

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

POLIMORFISMO MOLECULAR EM POPULAÇÕES DE
Tetragonisca angustula LATREILLE (APIDAE; TRIGONINI)

Autora: Tatiane Vicente Baitala
Orientadora: Profa. Dra. Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki
Co-Orientadora: Profa. Dra. Ana Silvia Lapenta

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de Concentração Produção Animal”.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Março - 2005

INSTANTES

“Se eu pudesse viver novamente a minha vida, na próxima trataria de cometer mais erros. Não tentaria ser tão perfeito, relaxaria mais. Seria mais tolo do que tenho sido, na verdade bem poucas coisas levaria a sério. Seria menos higiênico. Correria mais riscos, viajaria mais, contemplaria mais entardeceres, subiria mais montanhas, nadaria mais rios. Iria a lugares onde nunca fui, tomaria mais sorvete e menos lentilha, teria mais problemas reais e menos problemas imaginários. Eu fui dessas pessoas que viveu sensata e produtivamente cada minuto da sua vida: claro que tive momentos de alegria. Mas, se pudesse voltar a viver, trataria de ter somente momentos bons. Não os perca agora. Eu era desses que nunca ia a parte alguma sem ter um termômetro, uma bolsa de água quente, um guarda-chuva e um pára-quedas: se voltasse a viver viajaria mais leve. Se eu pudesse voltar a viver, começaria a andar descalço no começo da primavera e continuaria assim até o fim de outono. Daria mais voltas na minha rua, contemplaria mais amanheceres e brincaria com mais crianças, se tivesse outra vez uma vida pela frente. Mas já viram, tenho 85 anos e sei que estou morrendo”.

Jorge Luiz Borges

(O argentino Jorge Luiz Borges, falecido na Suíça em 1987, é considerado um dos maiores escritores do século).

À minha mãe e à minha avó,
pelo amor, carinho e compreensão dispensados todos estes anos.

À minha afilhada, Maria Clara, que enche meu coração de alegria.

Com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus Pai, que sempre guia meus passos.

À minha orientadora, Maria Claudia C. Ruvolo Takasusuki, por ser uma profissional tão competente e dedicada nas horas de trabalho e uma pessoa muito especial em todos os momentos.

A todos os meus professores da pós-graduação, em especial, ao Vagner de Alencar Arnaut de Toledo, pelos ensinamentos constantes e pelo material biológico fornecido do meliponário da Fazenda Experimental de Iguatemi - UEM.

À professora, Claudete Aparecida Mangolin, que foi uma pessoa fundamental para realização desta pesquisa, pela dedicação, paciência e orientação técnica.

Ao professor, João Maria Franco de Camargo, pela identificação das abelhas.

Aos professores, Ana Silvia Lapenta, José Ricardo P. Falco, Maria de Fátima P. da Silva Machado, Sandra A. Collet, Erasmo Renesto, pelos ensinamentos e convivência sempre agradável.

Aos colegas, Wainer C. Chiari e Kelly Cristina Nicolin pela coleta das abelhas em Junqueirópolis e Cianorte, respectivamente.

À “família” de alunos do laboratório, pela amizade, convivência, piadas, festinhas... enfim, por todos os momentos que passamos nestes anos, principalmente à Adriana, minha companheira de batalha, presente nos momentos de sufoco e alegria.

A todos os amigos e colegas do curso de pós-graduação, em especial, ao Jayme, pela simpatia, ajuda e troca de idéias, e à Fabiana, pela companhia nas disciplinas específicas e trabalhos de campo.

Aos funcionários da PPZ, Denilson dos Santos Vicentin e Waldirene Rossi Baquette, e aos funcionários do Departamento de Biologia Celular e Genética, pela ajuda e trabalho indispensáveis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Ao CNPq, pela bolsa de estudo concedida e apoio financeiro.

Aos meus grandes amigos biólogos: Adriana, Alexandra, Eliane, Paulinho, Silvana, que provam que a distância não separa uma grande amizade.

A todos os meus amigos, que me ouvem falar da minha pesquisa mesmo sem entenderem nada.

À minha grande amiga Cecília, pelo carinho, amizade, companhia e “apoio psicológico”, principalmente nos últimos meses.

Ao Marcelo, pelo grande incentivo a continuar neste caminho e simplesmente por estar ao meu lado.

Especialmente, a toda minha família, principalmente à minha mãe e à Cris, minha “pequena grande família”, pela paciência e apoio irrestrito.

E enfim, a todos que contribuíram de qualquer maneira na realização desta etapa na minha vida.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Tatiane Vicente Baitala, filha de João Miguel Baitala e Yvone Vicente Baitala, nasceu em Campo Mourão, Estado do Paraná, no dia 27 de setembro de 1977.

Formou-se em Ciências Biológicas, pela Universidade Estadual de Maringá, em 2000.

Em 2003, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Apicultura.

No dia 04 de março de 2005, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. As Abelhas sem Ferrão.....	3
2.1.1. A espécie <i>Tetragonisca angustula</i>	4
2.1.2. Estrutura de população e conservação dos meliponíneos.....	6
2.2. Marcadores Moleculares.....	9
2.2.1. A técnica RAPD.....	10
2.2.2. Estudos com marcadores bioquímicos e moleculares em abelhas.....	12
III. REFERÊNCIAS.....	15
IV. ARTIGO -	22
Resumo.....	22
Abstract.....	22
Introdução.....	23
Material e Métodos.....	24
Resultados e Discussão.....	27
Conclusão.....	36
Agradecimentos.....	36
Referências	36

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Identificação das populações de <i>Tetragonisca angustula</i> L., local de coleta das amostras e identificações de subespécies baseadas nas características morfológicas.....	28
TABELA 2. <i>Primers</i> , seqüências de nucleotídeos, tamanho e número, total e polimórficos, dos fragmentos amplificados pela reação PCR-RAPD em populações de <i>Tetragonisca angustula</i> L.....	29
TABELA 3. Número total e proporção de fragmentos polimórficos encontrados nas cinco populações de <i>Tetragonisca angustula</i> L. obtidos por PCR-RAPD.....	29
TABELA 4. Índice de Shannon (I) calculado pelo programa Popgene 1.31 para as populações de <i>Tetragonisca angustula</i> coletadas em Maringá, Cianorte e Junqueirópolis.....	30
TABELA 5. Valores do fluxo gênico (Nm) e G_{ST} obtidos pelo programa Popgene 1.31 para as cinco populações de <i>Tetragonisca angustula</i> L.....	31
TABELA 6. Valores da Identidade Genética e Distância Genética de Nei (1978) obtidos pelo programa Popgene 1.31 para as cinco populações de <i>Tetragonisca angustula</i> L.....	31

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Vista lateral de tórax de <i>Tetragonisca angustula</i> (jataí). A: Mesepisterno preto de <i>T. a. angustula</i> Latreille. B: Mesepisterno amarelo de <i>T. a. fiebrigi</i> Schwarz. (Fotos de Eliana B. Castanheira).....	4
ARTIGO	
FIGURA 1. Mapa dos estados do Paraná e São Paulo, identificando os locais de coleta das populações de <i>Tetragonisca angustula</i> Latreille.....	25
FIGURA 2. Dendrograma baseado no complemento aritmético da distância genética de Nei (1978), obtido por marcadores RAPD. Os indivíduos das populações de <i>Tetragonisca angustula</i> coletadas em Maringá (pop 1 e pop 2), Junqueirópolis (pop 3) e Cianorte (pop 4 e pop 5) foram agrupados pelo método UPGMA, utilizando o programa Popgene 1.31.....	32
FIGURA 3. Dendrograma baseado no complemento aritmético do coeficiente de Jaccard, obtido por marcadores RAPD. Os indivíduos 1-10; 16-20 pertencem a subespécie <i>T. a. fiebrigi</i> e foram coletados na cidade de Maringá (M); 11-15 <i>T. a. angustula</i> de Maringá (M); 21-45 <i>T. a. angustula</i> de Junqueirópolis (J) ; 46-50; 66-70 <i>T. a. angustula</i> de Cianorte (C) e 51-65 <i>T. a. fiebrigi</i> de Cianorte (C). Os indivíduos analisados foram agrupados pelo método UPGMA, utilizando o programa NTSYS.....	33
FIGURA 4. Perfis eletroforéticos de RAPD das populações de <i>Tetragonisca angustula</i> , coletadas em Maringá (1 a 4), Junqueirópolis (5 a 8) e Cianorte (9 a 12). (A) e (B) Fragmentos amplificados com o <i>primer</i> OPP-07 e OPP-11 respectivamente. M = Marcador de peso molecular de DNA (DNA Ladder-Invitrogen). As setas indicam os marcadores encontrados para os grupos.....	35

RESUMO

A *Tetragonisca angustula* é uma das abelhas sem ferrão mais comum da região neotropical sendo um importante agente polinizador. Neste trabalho, foram utilizados marcadores RAPD para avaliar a estrutura genética em cinco populações (14 colônias) dessas abelhas. Foram utilizados 12 *primers* que reproduziram 171 fragmentos dos quais 150 foram polimórficos (87,72%). A estimativa da diversidade genética pelo índice de Shannon foi de 0,3929 (\pm 0,2329). O fluxo gênico (Nm) observado foi de 1,4474 e o valor de G_{ST} foi 0,2568. Com os valores de distância genética, foi verificado um isolamento entre as populações do Noroeste do Paraná (Maringá e Cianorte) da população de Junqueirópolis (SP). Foram identificados seis marcadores que diferenciaram as populações de *T. angustula* do Estado de São Paulo e Paraná, no entanto, esses marcadores não conseguiram separar as *T. a. angustula* e *T. a. fiebrigi*.

