera*, por exemplo. A baixa variabilidade genética é prejudicial às populações por estar relacionada à baixa capacidade adaptativa e ao aumento da sua probabilidade de extinção.

Entretanto, existe outra consequência negativa, cujos efeitos são praticamente imediatos. Em abelhas, foi descoberto que a baixa variabilidade genética diminui a imunocompetência em *Bombus muscorum* (Whitehorn et al., 2011) e aumenta a ocorrência de infecções em *Apis* sp. e *Bombus* sp. (Baer e Schmid-Hempel, 2001; Tarpy, 2003; Cameron et al., 2011; Whitehorn et al., 2011). Portanto, esse é mais um processo pelo qual populações com baixa diversidade genética podem diminuir seu tamanho populacional e até se extinguir.

Assim, é possível que o número de genótipos relacionados faça com que a presente análise resulte em desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. O pequeno número de ninhos e locos analisados pode ser outro fator que tenha contribuído para que a variabilidade detectada tenha sido pequena, devido ao baixo polimorfismo alélico observado.

Quanto à dispersão restrita das fêmeas, esta se deve a seus hábitos de nidificação, pois, quando um novo ninho está para se formar, uma rainha virgem é acompanhada por um grupo de operárias do ninho antigo. Este novo ninho fica dependente do ninho antigo até que este se torne independente, podendo levar alguns dias ou até meses dependendo da espécie (Nogueira-Neto, 1997). Dessa forma, a distância do novo ninho é restringida à mesma de forrageio das operárias. Sabe-se que em *T. angustula* a distância do forrageio cobre um raio de cerca de 500m (Nogueira-Neto, 1997).

Desde que a filopatria da fêmea foi detectada nestas abelhas, a ausência de estrutura genética pode ser explicada pela dispersão dos machos. Os poucos estudos genéticos de congregações de machos de Meliponini demonstraram a presença de machos de áreas distantes, com mais de 100 colônias presentes (Paxton, 2000; Cameron et al., 2004; Kraus et al., 2008; Mueller et al., 2012). Esses fatores em conjunto (monoandria, distância de nidificação e dependência do ninho antigo) resultam em elevado grau de parentesco entre os ninhos, não havendo grandes diferenciações genéticas entre as populações.

Dessa forma, a divisão desses grupos pode não estar relacionada à distância ou barreiras geográficas. Por exemplo, o ninho de Cianorte do grupo cinza escuro e o ninho de Terra Boa do grupo preto estão separados por apenas 15,34 km. Dessa forma, acredita-se que essa divisão dos grupos seja causada por diferenças comportamentais de migração ou fluxo gênico dos machos.

4.2.2. Diversidade gênica

O número de alelos efetivos (N_e) variou de 1,10 (*Tang11*) a 2,59 (*Tang78*). Ao analisar abelhas *T. angustula* de meliponários, Santiago (2013) encontrou valores de N_e variando entre 2 e 5, considerando-os alto ao comparar com os valores encontrados por Tavares et al. (2007) para *Melipona rufiventris*, entre 1 e 2, similares ao presente estudo. Dessa forma, podemos afirmar que o número de alelos efetivos nessas duas populações estudadas é baixo.

Como observado no Quadro 5, a população 2 está mais diversificada, constatado pelo maior valor do Índice de Shannon.

As duas populações de *Tetragonisca* analisadas possuem baixa identidade genética (0,8119) e distância genética igual a 0,2084, o que pode ser decorrente da distância geográfica, fato corroborado com os resultados de análise de AMOVA (Quadro 6).