ABSTRACT

Molecular Polymorphism in Populations of the *Tetragonisca angustula* Latreille (Apidae; Trigonini). *Tetragonisca angustula* is one of the commonest neo-tropical stingless bees and an important pollinator agent. For this project, RAPD markers were used in order to estimate the genetic structure of five populations (14 colonies) of the *Tetragonisca angustula* bees. Twelve *primers* that reproduced 171 fragments, of which 150 were polymorphic (87.72%), were used. The estimate of gene diversity with the Shannon's index was of 0.3929 (\pm 0.2329). The gene flow (Nm) was of 1.4474 and the G_{ST} value was of 0.2568. Isolation was verified along with the values of the genetic distance among the populations from the Northwest of Paraná state (Maringá and Cianorte) and from the São Paulo state (Junqueirópolis). Six markers that differentiated the populations of the *T. angustula* from the São Paulo state and Paraná state, were identified; however those markers were not able to separate the subspecies *T. a. angustula* and *T. a. fiebrigi*.

I - INTRODUÇÃO

A abelha *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) (Hymenoptera; Meliponinae, Trigonini), popularmente conhecida no Brasil como jataí, é uma das abelhas sem ferrão mais comum da região neotropical, distribuindo-se desde a Argentina até o México e em todo o território brasileiro.

São conhecidas duas subespécies de *T. angustula* que podem ser separadas morfológicamente pela coloração do mesepisterno: *T. angustula angustula* (Latreille, 1811), com o mesepisterno preto e *T. angustula fiebrigi* (Schwarz, 1938), com o mesepisterno amarelo (Castanheira, 1995).

A jataí possui destacada importância ecológica, por exercer função na polinização de inúmeras espécies vegetais e também no setor econômico, no qual há grande procura pelo seu mel e outros produtos.

A facilidade que a *T. angustula* tem para ocupar lugares variados para nidificação, adaptando-se às grandes cidades, influencia positivamente o sucesso evolutivo da espécie (Castanheira, 1995).

No entanto, os meliponíneos estão sendo extintos devido às modificações nos ecossistemas tropicais. A fragmentação de áreas de floresta pelo avanço da agricultura e de outras atividades antrópicas leva ao isolamento de subpopulações e, conseqüentemente, à deriva genética e à endogamia (Nogueira-Neto, 2002), fatores que podem ser fatais para essas espécies.

Existem algumas posições discordantes sobre qual seria o tamanho sustentável das populações dessas abelhas, portanto, o conhecimento do grau de variabilidade genética e frequências alélicas em determinadas espécies e populações de abelhas indígenas torna-se essencial para o controle e preservação desses indivíduos,

especialmente, nas áreas fragmentadas das florestas e nos meliponários com poucas colônias.

Importantes pesquisas, envolvendo marcadores bioquímicos e moleculares, foram realizadas em *T. angustula* com o interesse de analisar a estrutura genética de populações dessa espécie. Foram realizados estudos utilizando sistemas protéicos como enzima málica, esterases, fosfoglicomutase, glicerol-3-fosfato desidrogenase, isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase, hexoquinase, peptidases, superóxido desmutase e proteínas totais (Falcão e Contel, 1990, 1991; Machado e Contel, 1991; Cursino, 1993; Castanheira, 1995; Silva *et al.*, 2001a,b).

Oliveira *et al.* (2004), utilizando marcadores RAPD, determinaram a distância genética entre populações de *T. angustula* de 25 localidades em três países da América Latina (Brasil, Argentina e Panamá). Baseados na distância genética, calculada pela porcentagem de dissimilaridade (14%), os autores dividiram a população de *T. angustula* em dois grupos: grupo 1 (oriental), formado com a subespécie *T. a. angustula* e grupo 2 (ocidental), formado com a *T. a. fiebrigi*. Dois *primers* utilizados nesta análise geraram cinco fragmentos que foram utilizados como marcadores moleculares específicos que permitiram diferenciar estas subespécies.

Várias pesquisas aplicando marcadores RAPD vêm sendo realizadas em abelhas. Suazo *et al.*, (1998) detectaram marcadores RAPD específicos que diferenciaram abelhas africanas e européias (*Apis mellifera* L.). Waldschmidt *et al.* (2000) também identificaram um marcador RAPD que diferenciou subespécies de *Melipona quadrifasciata*. Vasconcelos (1998) utilizou marcador RAPD para determinar distâncias genéticas entre populações de *Melipona rufiventris* e separar as populações em grupos distintos. Waldschmidt *et al.* (2002), usando estes mesmos marcadores, calcularam a distância genética entre colônias de *Melipona quadrifasciata* de várias regiões geográficas do Brasil.

Este trabalho teve como objetivo utilizar a técnica de PCR-RAPD para quantificar a variabilidade genética em populações de *Tetragonisca angustula* e analisar como esta variabilidade se distribui dentro e entre as populações. Essas análises poderão, no futuro, contribuir para melhor compreensão da estrutura genética de populações dessas abelhas. Essas informações serão importantes para o controle e preservação desses indivíduos e também contribuirão para um manejo adequado dos meliponários, buscando aumentar sua produção.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. As Abelhas sem Ferrão

As abelhas sociais nativas do Brasil, conhecidas popularmente por abelhas indígenas sem ferrão, encontram-se reunidas na superfamília Apoidea. Entre essas abelhas, as pertencentes à subfamília Meliponinae são as mais conhecidas, com mais de 200 espécies distintas (Nogueira-Neto, 1970). No entanto, esse número pode estar sendo subestimado devido ao grande número de espécies crípticas (Michener, 2000).

De acordo com Camargo e Menezes-Pedro (1992), os meliponíneos tiveram origem na parte oeste do continente Gondwana, hipótese que, segundo os autores, é sustentada pelos registros fósseis e pela biogeografia. A distribuição geográfica e o registro fóssil também indicam uma maior antiguidade dos Meliponinae comparados com as subfamílias Apinae, Bombinae e Euglossinae e sugerem uma origem independente ou uma divergência precoce do tronco evolutivo de outros Apidae (Camargo e Menezes-Pedro, 1992).

As abelhas sem ferrão provêm evolutivamente de um grupo de vespas que deixaram de transmitir caracteres genéticos para a formação do ferrão a seus descendentes (Alonso, 1998).

Os meliponíneos ocupam grande parte das regiões de clima tropical e temperado subtropical do planeta (Nogueira-Neto, 1997). Ao sul, sua distribuição chega até 35°S na Austrália e América do Sul; até 28°S na África; e ao norte, o limite de sua distribuição alcança o Trópico de Câncer (Michener, 2000). No Brasil, o limite ao sul está no estado do Rio Grande do Sul, nas proximidades da fronteira com o Uruguai (Nogueira-Neto, 1997). No entanto, a maior abundância e diversidade dessas abelhas ocorrem nos neotrópicos (Camargo e Menezes-Pedro, 1992).

O Brasil é um dos principais locais de ocorrência dos meliponíneos, sendo esses de grande importância para a ecologia de diversos ecossistemas, por exemplo, a polinização de grande parte da Mata Atlântica (Kerr *et al.*, 1996).

Segundo Moure (1961) podemos considerar duas tribos na subfamília Meliponinae: Meliponini e Trigonini. Os Meliponini se caracterizam por não construírem células reais, dessa forma, rainhas, operárias e machos nascem e se desenvolvem até o estágio adulto em células de cria de igual tamanho. Os Trigonini constituem um grupo muito diversificado, com dezenas de gêneros e constroem quase sempre células reais, maiores que as outras, de onde emergem as futuras rainhas (Nogueira-Neto, 1997).

2.1.1. A espécie *Tetragonisca angustula*

A abelha *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811), pertencente à tribo Trigonini, é popularmente conhecida no Brasil como jataí. São conhecidas duas subespécies de *T. angustula* que podem ser separadas morfologicamente pela coloração do mesepisterno (Figura 1): *T. angustula angustula* (Latreille, 1811) com o mesepisterno preto e *T. angustula fiebrigi* (Schwarz, 1938) com o mesepisterno amarelo (Castanheira, 1995).

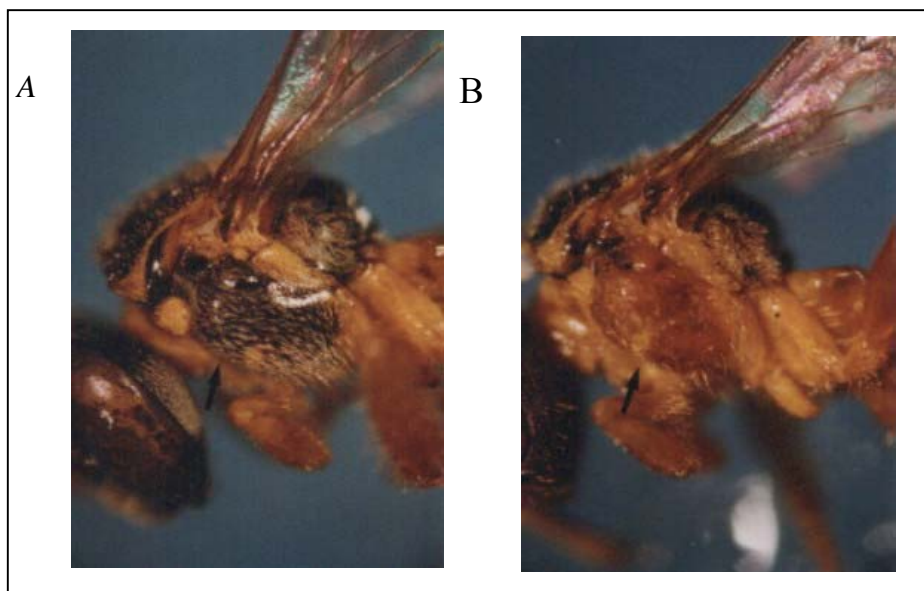


FIGURA 1. Vista lateral de tórax de *Tetragonisca angustula* (jataí). **A:** Mesepisterno preto de *T. a. angustula* Latreille. **B:** Mesepisterno amarelo de *T. a. fiebrigi* Schwarz. (Fotos de Eliana B. Castanheira).

De acordo com Nogueira-Neto (1970) a subespécie *T. a. angustula* é distribuída do México à Argentina, não sendo observada na Cordilheira dos Andes, nas regiões da caatinga do nordeste brasileiro e algumas regiões da Amazônia, enquanto a *T. a. fiebrigi* é restrita a regiões do sudeste brasileiro (Vale do Rio Paraná no estado de São Paulo, parte do estado do Paraná e Santa Catarina), e também na Argentina e Paraguai.

A jataí possui um nicho ecológico muito peculiar e convive bem nas Américas com muitos meliponíneos e com abelhas de outros grupos (Nogueira-Neto, 2001). Esta abelha nidifica em cavidades de troncos vivos ou mortos, em paredes, no chão e em tubulações, sendo uma espécie que se adapta às diferentes condições de nidificação, ocorrendo freqüentemente em áreas antrópicas (Freitas e Soares, 2004).

A facilidade que a *T. angustula* tem para ocupar lugares variados para nidificação, adaptando-se às grandes cidades, influencia positivamente o sucesso evolutivo da espécie, mesmo com os grandes desmatamentos e as queimadas constantes nas florestas naturais do Brasil (Castanheira, 1995).

O enxame da *T. angustula* é constituído por uma rainha, responsável pelo desenvolvimento da colônia, 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 abelhas *Apis mellifera* (Paty, 2003). As operárias de *T. angustula* em um enxame forte chegam ao número de 5.000 (Nogueira-Neto, 1951).

A entrada do ninho da maioria das espécies dos meliponíneos é, geralmente, guardada por abelhas que atacam os inimigos que tentam invadí-la, especialmente abelhas de outras colônias e formigas (Kerr, 1996). Estudos relativos ao seu comportamento de defesa demonstram que são capazes de defender suas colônias fechando a entrada do ninho quando são atacadas por outros insetos e, mesmo possuindo ferrão atrofiado, podem atacar os invasores com as mandíbulas, enrolando-se nos pêlos, envolvendo-os com geoprópolis ou penetrando em orifícios dos inimigos de maior porte (Nogueira-Neto, 1997).

A arquitetura e organização do ninho da *T. angustula* são marcados por características peculiares. A entrada do ninho é caracterizada por um tubo de cerume marron-amarelado com a extremidade com bordas mais estreitas de cera mais clara (Freitas e Soares, 2004). A jataí possui favos horizontais e apresentam um invólucro de cerúmen formado por várias lamelas, que tem função termorreguladora (Campos, 1980). Nestas abelhas, é comum encontrar depósitos de própolis dentro da colônia, que são

utilizados, juntamente com a cera, para fechar buracos e para construir as paredes das células do ninho onde ficam os ovos e os potes de alimento (Kerr, 1996).

A biologia, comportamento, aspectos morfológicos e bioquímicos de *T. angustula* têm sido estudados desde o início do século vinte (Oliveira *et al.*, 2004). Os estudos com a abelha *T. angustula* se tornam importantes por existirem aspectos dessa abelha que interessam não somente à ciência, mas à economia e à sociedade em geral. Segundo Kerr *et al.* (1994) as abelhas sem ferrão são responsáveis, conforme o ecossistema, por 40 a 90% da polinização de plantas nativas.

A jataí possui destacada importância ecológica, por exercer importante papel na polinização de inúmeras espécies vegetais e também no setor econômico, no qual há grande procura pelo seu mel e outros produtos.

Imperatriz-Fonseca *et al.* (1984) coletaram amostras de mel e pólen de colônias de *T. a. angustula* mantidas no campus da USP de São Paulo e concluíram que estas abelhas visitaram 180 espécies vegetais, pertencentes a 45 famílias distintas, para a coleta do alimento. Malagodi-Braga e Kleinert (2002) encontraram diferença significativa na produção de morangos sob efeito da polinização por jataí, apresentando um aumento no número de óvulos fecundados e frutos com maior peso.

Dentre os trigoníneos, a jataí produz o mel de sabor mais apreciado (Freitas e Soares, 2004) e considerado como tendo atribuições terapêuticas nos tratamentos de oftalmias e moléstias dos pulmões (Imperatriz-Fonseca *et al.*, 1984). Em várias partes do Brasil, o mel das abelhas sem ferrão tem maior procura e preço mais alto em relação ao mel de *Apis mellifera*, por exemplo, na região de Minas Gerais, São Paulo e Paraná, há grande procura de mel de jataí e mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) (Kerr *et al.*, 1994; Alonso, 1998). Camargo e Possey (1990) relataram que o mel e outros produtos de *T. angustula* são de grande importância social para os índios Kayapó que aproveitam o mel, pólen e larvas para alimentação e medicina, e o cerume e as resinas para confecção de artefatos.

2.1.2. Estrutura de população e conservação dos meliponíneos

Na maioria dos Hymenoptera, as fêmeas originam-se de ovos fecundados e são diplóides e os machos originam-se de ovos não fecundados e são haplóides. Essa constituição genética haplodiplóide teria a função de reduzir a recombinação e o efeito

de dominância, causando alterações oscilatórias temporárias nas frequências genéticas entre os sexos (Machado, 1982). Segundo alguns autores, populações com sistema haplodiplóide teriam poucos locos polimórficos por causa da seleção contra genes recessivos deletérios expressos nos machos (Hartl, 1971, 1972; Kerr, 1976).

É discutido que diferentes fatores, além da haplodiploidia, podem determinar os baixos níveis de variabilidade protéica observado em Hymenoptera, entre eles, a ocorrência de endogamia e o pequeno tamanho efetivo da população, os quais estão relacionados com a estrutura social dos ninhos e a ocorrência de afunilamentos populacionais (Falcão, 1984). O número mínimo de indivíduos que se reproduziram durante o período de estrangulamento demográfico define a probabilidade de perda de alelos por deriva genética, e os alelos perdidos só podem ser recuperados por mutação ou, a partir de outras populações, por imigração (Robinson, 1998).

A fragmentação de áreas de floresta pelo avanço da agricultura e de outras atividades antrópicas leva ao isolamento de subpopulações de abelhas nativas e, conseqüentemente, à deriva genética e à endogamia (Nogueira-Neto, 2002).

Segundo o princípio da Deriva Genética (Wright, 1931) uma população pequena perde ao acaso genes alelos, tornando-se assim possuidora de poucos alelos diferentes disponíveis. Essa situação faria com que tal população possuía apenas um nível relativamente baixo de variabilidade genética, o que pode ser muito prejudicial se as condições ambientais mudarem (Nogueira-Neto, 2000).

Quando uma população é iniciada por poucos indivíduos, a sua variabilidade dependerá da amostra de alelos trazida por estes fundadores (efeito fundador). O efeito fundador e o efeito de estrangulamento demográfico têm a mesma conseqüência: a redução da variabilidade genética e a formação de desequilíbrio de ligação (Robinson, 1998).

Os meliponíneos responsáveis pela polinização de até 90% das espécies vegetais nos trópicos (Kerr *et al.*, 1994) estão sendo extintos devido às modificações nos ecossistemas tropicais, causadas pelo aumento da população humana, que vêm modificando o ambiente e prejudicando a sobrevivência de outras espécies. Os meliponíneos não conseguem escapar das queimadas porque suas fêmeas não podem sair do ninho devido ao grande desenvolvimento de seu abdome (Kerr *et al.*, 1994).

A destruição indiscriminada de matas naturais e o extrativismo sem reposição das colônias na natureza estão contribuindo para redução da diversidade das abelhas eusociais e, conseqüentemente, afetando sua produção. A conseqüência da redução e

isolamento de seu habitat pode ser fatal para essas espécies, pois exigem a manutenção de populações relativamente grandes, como proteção dos efeitos da endogamia resultante de seu mecanismo de determinação de sexo e castas (Page, 1991).