Quadro 5 – Número de alelos observados (N_a), Número efetivo de alelos (N_e) e Índice de Shannon (I) de cada loco nas duas populações em estudo

Loco	População 1			População 2		
	N_a	N_e	I	N_a	N_e	I
<i>Tang11</i>	2,0000	1,1050	0,1985	2,0000	1,9651	0,6842
<i>Tang12</i>	3,0000	2,1739	0,8703	3,0000	1,4107	0,5627
<i>Tang77</i>	2,0000	1,7241	0,6109	2,0000	1,6423	0,5799
<i>Tang78</i>	3,0000	2,1327	0,8156	4,0000	2,5974	1,0692
Média	2,5000	1,7839	0,6238	2,7500	1,9039	0,7240
Desvio-padrão	0,5774	0,4961	0,3047	0,9574	0,5152	0,2363

4.2.3. AMOVA

O Quadro 6 apresenta os resultados da Análise Molecular de Variância (AMOVA). Observa-se que a maior parte da variabilidade genética é derivada de seu componente intrapopulacional (76%), o que pode sugerir fluxo gênico entre os

grupos amostrais próximos. Apenas 18% da variância estimada decorre de seu componente interpopulacional.

Quadro 6 – Análise molecular de variância (AMOVA), considerando as duas populações estudadas com o auxílio de marcadores microsatélites. Graus de liberdade (g.l.), porcentagem de variância molecular (%) e Probabilidade mínima de significância (PMS); * Significativo a 5% de probabilidade

Varição	g.l.	Soma de quadrados	Quadrado médio	Desvio padrão	%
Entre populações	1	13,450	13,450	0,196	18%
Entre indivíduos	58	97,233	1,676	0,805	76%
Dentro dos indivíduos	60	4,000	0,067	0,067	6%
Total	119	114,683		1,068	100%

Santos (2014) utilizou a técnica PCR-RFLP em populações do Rondônia, Paraná e São Paulo e obteve valores de variância molecular que indicam alta diferenciação genética entre as populações, com variação interpopulacional igual a 83% e intrapopulacional igual a 17%. Porém, este marcador foi eficiente em identificar a matrilinearidade dos ninhos analisados e constatar a ocorrência de hibridação entre *T. angustula* e *T. fiebrigi*, sugerindo incompleta separação específica.

Resultados obtidos por Bronzato (2011) com abelhas *T. angustula* e *T. fiebrigi* indicaram que não é possível separar esse dois grupos em espécies de jataí, apenas em populações, permitindo sugerir a ocorrência de hibridação entre esses grupos. Francisco et al. (2014) verificaram monofilia recíproca no mtDNA de *T. angustula* e *T. fiebrigi*, mas com evidências de hibridação com os dados de microsatélites, sugerindo que o tempo de divergência entre elas é insuficiente para impedir o fluxo gênico, resultados similares ao do presente estudo.

De acordo com a estimativa do melhor K , gerada a partir dos resultados do *softwareStructure*, a maior estruturação encontrada dividiu as populações analisadas em três grupos ($K=3$) (Quadro 7, Figuras 6 e 7). Um grupo é formado por três ninhos de Maringá, um de *T. angustula* e dois de *T. fiebrigi*, e o ninho de abelhas com coloração híbrida do distrito de Malú (área cinza claro). Um segundo grupo é formado por um ninho de *T. fiebrigi* de Maringá e pelos três ninhos de abelhas com

coloração híbrida, dois de Maringá e um de Terra Boa (área preta). O último grupo é formado pelo ninho da cidade de Cianorte e três ninhos de *T. angustula* do município Terra Boa (área cinza escuro).