A determinação do sexo nas abelhas ocorre em duas fases: a primeira fase, poucas horas após a postura, na qual os ovários ou os testículos são determinados, e a segunda fase, ao final da fase de pré-pupa, que determina o fenótipo sexual de todos os discos imaginais (Kerr, 1997). Os alelos *xo* são os primeiros genes determinadores do sexo a entrar em ação. Quando esses alelos ocorrem em hemizigose, determinam o desenvolvimento dos testículos, resultando em machos férteis e, em heterozigose, determinam o desenvolvimento dos ovários nas fêmeas. A ocorrência de alelos *xo* em homozigose determina a formação de machos diplóides (estéreis) (Kerr e Vencovsky, 1982).

Quando há produção de machos diplóides numa colônia de meliponíneo, a rainha é eliminada pelas operárias e a colônia tende a morrer por falta de operárias e de rainha (Kerr, 1997). Esta característica é resultante de cruzamentos consangüíneos e ocorre com freqüência nas pequenas reservas de matas primárias que são conservadas e nos meliponários com poucas colônias (Kerr *et al.*, 1996). Portanto, a manutenção de populações pequenas de abelhas promove a diminuição do número de alelos sexuais *xo* induzindo a produção de machos diplóides (Kerr e Vencovsky, 1982).

Woyke (1980) constatou que, para uma população de *Apis mellifera* manter um número adequado de alelos *xo*, deve conservar um número mínimo de seis alelos sexuais. Para os meliponíneos manterem seis alelos *xo* a população deve possuir pelo menos 44 colônias em sua área de reprodução (Kerr e Vencovsky, 1982). Segundo Yokoyama e Nei (1979) se a população for menor que 44 colônias, será eliminada entre 15 a 30 gerações pela perda gradativa da variabilidade genética – “Efeito Yokoyama e Nei”. Isto se justifica pela grande quantidade de machos diplóides que são produzidos quando há aumento de endogamia (Kerr *et al.*, 1996).

No entanto, existem algumas posições discordantes sobre qual seria o tamanho sustentável das populações de meliponíneos, uma questão muito importante em relação aos fragmentos florestais e a meliponicultura. Nogueira-Neto (2000) obteve experimentos de endocruzamento a partir de apenas duas ou três colônias iniciais. O mesmo ocorreu com *Scaptotrigona postica* onde as colônias fundadoras foram cinco ou seis e a população chegou a mais de 20 colônias. O autor afirma que não seria possível

alcançar os resultados que obteve se fosse realmente necessário ter um número mínimo de 44 colônias para manutenção da população.

Devido a essas opiniões contraditórias sobre o número mínimo de colônias necessárias para a manutenção de populações de meliponíneos, torna-se essencial os estudos da variabilidade genética dessas abelhas, principalmente nos meliponários, para um controle e preservação desses indivíduos, tão importantes na polinização em áreas naturais.

2.2. Marcadores Moleculares

Até a década de 60, os estudos de polimorfismos nas populações eram realizados com marcadores baseados nos fenótipos dos organismos (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Entretanto, o pequeno número de variantes fenotípicas classificava as populações como geneticamente homogêneas (Futuyma, 1992).

A revolução neste quadro teve início com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos. Em um dos primeiros estudos de variação genética, usando a técnica de eletroforese de proteínas, foi observado que cerca de 30% dos locos em cinco populações de *Drosophila pseudoobscura* eram polimórficos (Lewontin e Hubby, 1966). A partir de então a técnica de eletroforese, desenvolvida por Smithies (1955), foi amplamente usada em estudos populacionais para vários tipos de organismos, com a finalidade de quantificar a variação genética em populações de um modo geral (Hunter e Markert, 1957). No entanto, para alguns organismos, essa técnica não é a mais apropriada por detectar pouca variabilidade, como por exemplo, em Hymenoptera (Garnery *et al.*, 1992).

Com o surgimento de técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético de DNA. Inicialmente, com o desenvolvimento da técnica de RFLP (do inglês “Restriction Fragment Length Polymorphism”) por Grodzicker *et al.* (1974), utilizando enzimas de restrição de DNA, surgiu um novo marcador amplamente utilizado em diversos tipos de estudos, inclusive populacionais (Ferreira e Grattapaglia, 1998). A primeira metade da década de 80 assistiu ao desenvolvimento de um método de amplificação de seqüência de DNA que revolucionou a análise genética nestes últimos anos: a reação de polimerase em cadeia (PCR - Polymerase Chain Reaction) (Saiki *et al.*, 1988).

A técnica de PCR baseia-se na capacidade da enzima polimerase replicar seqüências de DNA em certas condições laboratoriais a partir de um par de pequenos fragmentos iniciadores da fita molde (*primers*) que flanqueiam a seqüência que se deseja amplificar. Através de variações alternadas e cíclicas de temperatura, permitem a desnaturação, anelamento e extensão de uma determinada seqüência de DNA que é amplificada, ciclo após ciclo, em progressão geométrica, o que torna possível sua visualização em gel na forma de uma banda, após a sua separação por eletroforese (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Posteriormente, o desenvolvimento da PCR levou à descrição de outras classes de marcadores moleculares (RAPD, microssatélites, AFLP) que podem ser empregados em vários tipos de estudos como de estrutura de população, sistemática, relações evolutivas entre organismos.

O interesse em marcadores se concentra em quantificar a variabilidade genética, descrever como esta se distribui entre e dentro de populações e como pode ser manipulada (Robinson, 1998). A variabilidade contida na amostra a ser analisada dependerá do polimorfismo e da estrutura genética que existiam nessa população (Machado, 1982).

O uso de marcador molecular tem sido bastante empregado nos estudos de variabilidade, sendo capaz de detectar numerosos polimorfismos (Waldschmidt *et al.*, 2002).

2.2.1. A técnica RAPD

No início da década de 90, foi desenvolvida um marcador baseado em PCR, que foi denominado de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990) que descreveu a técnica no contexto da análise mendeliana.

A tecnologia de PCR-RAPD, que utiliza *primers* de seqüência arbitrária, abriu uma nova perspectiva para a análise genômica de indivíduos e populações, eliminando a necessidade do conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que flanqueiam a seqüência de DNA de interesse (Suazo *et al.*, 1998).

Para que ocorra a amplificação de um fragmento de RAPD no genoma analisado, duas seqüências de DNA complementares devem estar adjacentes e em direção oposta para permitir a amplificação exponencial do segmento de DNA pela DNA polimerase.

Cada *primer* arbitrário de 10 pares de bases dirige a síntese de vários segmentos de DNA simultaneamente em diversos pontos do genoma, resultando, assim, em várias bandas no gel (Ferreira e Grattapaglia, 1998). O polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD é de natureza binária, isto é, o segmento amplificado está presente ou ausente (Reginato, 2001).

Esta técnica é capaz de extrair considerável informação relativa à variabilidade da seqüência de nucleotídeos no genoma (Borowsky, 2001). O polimorfismo ocorre devido a diferenças no DNA (trocas, deleções e inserções de nucleotídeos), nos sítios de anelamento do *primer* ou entre eles, que podem prevenir a amplificação do DNA por falta de complementaridade, ou pela distância demasiadamente grande entre os sítios de amplificação nas duas fitas de DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Uma característica fundamental dos marcadores RAPD é o fato deles se comportarem como marcadores genéticos dominantes, nos quais não é possível distinguir um indivíduo heterozigoto para determinado loco de um indivíduo homozigoto (Pérez *et al.*, 1998). Dessa forma, o genótipo homozigoto recessivo (aa) é identificado pela ausência de banda no gel e os genótipos homozigoto dominante (AA) e heterozigoto (Aa) são colocados juntos na mesma classe fenotípica, presença de banda no gel (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Estas qualidades, naturalmente, podem limitar a utilização de RAPD para certos tipos de análise como, por exemplo para análises filogenéticas, determinação de paternidade, mapeamentos comparativos (Pérez *et al.*, 1998).

Marcadores RAPD, em geral, apresentam um bom conteúdo informativo, isto é, amostram o genoma em vários locos ao mesmo tempo, identificam um bom número de locos polimórficos por reação, embora discriminem um baixo número de alelos por loco (dois alelos, amplificado e não-amplificado) (Borowsky, 2001).

O interesse em utilizar marcadores RAPD está na sua rapidez, baixo custo, simplicidade técnica, por ser altamente acessível e por não necessitar de conhecimento prévio do genoma a ser analisado (Harry *et al.*, 1998). Além disso, esta técnica pode ser aplicada quando pequenas quantidades de DNA estão disponíveis (Rabouam *et al.*, 1999) permitindo, dessa maneira, a análise individual de pequenos animais como os insetos. Outra importância a ser considerada é que o RAPD ocorre em seqüências repetitivas do genoma, revelando altos níveis de polimorfismo genético (Harry *et al.*, 1998).

Entretanto, como para qualquer outro marcador genético, o RAPD possui algumas limitações. A reprodutibilidade dos fragmentos de RAPD tem mostrado grande sensibilidade a pequenas modificações nos componentes da reação, como o tipo de polimerase usada, concentração do DNA molde, concentração do cloreto de magnésio e temperaturas da amplificação (Pérez *et al.*, 1998). Para assegurar a reprodutibilidade dos resultados, é necessário que a padronização da reação seja rigorosamente determinada e que seja utilizado um método de separação dos fragmentos de alta resolução.