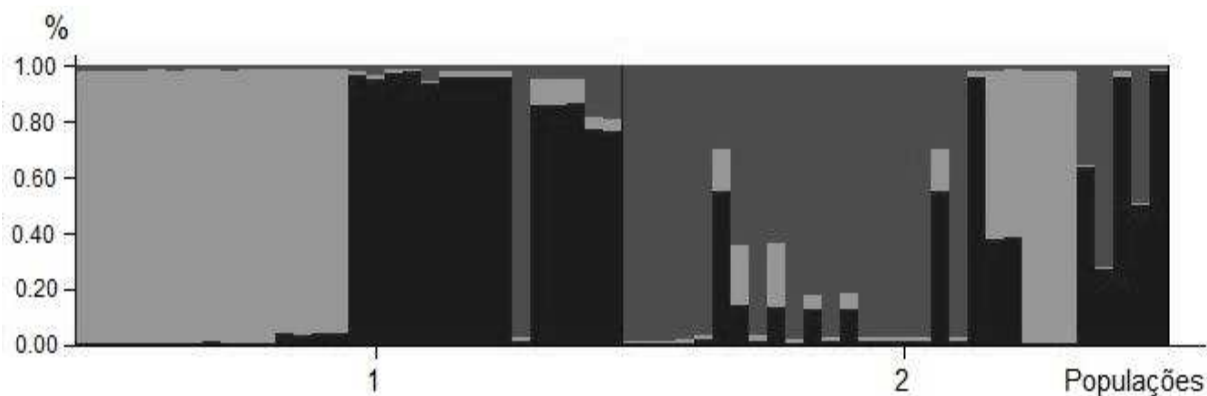


Figura 6 - Gráfico de barras obtido por inferência bayesiana (MCMC) com número de real de populações estimado em $K=3$ pelo *Structure Harvester*. Probabilidade do indivíduo pertencer ao k -ésimo grupo (eixo vertical) e genótipos individuais (eixo horizontal) para cada um dos três grupos (cinza claro, preto e cinza escuro) definidos pelo *Structure*.

Quadro 7 – Separação das populações estudadas em três grupos pelo *softwareStructure*. (n) = quantidade de ninhos

Grupo	Identificação morfológica	Município
Cinza claro	<i>T. angustula</i> (2)	Maringá e Malú
	<i>T. fiebrigi</i> (2)	Maringá (2)
Preto	<i>T. fiebrigi</i> (1)	Maringá
	Híbrido (3)	Maringá (2)
		Terra Boa
Cinza escuro	<i>T. angustula</i> (4)	Cianorte
		Terra Boa (3)

A discordância na identificação por meio dos marcadores moleculares e morfológicos avaliados, provavelmente, esteja relacionada com uma especiação que possa ter ocorrido entre as duas espécies e um contato secundário, antes que tivesse ocorrido uma separação completa entre elas. O contato secundário pode ter ocorrido pela ação antrópica sobre essas abelhas, como o desmatamento e a utilização dessas abelhas por meliponicultores, devido à facilidade de manejo, produção de mel com boa aceitação e altos preços no mercado.

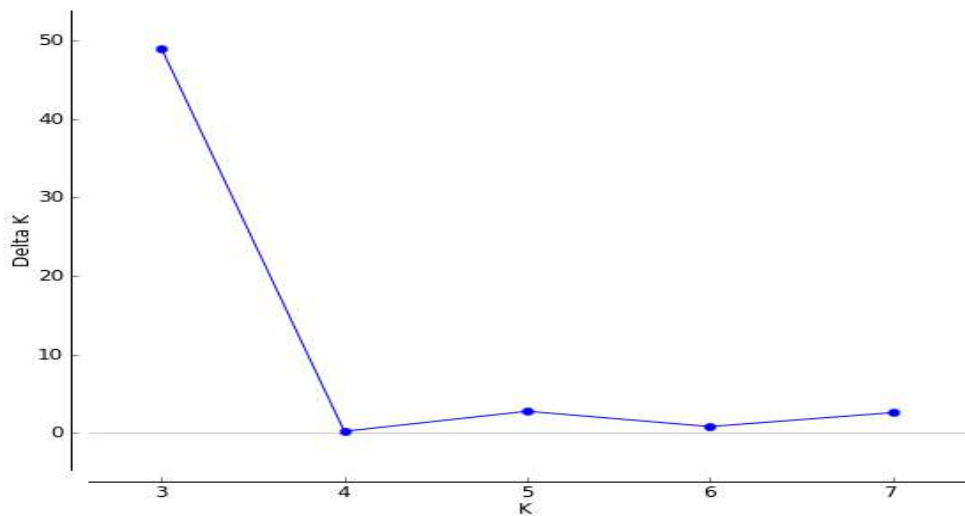


Figura 7 - Estimativa do número real de populações pelo método de Evanno et al. (2005) pelo *Structure Harvester*.

4.3. Redes de interação

A partir dos dados obtidos dos seis trabalhos, foi gerada uma matriz binária de 894 linhas, representando os indivíduos, sendo 555 classificados como *T. angustula*, 319 como *T. fiebrigi* e 20 de coloração híbrida, por 93 colunas, correspondentes aos alelos dos marcadores moleculares utilizados em cada trabalho. Desta forma, foi possível contabilizar 7874 interações para esta rede (Figura 8).

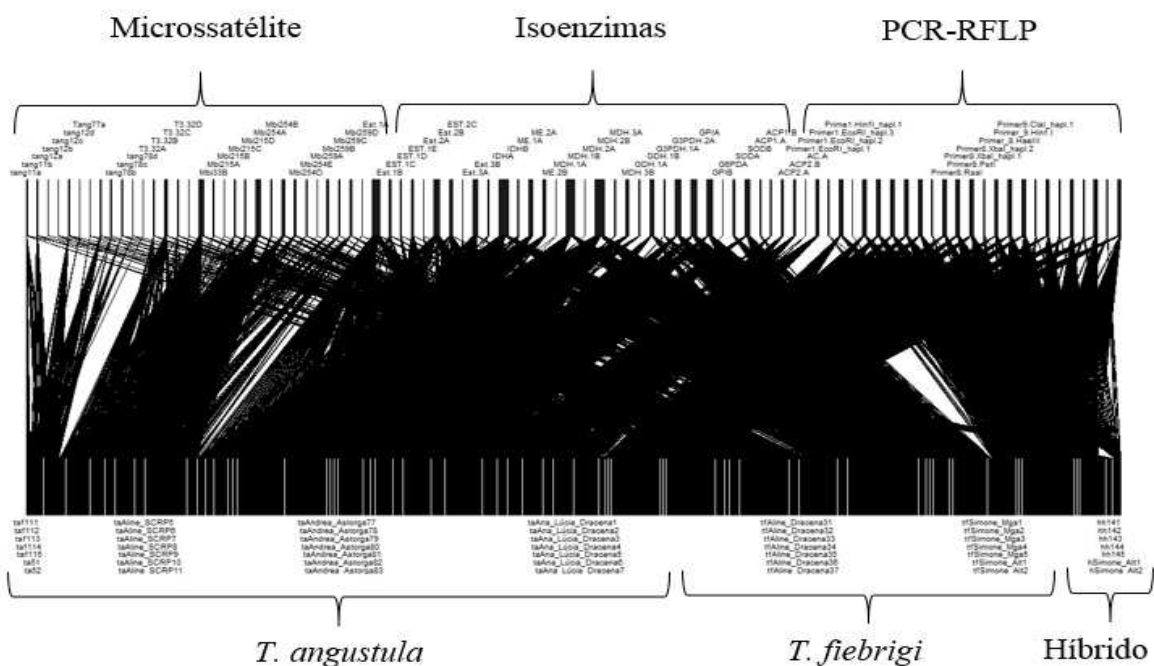


Figura 8 – Rede de interações entre os 894 indivíduos compreendidos nos seis trabalhos com os marcadores moleculares por eles utilizados.

Acredita-se que o maior número de interações exibidas pelos marcadores isoenzimáticos (maior espessura nas barras superiores, correspondentes a esses marcadores), deva-se ao fato de que mais de 54% dos indivíduos incluídos nesta análise são provenientes do estudo com esses marcadores, enquanto 29% provêm da análise com microssatélites e 17% via PCR-RFLP.

Na Figura 9 é possível verificar que os alelos *Tang11 b*, *Tang12 a*, *Tang12 b* e *Tang78 c* apresentam pouca interação com o grupo identificado como híbridos no estudo realizado. Por outro lado, no estudo realizado por Santos (2014), todos os haplótipos do marcador PCR-RFLP utilizados apresentaram interação com os indivíduos analisados e classificados como híbridos.