Os marcadores RAPD são muito usados para estudos populacionais de variabilidade genética e distância genética (Landry *et al.*, 1993; Lou *et al.*, 1998; Suazo *et al.*, 1998; Vasconcelos, 1998; Waldschmidt *et al.*, 2000, 2001; Oliveira *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2004). Estes marcadores também podem ser usados para estudos geográficos de zonas de hibridização, na qual as populações diferem por poucas ou várias características, como resultado do inter cruzamento entre populações distintas, podendo fornecer informações sobre o grau de introgressão gênica (Futuyma, 1992).

2.2.2. Estudos com marcadores bioquímicos e moleculares em abelhas

Várias pesquisas envolvendo isoenzimas foram utilizadas inicialmente como uma ferramenta de caracterização de abelhas africanizadas e européias capaz de estimar o “grau de africanização” nas populações estabelecidas.

A partir dos anos 70 vários estudos foram realizados para determinar o padrão de isoenzimas em abelhas *Apis mellifera*, com o objetivo de quantificar a variabilidade genética presente nestas espécies de forma a determinar os possíveis efeitos do haplodiploidismo nos níveis de variação genética entre as abelhas e também para a identificação de abelhas de origem européia, africanas ou africanizadas por discriminação eletroforética (Badino *et al.*, 1983; Del Lama *et al.*, 1985; Lobo *et al.*, 1989).

Segundo Badino *et al.* (1983) mais de 30 enzimas foram analisadas em *A. mellifera* correspondentes a 46 locos dos quais somente oito mostraram variação genética.

As novas técnicas de biologia molecular ganharam destaque a partir da década de 90, por fornecerem maior número de marcadores do que os que estavam

disponíveis. Com isso, acentuaram-se grandemente os estudos de sistemática, transmissão genética e genética de população em abelhas (Hall, 1991).

Vários estudos envolvendo DNA foram amplamente realizados em *A. mellifera* (Moritz *et al.*, 1986; Hall e Muralidharan 1989; Smith *et al.*, 1989; Arias *et al.*, 1990; Sheppard *et al.*, 1991; Garnery *et al.*, 1992; McMichael e Hall, 1996; Suazo *et al.*, 1998, 2002).

Estes estudos bioquímicos e moleculares realizados em *A. mellifera* abriram um grande campo de pesquisa para a avaliação de abelhas sem ferrão, tornando possível obter informações importantes sobre a estrutura populacional dessas abelhas ainda pouco estudadas.

Vários estudos com marcadores bioquímicos foram realizados em *Tetragonisca angustula*. Estes estudos envolveram sistemas protéicos como enzima málica, esterases, fosfoglicomutase, glicerol-3-fosfato desidrogenase, isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase, hexoquinase, peptidases, proteínas totais e superóxido desmutase (Falcão e Contel, 1990, 1991; Machado e Contel, 1991; Cursino, 1993; Castanheira, 1995). No entanto, foram encontrados marcadores polimórficos para esterase, glicerol 3-fosfato desidrogenase, isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase e hexoquinase.

Castanheira (1995) encontrou marcador genético (*Hk88*) para a subespécie *T. a. fiebrigi*. Neste estudo, foram apresentadas evidências de que estava ocorrendo mistura racial nesta subespécie. A frequência do alelo da hexoquinase *Hk88* indicou que este alelo se originou em populações de *T. a. fiebrigi* e foi introduzido em populações de *T. a. angustula* por mistura racial.

Silva *et al.* (2001a) estimaram uma heterozigosidade média de 0,0971 para isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase e enzima málica em populações de *T. a. angustula* da região noroeste do Paraná. Foi estimada por Silva *et al.* (2001b) a heterozigosidade média de 0,1555 para os três locos de esterases analisados em *T. angustula* de Maringá e Astorga.

O uso de marcador molecular tem sido bastante empregado nos estudos de variabilidade em meliponíneos (Waldschmidt *et al.*, 2002). Vasconcelos (1998) empregou marcadores RAPD para determinar distâncias genéticas entre populações de *Melipona rufiventris* e separar as populações em três grupos distintos. Waldschmidt *et al.* (2002), usando RAPD, calcularam distância genética entre colônias de *Melipona quadrifasciata* de várias regiões geográficas do Brasil, demonstrando a variabilidade genética entre as populações. Utilizando o mesmo marcador, Suzuki *et al.* (2004) e

Paula *et al.* (2004) analisaram a variabilidade e estrutura genética de populações de *Euglossa truncata* e *E. pleosticta*, respectivamente.

Espécies de *Melipona* foram caracterizadas por análises de RFLP, buscando uma melhor compreensão das relações entre esse grupo (Fernandes-Salomão *et al.*, 2002).

No ano de 1998, foi realizado o primeiro trabalho empregando microssatélites em abelhas da tribo Meliponini (Pérez *et al.*, 1998) desenvolvendo *primers* para *Melipona bicolor*. Green *et al.* (2001) também realizaram estudos para a obtenção de marcadores microssatélites para *Trigona carbonaria*, uma abelha sem ferrão da Austrália.

Francisco (2002) caracterizou populações de abelha *Plebeia remota* de diferentes localidades do Brasil utilizando dois marcadores moleculares, o DNA mitocondrial e microssatélites, com o objetivo de detectar aspectos evolutivos como estruturação e fluxo gênico entre elas.

Oliveira *et al.* (2004), utilizando marcadores RAPD, determinaram a distância genética entre populações de *T. angustula* de 25 localidades em três países diferentes da América Latina (Brasil, Argentina e Panamá). Baseados na distância genética, calculada pela porcentagem de dissimilaridade encontrada (14%), os autores dividiram a população de *T. angustula* em dois grupos: grupo 1 (oriental), formado com a subespécie *T. a. angustula* e grupo 2 (ocidental), formado com a *T. a. fiebrigi*. Dois *primers* utilizados nesta análise geraram cinco fragmentos que foram utilizados como marcadores moleculares específicos, permitindo diferenciar estas subespécies.

Com a realização de mais estudos, utilizando marcadores RAPD em *T. angustula*, é esperado que se obtenha mais informações sobre o nível de polimorfismo permitindo, assim, realizar uma estimativa do grau de diversidade genética dessas abelhas. Os resultados obtidos poderão ser utilizados como diagnóstico da variabilidade genética dessa espécie, importante para entender a distribuição e as inter-relações entre as diferentes populações dessas abelhas.

III- REFERÊNCIAS

- ALONSO, W. J. Abelhas sem ferrão: centenas de espécies para polinização, produção de mel, lazer e educação. Artigos técnicos. *Animais de criação – Abelhas*, ano 101, n. 626, 1998. Disponível em: <http://www.snagricultura.org.br/artitec_abelhas.htm>. Acesso em: 09 fev. 2004.
- ARIAS, M. C. *et al.* Improvements to the mitochondrial restriction maps for Italian and Africanized honey bees. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 13, n. 5, p. 501-507, 1990.
- BADINO, G. *et al.* A. Population structure and MDH-1 locus variation in *Apis mellifera ligustica*. *Journal of Heredity*, v. 74, p. 443-446, 1983.
- BOROWSKY, R. L. Estimating nucleotide diversity from Random Amplified Polymorphic DNA and Amplified Fragment Length Polymorphism data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 18, n. 1, p. 143-148, 2001.
- CAMARGO, J. M. F. de; MENEZES-PEDRO, S. R. Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. *Apidologie*, v. 23, p. 509-522, 1992.
- CAMARGO, J. M. F.; POSSEY, D. A. O conhecimento dos Kayapó sobre as abelhas sociais sem ferrão (Meliponinae, Apidae, Hymenoptera): Notas adicionais. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, nova sér., Zool.*, v. 6, n. 1, p. 17-42, 1990.
- CAMPOS, M. J. O. Aspectos da sociologia e fenologia de *Pereirapis semiauratus* (Hymenoptera, Halictidae, Augochlorini). 1980. 189 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1980.
- CASTANHEIRA, E. B. Marcadores genéticos e sua utilização em estudos populacionais em *Tetragonisca angustula* e *Plebeia droryana* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). 1995. 80 f. Tese (Doutorado em Ciências: Genética) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 1995.

CURSINO, J. R. S. Estudo comparativo dos padrões isoenzimáticos e de proteínas não catalíticas em espécies de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae). 1993. 152 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 1993.

DEL LAMA, M. A. *et al.* Est-5 and PGM₁: New polymorphisms in *Apis mellifera*. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 3, n. 1, p. 17-27, 1985.

FALCÃO, T. M. M. A. Polimorfismos protéicos em populações naturais de abelhas brasileiras. 1984, 231 f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 1984.

FALCÃO, T. M. M. A.; CONTEL, E. P. B. Genetic variability in natural populations of Brazilian social bees. I. Eletrophoretic data for PGM and MDH give evidence for multiple fertilization in stingless bees. *Revista Brasileira de Genética*, v. 14, n. 1, p. 47-59, 1991.

FALCÃO, T. M. M. A.; CONTEL, E. P. B. Genetic variability in natural populations of Brazilian social bees. I. Isozyme patterns and polymorphism for esterases and total protein. *Revista Brasileira de Genética*, v. 13, n. 4, p. 731-54, 1990.

FERNANDES-SALOMÃO, T. M. *et al.* Mitochondrial and nuclear DNA characterization in the *Melipona* species (Hymenoptera, Meliponini) by RFLP analysis. *Hereditas*, v. 137, p. 229-233, 2002.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.

FRANCISCO, F. O. Diversidade genética de populações da abelha sem ferrão *Plebeia remota*: Análise do DNA mitocondrial e microssatélites. 2002, 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Biologia/Genética) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

FREITAS, G. S. de; SOARES, A. E. E. *Procurando Irá: um passeio ecológico*. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2004. 35 p.

FUTUYMA, D. J. *Biologia Evolutiva*. 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992.

GARNERY, I. *et al.* Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology*, v. 1, p. 145-154, 1992.

GREEN, C. L. *et al.* Characterization of microsatellite loci for *Trigona carbonaria*, a stingless bee endemic to Australia. *Molecular Ecology Notes*, v. 1, p. 89-92, 2001.

GRODZICKER, T. *et al.* Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, n. 39, p. 439-446, 1974.

- HALL, H. G. Genetics characterization of honey bees through DNA analysis. *In: SPIVACK, M. et al. (Ed.). The "African" Honey Bee*. San Francisco: Wesview Press, 1991. p. 45-73.
- HALL, H. G.; MURALIDHARAN, K. Evidence from mitochondrial DNA that African honey bees spread as continuous maternal lineages. *Nature*, v. 339, n. 5, p. 211-213, 1989.
- HARRY, M. *et al.* Use of polymorphic genetic markers (RAPDs) in evolutionary and applied entomology. *Annales de La Societe Entomologique de France*, v. 34, n. 1, p. 9-32, 1998.
- HARTL, D. L. A fundamental theorem of natural selection for sex linkage or arrhenotoky. *Amer. Nat.*, v. 106, p. 516-524, 1972.
- HARTL, D. L. Some aspects of natural selection in arrhenotokous populations. *Amer. Zool.*, v. 11, p. 305-325, 1971.
- HUNTER, R. L.; MARKERT, C. L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, v. 125, p. 1294-1295, 1957.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. *et al.* Hábitos de coleta de *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Bolm. Zool. Univ. S. Paulo*, v. 8, p. 115-131, 1984.
- KERR, W. E. Biologia e manejo de Meliponinae. 1996. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/bee/abelhsf.htm>>. Acesso em: 20 nov. 2003.
- KERR, W. E. Population genetics studies in bees. II. Sex-linked genes. *Evolution*, v. 30, p. 94-99, 1976.
- KERR, W. E. Sex determination in bees (Apinae, Meliponinae) and its consequences. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 20, n. 4, p. 601-612, 1997.
- KERR, W. E.; VENCOVSKY, R. . Melhoramento Genetico Em Abelhas. Efeito do Numero de Colonias Sobre O Melhoramento. *Revista Brasileira de Genetica*, v. 5, n. 2, p. 279-285, 1982.
- KERR, W. E. *et al.* A Abelha Uruçu: *Biologia, manejo e conservação*. Belo Horizonte: Acangaú, 1996.
- KERR, W. E. *et al.* Há salvação para os Meliponíneos? *In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS DE RIBEIRÃO PRETO*, 1., 1994, Ribeirão Preto. *Anais...* Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, 1994. p. 60-66.

- LANDRY, B. S. *et al.* Random amplified polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species (Hymenoptera: Mymaridae and Trichogrammatidae) used in biological control programs of phytophagous insects. *Genome*, v. 36, p. 580-587, 1993.
- LEWONTIN, R. C.; HUBBY, J. L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, v. 54, p. 595-609, 1966.
- LOBO, J. A. *et al.* Population differentiation and racial admixture in the Africanized honeybee (*Apis mellifera* L.). *Evolution*, v. 43, p. 794-802, 1989.
- LOU, K.F. *et al.* RAPD Variation within and among geographic populations of wheat stem sawfly (*Cephus cinctus* Norton). *Journal of Heredity*, v. 89, n. 4, p. 329-335, 1998.
- MACHADO, M. F. P. S. Isoenzimas da desidrogenase málica em abelhas do gênero Plebéia: controle genético e dados populacionais. 1982, 198 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 1982.
- MACHADO, M. F. P. S.; CONTEL, E. P. B. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase isozyme variation in adult meliponids (Hymenoptera: Apidae). *Biochemical Genetics*, v. 29, p. 593-600, 1991.
- MCMICHAEL, M.; HALL, H. G. DNA RFLPs at a highly polymorphic locus distinguish European and African subspecies of the honey bee *Apis mellifera* L. and suggest geographical origins of New World honey bees. *Molecular Ecology*, v. 5, p. 403-416, 1996.
- MALAGODI-BRAGA, K. S.; KLEINERT, A. M. P. A produção de morangos sob efeito da polinização por jataí (*Tetragonisca angustula*). In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 5., 2002, Ribeirão Preto. *Anais...* Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, 2002. p. 338.
- MICHENER, C. D. *The bees of the world*. Baltimore: The John Hopkins University, 2000.
- MORITZ, R. F. A. *et al.* A mitochondrial DNA polymorphism in honeybees (*Apis mellifera ligustica*). *Experientia*, v. 42, p. 322-324, 1986.
- MOURE, J. S. A preliminary supra-specific classification of the Old World Meliponine bees (Hymenoptera, Apoidea). *Stud. Entomol.*, v. 4, p. 181-242, 1961.
- NOGUEIRA-NETO, P. *A criação de abelhas indígenas sem ferrão*. 2. ed. São Paulo: Chácaras e Quintais, 1970.

NOGUEIRA-NETO, P. Ainda a questão da viabilidade genética e ecológica das pequenas populações e dos fragmentos florestais. *In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS*, 5., 2002, Ribeirão Preto. *Anais...* Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, 2002. p. 15-17.

NOGUEIRA-NETO, P. Stingless bees and their study. *Bee World*, v. 32, p. 73-76, 1951.

NOGUEIRA-NETO, P. Uma conversa sobre fragmentos florestais, pequenas populações e abelhas indígenas. *In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS*, 4., 2000, Ribeirão Preto. *Anais...* Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, 2000. p. 27-34.

NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. 2001. Disponível em: <<http://eco.ib.usp.br/beelab/vida.htm>>. Acesso em: 20 nov. 2003.

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

OLIVEIRA R. C. *et al.* Genetic divergence in *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, v. 27, n. 2, p. 181-186, 2004.

PAGE, J. R. Tropical bees. *Evolution*, v. 45, p. 469-470, 1991.

PATY. Jataí- Características Gerais. Disponível em: <<http://paty.guiliani.vilabol.uol.com.br/jatai.htm>>. Acesso em: 20 nov. 2003.

PAULA, F. M. *et al.* Genetic structure analysis of *Euglossa pleosticta* (Hymenoptera, Apidae) populations from remnants of Atlantic Forest in southern Brazil. *In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON TROPICAL BEES*, 8., and *ENCONTRO SOBRE ABELHAS*, 6., 2004, Ribeirão Preto. *Proceedings...* Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, 2004. p. 438.

PÉREZ, T. *et al.* An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology*, v. 7, p. 1347-1357, 1998.

RABOUAM, C. *et al.* Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. *Molecular Ecology*, v. 8, p. 493-503, 1999.

REGINATO, L. C. A. Introdução à análise de marcadores moleculares. *In: REGINATO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. Biologia molecular aplicada à produção animal*. Brasília, DF: EMBRAPA, 2001.

ROBINSON, I. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. *In: ALFENAS, A. C. (Ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos*. 2. ed. Viçosa: UFV, 1998. p. 329-380.

SAIKI, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of a DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v. 239, p. 487-491, 1988.

SHEPPARD, W. S. *et al.* Gene flow between African and European derived honey bee populations in Argentina. *Nature*, v. 349, n. 2, p. 782-784, 1991.

SILVA, A. C. *et al.* Estimativa da variabilidade genética das esterases de abelhas jataí (*Tetragonisca angustula angustula*) em duas populações da região noroeste do Paraná. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 5., 2001, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre, 2001b. p. 73.

SILVA, A. C. *et al.* Estimativa da variabilidade genética das isozimas isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase e enzima málica de abelhas jataí (*Tetragonisca angustula angustula*) em duas populações da região noroeste do Paraná. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 47., 2001, Águas de Lindóia. *Anais...* Águas de Lindóia, 2001a. 1CDROM.

SMITH, D. R. *et al.* Neotropical Africanized honey bees have African mitochondrial DNA. *Nature*, v. 339, n. 5, p. 213-215, 1989.

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal human adults. *Biochemical Journal*, v. 61, p. 620-641, 1955.

SUAZO, A. *et al.* Differences between African and European honey bees (*Apis mellifera* L.) in Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Heredity*, v. 9, p. 32-36, 1998.

SUAZO, A. *et al.* A locus with Restriction Fragment-Length Polymorphisms characteristic of African and European honey bee (Hymenoptera: Apidae) groups of subspecies. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 95, n. 1, p. 115-124, 2002.

SUZUKI, K. M. *et al.* Variabilidade e estrutura genética de populações de *Euglossa truncata* (Hymenoptera, Apidae) de duas áreas urbanas, Londrina-PR. In: VII Encontro Paranaense de Genética, 2004, Londrina. *Anais...* Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2004. 1CDROM.

VASCONCELOS, S. M. Divergência genética entre populações de *M. rufiventris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). 1998, 49 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1998.

WALDSCHMIDT, A. M. *et al.* A molecular marker distinguishes the subspecies *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, n. 3, p. 609-611, 2000.