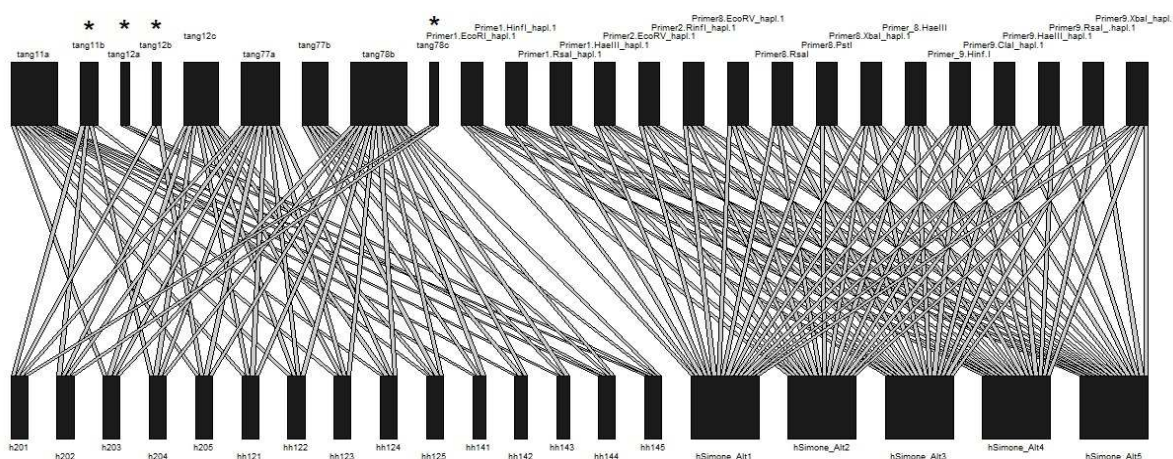


Figura 9 – Rede de interações entre abelhas de coloração híbrida e os marcadores moleculares microssatélites (à esquerda) e PCR-RFLP (à direita). (*) alelos com pouca interação com indivíduos híbridos.

A rede de interações entre as abelhas *T. angustula* e *T. fiebrigii* evidenciou que não é possível separar as duas espécies e nem mesmo as abelhas identificadas como híbridas. Portanto, esses resultados corroboram as conclusões dos estudos realizados por Baitala et al. (2006), Francisco et al. (2014) e Santos (2014), as quais mostraram que essas abelhas ainda não formaram duas espécies. As diferenças podem ser verificadas em sua morfologia e por vários marcadores moleculares já analisados. Além disso, as abelhas *T. fiebrigii* possui uma distribuição geográfica mais restrita (Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil, nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo) que *T. angustula*,

encontradas desde o sul do México até a Argentina e ocorrendo em todo o Brasil, de acordo com Camargo e Pedro (2007).

5. CONCLUSÕES

a) A morfologia da coloração do mesepisterno das abelhas *Tetragonisca* não é um bom marcador para a identificação taxonômica dessas abelhas, pois estas não se encontram geneticamente diferenciadas de acordo com a coloração, o que se acredita ser uma forma de polimorfismo.

b) Nenhum dos marcadores moleculares analisados foi eficiente para caracterizar e separar definitivamente *T. angustula* e *T. fiebrigi* como duas espécies.

c) A variabilidade genética nuclear nas populações analisadas foi baixa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDAR, D.S. **Coleta de ninhos de jataí** (*Tetragonisca angustula*). Paracatu: Fundação Acangau, 1999. 32p.
- ALBERT, R.; BARABASI, A.L. Statistical mechanics of complex networks. **Reviews of Modern Physics**, 74:47-97, 2002.
- ALVES, D.J. **Uso do marcador molecular RAPD para estudo de polimorfismos em populações de *Tetragonisca angustula* L.** (Apidae: Meliponinae). Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2006. 35p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).
- AMARAL, L.A.N.; OTTINO, J.M. Complex networks - augmenting the framework for the study of complex systems. **European Physical Journal**, B 38:147-162, 2004.
- BAER, B.; SCHMID-HEMPEL, P. Unexpected consequences of polyandry for parasitism and fitness in the bumblebee, *Bombus terrestris*. **Evolution**, 55:1639-1643, 2001.
- BAITALA, T.V.; MANGOLIN, C.A.; TOLEDO, V.A.A.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C. RAPD polymorphism in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera; Meliponinae, Trigonini) populations. **Sociobiology**, 48: 861-873, 2006.
- BARTH, A.; FERNANDES, A.; POMPOLO, S.G.; COSTA, M.A. Occurrence of B chromosomes in *Tetragonisca* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): A new contribution to the cytotaxonomy of the genus. **Genetics and Molecular Biology**, 34:77-79, 2011.
- BASCOMPTE, J.; JORDANO, P. The structure of plant-animal mutualistic networks: the architecture of biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, 38:567-593, 2007.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 2009. 532p.
- BREYER, E.U. **Abelhas e saúde**. Santa Catarina: Uniporto, 1983. 80p.

BRITO, R.M.; FRANCISCO, F.O.; DOMINGUES-YAMADA, A.M.T.; GONÇALVES, P.H.P.; PIOKER, F.C.; SOARES, A.E.E.; ARIAS, M.C. Characterization of microsatellite loci of *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Conservation Genet Resour**, 1:183-197, 2009.

BRONZATO, A.R. **Amplificação heteróloga e diversidade genética em *Tetragonisca angustula*(Latreille, 1811) e *Tetragonisca fiebrigi*(Schwarz, 1938)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2011. 56p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

CAMARGO, J.M.F.; PEDRO, S.R.M. Meliponini Lepeletier, 1836. In: MOURE, J.S.; URBAN, D.; MELO, G.A.R. (orgs.). **Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the neotropical region**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia, 2007. p 272-578.

CAMARGO, J.M.F.; PEDRO, S.R.M. Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini review. **Apidologie**, 23:293-314, 1992.

CAMERON, E.C.; FRANCK, P.; OLDROYD, B.P. Genetic structure of nest aggregations and drone congregations of the Southeast Asian stingless bee *Trigona collina*. **Molecular Ecology**, 13:2357-2364, 2004.

CAMERON, S.A.; LOZIER, J.D.; STRANGE, J.P.; KOCH, J.B.; CORDES, N.; SOLTER, L.F.; GRISWOLD, T.L. Patterns of widespread decline in North American bumble bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 108:662-667, 2011.

CAMPOS, M.J.O. **Aspectos da sociologia e fenologia de *Pereirapis semiauratus*(Hymenoptera, Halictidae, Augochlorini)**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1980. 189p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas).

CASTANHEIRA, E.B.; CONTEL, E.P.B. Geographic variation in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Mliiponinae). **Journal of Apicultural Research**, 44:101-105, 2005.

DIAS, L.A.S.; KAGEYAMA, P.Y. Variação genética em espécies arbóreas e consequências para o melhoramento florestal. **Agrotropica**, 3:119-127, 1991.

DORMANN, C.F.; GRUBER, B.; FRUEND, J. Introducing the bipartite package: analyzing ecological networks. **R News**, 82:8-11, 2008.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, 14:2611–2620, 2005.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1998. 220p.

FRANCISCO, F.O.; SANTIAGO, L.R.; BRITO, R.M.; OLDROYD, B.P.; ARIAS, M.C. Hybridization and asymmetric introgression between *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi*. **Apidologie**, 45:1-9, 2014.

GRÜTER, C.; MENEZES, C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; RATNIEKS, F.L.W. A morphologically specialized soldier caste improves colony defense in a neotropical eusocial bee. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 109:1182-1186, 2012.

GUIMARÃES JUNIOR, P.R.G. A estrutura e a dinâmica evolutiva de redes mutualísticas. **Ciências & Ambiente**, 39:137-148, 2010.

HAIG, S.M. Molecular contributions to Conservation. **Ecology**, 79:413-425, 1998.