WALDSCHMIDT, A. M. *et al.* Genetic analysis of *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) with RAPD markers. *Brazilian Journal of Biology*, v. 62, n. 4B, p. 923-928, 2002.

WILLIAMS, J. G. K. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WOYKE, J. Effect of sex-allele homo-heterezigoty on honeybee colony populations and their honey production. I. Favorable development conditions and unrestricted queens. *Journal of Apicultural Research*, v. 19, n. 1, p. 51-63, 1980.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, v. 16, p. 97-159, 1931.

YOKOYAMA, S.; NEI, M. Population dynamics of sex-determining alleles in honey bees and self-incompatibility alleles in plants. *Genetics*, v. 91, p. 609-926, 1979.

Polimorfismo Molecular em Populações de *Tetragonisca angustula* Latreille (Apidae; Trigonini)

RESUMO. A *Tetragonisca angustula* é uma das abelhas sem ferrão mais comum da região neotropical sendo um importante agente polinizador. Neste trabalho, foram utilizados marcadores RAPD para avaliar a estrutura genética em cinco populações (14 colônias) dessas abelhas. Foram utilizados 12 *primers* que reproduziram 171 fragmentos dos quais 150 foram polimórficos (87,72%). A estimativa da diversidade genética pelo índice de Shannon foi de 0,3929 (\pm 0,2329). O fluxo gênico (Nm) observado foi de 1,4474 e o valor de G_{ST} foi 0,2568. Com os valores de distância genética, foi verificado um isolamento entre as populações do Noroeste do Paraná (Maringá e Cianorte) da população do estado de São Paulo (Junqueirópolis). Foram identificados seis marcadores que diferenciaram as populações de *T. angustula* do Estado de São Paulo e Paraná, no entanto, esses marcadores não conseguiram separar as subespécies *T. a. angustula* e *T. a. fiebrigi*.

Palavras-chave: *Tetragonisca angustula*, diversidade genética, marcador molecular, RAPD, genética de populações.

ABSTRACT. Molecular Polymorphism in Populations of the *Tetragonisca angustula* Latreille (Apidae; Trigonini). *Tetragonisca angustula* is one of the commonest neo-tropical stingless bees and an important pollinator agent. For this project, RAPD markers were used in order to estimate the genetic structure of five populations (14 colonies) of the *Tetragonisca angustula* bees. Twelve *primers* that reproduced 171 fragments, of which 150 were polymorphic (87.72%), were used. The estimate of gene diversity with the Shannon's index was of 0.3929 (\pm 0.2329). The gene flow (Nm) was of 1.4474 and the G_{ST} value was of 0.2568. Isolation was verified along with the values of the genetic distance among the populations from the Northwest of Paraná state (Maringá and Cianorte) and from the São Paulo state (Junqueirópolis). Six markers that differentiated the populations of the *T. angustula* from the São Paulo state and Paraná state, were identified; however those markers were not able to separate the subspecies *T. a. angustula* and *T. a. fiebrigi*.

Key words: *Tetragonisca angustula*, genetic divergence, molecular marker, RAPD, genetic population.

INTRODUÇÃO

A abelha *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) (Hymenoptera; Meliponinae, Trigonini), popularmente conhecida no Brasil como jataí, é uma das abelhas sem ferrão mais comum da região neotropical, distribuindo-se desde a Argentina até o México e em todo o território brasileiro.

São conhecidas duas subespécies de *T. angustula* que podem ser separadas morfológicamente pela coloração do mesepisterno: *T. angustula angustula* (Latreille, 1811), com o mesepisterno preto e *T. angustula fiebrigi* (Schwarz, 1938), com o mesepisterno amarelo (Castanheira, 1995).

A jataí possui destacada importância ecológica, por exercer função na polinização de inúmeras espécies vegetais e também no setor econômico, no qual há grande procura pelo seu mel e outros produtos.

A facilidade que a *T. angustula* tem para ocupar lugares variados para nidificação, adaptando-se às grandes cidades, influencia positivamente o sucesso evolutivo da espécie (Castanheira, 1995).

No entanto, os meliponíneos estão sendo extintos devido às modificações nos ecossistemas tropicais. A fragmentação de áreas de floresta pelo avanço da agricultura e de outras atividades antrópicas leva ao isolamento de subpopulações e, conseqüentemente, à deriva genética e à endogamia (Nogueira-Neto, 2002), fatores que podem ser fatais para essas espécies.

Existem algumas posições discordantes sobre qual seria o tamanho sustentável das populações dessas abelhas, portanto, o conhecimento do grau de variabilidade genética e frequências alélicas em determinadas espécies e populações de abelhas indígenas torna-se essencial para o controle e preservação desses indivíduos, especialmente, nas áreas fragmentadas das florestas e nos meliponários com poucas colônias.

Importantes pesquisas, envolvendo marcadores bioquímicos e moleculares, foram realizadas em *T. angustula* com o interesse de analisar a estrutura genética de populações dessa espécie. Foram realizados estudos utilizando sistemas protéicos como enzima málica, esterases, fosfoglicomutase, glicerol-3-fosfato desidrogenase, isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase, hexoquinase, peptidases, superóxido desmutase e proteínas totais (Falcão e Contel, 1990, 1991; Machado e Contel, 1991; Cursino, 1993; Castanheira, 1995; Silva *et al.*, 2001a,b).

Oliveira *et al.* (2004), utilizando marcadores RAPD, determinaram a distância genética entre populações de *T. angustula* de 25 localidades em três países da América Latina (Brasil, Argentina e Panamá). Baseados na distância genética, calculada pela porcentagem de dissimilaridade (14%), os autores dividiram a população de *T. angustula* em dois grupos: grupo 1 (oriental), formado com a subespécie *T. a. angustula* e grupo 2 (ocidental), formado com a *T. a. fiebrigi*. Dois *primers* utilizados nesta análise geraram cinco fragmentos que foram utilizados como marcadores moleculares específicos que permitiram diferenciar estas subespécies.

Várias pesquisas aplicando marcadores RAPD vêm sendo realizadas em abelhas. Suazo *et al.*, (1998) detectaram marcadores RAPD específicos que diferenciaram abelhas africanas e européias (*Apis mellifera* L.). Waldschmidt *et al.* (2000) também identificaram um marcador RAPD que diferenciou subespécies de *Melipona quadrifasciata*. Vasconcelos (1998) utilizou marcador RAPD para determinar distâncias genéticas entre populações de *Melipona rufiventris* e separar as populações em grupos distintos. Waldschmidt *et al.* (2002), usando estes mesmos marcadores, calcularam a distância genética entre colônias de *Melipona quadrifasciata* de várias regiões geográficas do Brasil.

Este trabalho teve como objetivo utilizar a técnica de PCR-RAPD para quantificar a variabilidade genética em populações de *Tetragonisca angustula* e analisar como esta variabilidade se distribui dentro e entre as populações. Essas análises poderão, no futuro, contribuir para melhor compreensão da estrutura genética de populações dessas abelhas. Essas informações serão importantes para o controle e preservação desses indivíduos e também contribuirão para um manejo adequado dos meliponários, buscando aumentar sua produção.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das abelhas

Foram coletados e analisados indivíduos adultos de *Tetragonisca angustula*, provenientes de três meliponários localizados em Maringá – Fazenda Experimental de Iguatemi, UEM (23° 25' 31" S, 51° 56' 19" O), Cianorte (23° 39' 48" S, 52° 36' 18" O) e Junqueirópolis (21° 30' 53" S, 51° 26' 01" O). Os locais de coleta estão representados na Figura 1.

Nos meliponários de Junqueirópolis e Cianorte, foram realizadas coletas de abelhas em cinco colônias e, em Maringá, foram amostradas quatro colônias, totalizando 14 colônias. De cada caixa foram coletadas, de forma aleatória, abelhas operárias que revoavam na entrada do ninho.

O material coletado foi estocado em frascos fechados a -20°C , evitando-se a estocagem do material por períodos prolongados.

Um indivíduo de cada colônia foi enviado ao Dr. João M. Franco de Camargo (USP - Ribeirão Preto) para identificação morfológica.



FIGURA 1. Mapa dos estados do Paraná e São Paulo identificando os locais de coleta das abelhas *Tetragonisca angustula* Latreille.

Isolamento do DNA

O DNA total foi extraído de cinco indivíduos de cada colônia, totalizando 70 indivíduos. As cabeças foram retiradas para evitar contaminação das extrações com produtos glandulares e com os pigmentos dos olhos; segundo Francisco (2002) tais contaminantes poderiam interferir na PCR.

O método para extração do DNA total, descrito por Bardakci e Skibinski (1994), foi adaptado para ser utilizado em *T. angustula*. O tórax/abdome foi macerado em 500 μL do tampão de lise (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM de EDTA pH 8,0, 100 mM de NaCl e 1 % de SDS) e 5 μL de proteinase K (25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). A purificação do DNA foi realizada com solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A precipitação dos ácidos nucléicos foi feita usando acetato de sódio (3 M) e etanol absoluto gelado na proporção de 0,25:2,5 em relação ao volume do recuperado, permanecendo incubado a -20°C *overnight*. O DNA

precipitado foi separado por centrifugação a 10.300 x g por oito minutos. O DNA foi ressuspendido em tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 Mm, pH 8,0) e tratado com RNase (10 µg/mL).