HAYDEN, M.J.; TABONE, T.L.; NGUYEN, T.M.; COVENTRY, S.; KEIPER, F.J.; FOX, R.L.; CHALMERS, K.J.; MATHER, D.E.; EGLINTON, J.K. An informative set of SNP markers for molecular characterisation of Australian barley germplasm. **Crop and Pasture Science**, 61:70-83, 2010.

IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; RAMALHO, M.; KLEINERT-GIOVANNINI, A. Abelhas sociais e flores: Análise polínica como método de estudo. In: PIRANI, J.R.; CORTOPASSI-LAURINO, M. (eds.). **Flores e abelhas em São Paulo**. 2 ed. São Paulo: EDUSP, 1994. p. 17-30.

JACOB, H.J.; LINDPAINTER, K.; LINCOLN, S.E.; KUSUMI, K.; BUNKER, R.K.; MAO, YI-PEI; GANTEN, D.; DZAU, V.J.; LANDER, E.S. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell**, 67:213-224, 1991.

KERR, W.E. Meliponicultura – A importância da meliponicultura para o país. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, 3:42-44, 1997.

KERR, W.E. Native Bees: A neglect issue in the conservation of genetics resources. **Ethics and Equity in Plant Genetic Resources**, 60-61, 1997.

KERR, W.E.; CARVALHO, G.A.; NASCIMENTO, V.A. **Abelha Uruçu: biologia, manejo e conservação**. Belo Horizonte: Acangaú, 1996. 144p.

KEVAN, P.G. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, 74:373-393, 1999.

KOLING, D.F.; MORETTO, G. Mitochondrial discrimination of stingless bees *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini) from Santa Catarina state, Brazil. **Apidologie**, 41:454–462, 2010.

KRAUS, F.B.; WEINHOLD, S.; MORITZ, R.F.A. Genetic structure of drone congregations of the stingless bee *Scaptotrigona mexicana*. **Insectes Sociaux**, 55:22-27, 2008.

KREMEN, C.; WILLIAMS, N.M.; AIZEN, M.A.; GEMMILL-HERREN, B.; LEBUHN, G.; MINCKLEY, R.; PACKER, L.; POTTS, S.G.; ROULSTON, T.; STEFFAN-DEWENTER, I.; VÁZQUEZ, D.P.; WINFREE, R.; ADAMS, L.; CRONE, E.E.; GREENLEAF, S.S.; KEITT, T.H.; KLEIN, A.M.; REGETZ, J.; RICKETTS, T.H. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. **Ecology Letters**, 10:299-314, 2007.

LOPES, M.; FERREIRA, J.B.; SANTOS, G. Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível. **Agriculturas**, 2:7-9, 2005.

MARQUES, D.K.S. **Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. 24p.

MICHENER, C.D. **Bees of the world**. EUA: The Johns Hopkins University Press, 2007. 953p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - Secretaria de Biodiversidade e Florestas. **Bibliografia brasileira de polinização e polinizadores**. Brasília-DF, 2006.

MOURE, J.S. A preliminary supra-specific classification of the Old World Meliponine bees (Hymenoptera, Apoidea). **Studia Entomologica**, 4:181-242, 1961.

MUELLER, M.Y.; MORITZ, R.; KRAUS, F.B. Outbreeding and lack of temporal genetic structure in a drone congregation of the neotropical stingless bee *Scaptotrigona mexicana*. **Ecology and evolution**, 2:1304-1311, 2012.

NOGUEIRA-FERREIRA, F.H.; AUGUSTO, S.C. Amplitude de nicho e similaridade no uso de recursos florais por abelhas eussociais em uma área de Cerrado. **Bioscience Journal**, 23:45-51, 2007.

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

OLIVEIRA, R.C.; NUNES, F.M.F.; CAMPOS, A.P.S.; VASCONCELOS, S.M.; ROUBIK, D.; GOULART, L.R.; KERR, W.E. Genetic divergence in *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, 27:181-186, 2004.

PAXTON, R.J. Genetic structure of colonies and a male aggregation in the stingless bee *Scaptotrigona postica*, as revealed by microsatellite analysis. **Insectes Sociaux**, 47:63-69, 2000.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, 28:2537-2539, 2012.

PEDRO, S.R.M.; CAMARGO, J.M.F. Interactions on floral resources between the Africanized honey bee *Apis mellifera* L. and the native bee community

(Hymenoptera: Apoidea) in natural “cerrado” ecosystem, in southeast Brazil. **Apidologie**, 22:397-415, 1991.

PETERS, J.M.; QUELLER, D.C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; STRASSMANN, J.E. Mate number, kin selection and social conflicts in stingless bees and honeybees. **Proceedings of the Royal Society of London B**, 266:3779-384, 1999.

PINTO, R.J.B. **Introdução ao melhoramento genético de plantas**. Maringá: EDUEM – Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2009. 351p.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155:945-959, 2000.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: **A Language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: the R Foundation for Statistical Computing. 2011. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acesso em: 12, dezembro, 2014.

ROUBIK, D.W. **Ecology and Natural History of Tropical Bees**. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. 514p.

RUIZ, J.B. **Análise genética de populações em *Tetragonisca angustula* na região Noroeste do Paraná por meio de isoenzimas**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2006. 64p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

SANTOS, S.A. **Polimorfismo mitocondrial em *Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca fiebrigi* empregando marcadores PCR-RFLP**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2014. 45p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento).

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, 109:365-371, 2000.

SCHWARZ, H.F. The stingless bees (Meliponidae) of British Guiana and some related forms. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, 74:437-508, 1938.

SILVA, A.C. **Polimorfismos isoenzimáticos em duas populações de *Tetragonisca angustula angustula* da região Noroeste do Paraná**. Maringá: Universidade

Estadual de Maringá, 2002. 43p. Monografia (Especialização em Genética Aplicada ao Ensino).

STRASSMANN, J.E.; SOLÍS, C.R.; PETERS, J.M.; QUELLER, D.C. Strategies for finding and using highly polymorphic DNA microsatellite loci for studies of genetic relatedness and pedigrees. **Molecular Methods in Zoology and Evolution**, 163-178, 1996.

STUCHI, A.L.P.B.; TOLEDO, V.A.A.; LOPES, D.A.; CANTAGALLI, L.B.; RUVOLOTAKASUSUKI, M.C.C. Molecular marker to identify two stingless bee species: *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera, Meliponinae). **Sociobiology**, 59:123-134, 2012.

TARPY, D.R. Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. **Proceedings of the Royal Society of London B**, 270:99-103, 2003.

TAVARES, M.G.; DIAS, L.A.S.; BORGES, A.A.; LOPRES, D.M.; BUSSE, A.H.P.; COSTA, R.G.; SALOMÃO, T.M.F.; CAMPOS, L.A.O. Genetic divergence between populations of the stingless bee urucu amarela (*Melipona rufiventris* group, Hymenoptera, Meliponini): is there a new *Melipona* species in the Brazilian state of Minas Gerais?. **Genetics and Molecular Biology**, 30:667-675, 2007.

VELTHUIS, H.H.W. **Biologia das abelhas sem ferrão**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo e Holanda: Editora da Universidade de Utrecht, 1997. 33p.

WHITEHORN, P.R.; TINSLEY, M.C.; BROWN, M.J.F.; DARVILL. B.; GOULSON, D. Genetic diversity, parasite prevalence and immunity in wild bumblebees. **Proceedings of the Royal Society of London B**, 278:1195-1202, 2011.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations: The theory of gene frequencies**. v. 2. Chicago: University of Chicago, 1969. 520p.

YEH, F.C.; YANG, R.; BOYLE, T. POPGENE 1.32: Population genetic analysis. 1999. *Software livre distribuído pelos autores. Disponível em:*

http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html. Acesso em: 14, novembro, 2014.

YU, K.F.; VAN DEYNZE, A.; PAULUS, K.P. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In: GLICK, B.R. **Methods in plant molecular biology and biotechnology**. USA: CRC Press, 1993. p. 287-301.