A integridade e quantificação do DNA foram avaliadas em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X (Tris, Ácido acético, EDTA, pH 8,0). A quantidade de DNA presente em cada amostra foi estimada por meio de comparação com concentrações conhecidas e graduadas de DNA-padrão (phago λ). Os géis foram corados com banho de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e as bandas de DNA visualizadas sob luz ultravioleta e a imagem capturada por sistema da EDAS (Kodak 1 D Image Analysis 3.5).

Amplificação da reação PCR-RAPD, separação e visualização dos produtos

Para avaliar o genoma das populações de *T. angustula*, foram selecionados 12 *primers* da Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA (OPA-03, OPA-07, OPA-11, OPA-13, OPB-10, OPC-06, OPL-11, OPM-03, OPM-07, OPP-02, OPP-07, OPP-11).

As condições de amplificação foram baseadas na metodologia descrita por Williams *et al.* (1990). Para um volume de reação de 20 µL foi utilizado tampão Tris-KCl 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 2,5 mM de MgCl₂, 0,3 µM de *primer*, 0,1 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), uma unidade de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), e 20 ng de DNA molde. As reações foram realizadas em um termociclador “Eppendorf Mastercycler® Gradient”, programado para 45 ciclos, com uma desnaturação inicial a 96°C por cinco minutos e uma extensão final a 72°C por sete minutos. Cada ciclo consistiu de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 35°C e um minuto a 72°C. Um controle negativo de reação (com ausência de DNA molde) foi usado em cada grupo de amplificações para identificar possíveis contaminações.

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1,7% a 60 volts usando tampão TBE 0,5X (Tris-borato, EDTA pH 8,0) e corados com banho de brometo de etídio (0,5 µg/mL). Os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz ultravioleta e a imagem capturada por sistema EDAS (Kodak 1 D Image Analysis 3.5). Um marcador de peso molecular de DNA (DNA Ladder-Invitrogen) foi usado para determinar o tamanho dos fragmentos gerados (100 pb a 12 kb).

Análises dos dados

As análises dos dados moleculares envolveram a interpretação dos fragmentos (bandas) de DNA genômico obtidos. Os indivíduos foram comparados dentro e entre as populações, sendo as comparações feitas pela presença (1) ou ausência (0) de fragmentos de tamanhos moleculares idênticos (localizados no mesmo loco) para cada indivíduo analisado.

A variabilidade genética, dentro e entre as populações, foi determinada pela porcentagem de locos polimórficos. A diversidade genética das populações analisadas foi calculada pelo índice de Shannon (I) (Lewontin, 1972). Também foram calculados os valores de G_{ST} e o fluxo gênico (Nm). Para o cálculo dessas análises foi utilizado o programa Popgene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999).

A matriz de similaridade foi submetida a uma análise de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average) para construção de um dendrograma (Dias, 1998), a fim de representar graficamente a distância genética das populações analisadas. Para esta análise foi utilizado o programa NTSYS 1.7 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) (Rohlf, 1989), baseado no complemento aritmético do coeficiente de Jaccard e o programa Popgene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999), baseado no complemento aritmético da distância genética de Nei (1978).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a identificação das abelhas *T. angustula* L., baseada nas características morfológicas, foi possível dividir a população total em cinco subpopulações (Tabela 1).

O número de fragmentos (ou locos) amplificados com *primers* para RAPD depende de fatores tais como tamanho e composição do genoma e das condições da reação (Williams *et al.*, 1990).

TABELA 1. Identificação das populações de *Tetragonisca angustula* L., local de coleta das amostras e identificações de subespécies baseadas nas características morfológicas.

Identificação da população	Nº da Colméia	Origem das abelhas	Identificação de subespécie
Pop 1	01	Maringá	<i>T. a. fiebrigi</i>
	02	Maringá	<i>T. a. fiebrigi</i>
	22	Maringá	<i>T. a. fiebrigi</i>
Pop 2	03	Maringá	<i>T. a. angustula</i>
Pop 3	01	Junqueirópolis	<i>T. a. angustula</i>
	02	Junqueirópolis	<i>T. a. angustula</i>
	03	Junqueirópolis	<i>T. a. angustula</i>
	04	Junqueirópolis	<i>T. a. angustula</i>
	05	Junqueirópolis	<i>T. a. angustula</i>
Pop 4	03	Cianorte	<i>T. a. fiebrigi</i>
	04	Cianorte	<i>T. a. fiebrigi</i>
	05	Cianorte	<i>T. a. fiebrigi</i>
Pop 5	07	Cianorte	<i>T. a. angustula</i>
	02	Cianorte	<i>T. a. angustula</i>

Todos os *primers* selecionados produziram diferentes padrões de fragmentos RAPD. A Tabela 2 apresenta a seqüência de nucleotídeos dos 12 *primers* selecionados, o número de fragmentos total e polimórficos e o tamanho dos fragmentos amplificados. O número de fragmentos nítidos e reproduzíveis gerados por *primers* em todas as populações analisadas variaram de 8 a 17 fragmentos, uma média de 14,25 fragmentos por *primer*, e o tamanho dos produtos amplificados permaneceu entre 300 e 2900 pb.

Os 12 *primers* usados na reação PCR-RAPD em *T. angustula* produziram 171 fragmentos. Foi observado que, do número total de fragmentos analisados, 150 apresentaram polimorfismo, correspondendo a 87,72%. Os valores do polimorfismo encontrado dentro e entre as populações analisadas estão apresentados na Tabela 3.

A população 3, coletada em Junqueirópolis (SP), apresentou maior proporção de locos polimórficos (74,27%), em relação às demais populações analisadas.

Waldschmidt *et al.* (2002), nos estudos com *Melipona quadrifasciata*, analisaram 251 fragmentos de RAPD reproduzidos por 29 *primers* e encontraram 112 fragmentos polimórficos, correspondendo a 44,62%. Suzuki *et al.* (2004) utilizaram 12 *primers* RAPD, para análise da estrutura genética em duas populações de *Euglossa truncata*, os quais produziram 127 fragmentos que revelaram os seguintes valores de locos polimórficos para as duas populações: 31,5% e 29,1%. Paula *et al.* (2004) nos estudos

com *E. pleosticta* detectaram 165 fragmentos obtidos por 10 *primers* RAPD, sendo 109 polimórficos (66,06%). O resultado obtido revelou um alto grau de polimorfismo em *T. angustula*, superior aos valores encontrados para outras espécies de abelha sem ferrão.

TABELA 2. *Primers*, seqüências de nucleotídeos, tamanho e número, total e polimórficos, dos fragmentos amplificados pela reação PCR-RAPD em populações de *Tetragonisca angustula* L.

<i>Primer</i>	Seqüência de nucleotídeos	Tamanho dos fragmentos (pb)	Nº de fragmentos	Nº fragmentos polimórficos
OPA-03	5'-AGTCAGCCAC-3'	500-2400	16	15
OPA-07	5'-GAAACGGGTG-3'	350-2100	13	12
OPA-11	5'-CAATCGCCGT-3'	300-1750	13	11
OPA-13	5'-CAGCACCCAC-3'	400-2000	16	15
OPB-10	5'-CTGCTGGGAC-3'	400-2500	15	13
OPC-06	5'-GAACGGACTC-3'	400-1900	15	13
OPL-11	5'-ACGATGAGCC-3'	420-1800	13	13
OPM-03	5'-GGGGGATGAG-3'	460-2400	11	08
OPM-07	5'-CCGTGACTCA-3'	320-1200	08	07
OPP-02	5'-TCGGCACGCA-3'	400-2900	17	14
OPP-07	5'-GTCCATGCCA-3'	400-2100	17	15
OPP-11	5'-AACGCGTCGG-3'	450-2000	17	14
Total			171	150

TABELA 3. Número total e proporção de fragmentos polimórficos encontrados nas cinco populações de *Tetragonisca angustula* L. obtidos por PCR-RAPD.

Identificação da população	Indivíduos analisados	Nº locos polimórficos	Locos polimórficos (%)
Pop 1	15	93	54,39
Pop 2	05	42	24,56
Pop 3	25	127	74,27
Pop 4	15	93	54,39
Pop 5	10	88	51,46
Total	70	150	87,72

A estimativa da diversidade genética pelo índice de Shannon foi de 0,3929 (\pm 0,2329) considerando todos os indivíduos analisados. O maior valor encontrado foi para a população 3 (0,3666 \pm 0,2669). Os valores obtidos por este índice de diversidade está apresentado na Tabela 4.

Tanto em número de locos polimórficos, quanto em relação ao índice de Shannon, (I) a população de Junqueirópolis apresentou valores maiores em relação às populações de Maringá e Cianorte.

TABELA 4. Índice de Shannon (I) calculado pelo programa Popgene 1.31 para as populações de *Tetragonisca angustula* coletadas em Maringá, Cianorte e Junqueirópolis.

População	Índice de Shannon (I)	Desvio-padrão
Pop 1	0,2674	± 0,2778
Pop 2	0,1349	± 0,2469
Pop 3	0,3666	± 0,2669
Pop 4	0,2674	± 0,2814
Pop 5	0,2550	± 0,2795
Total	0,3922	± 0,2329

O fluxo gênico (Nm) para todas as populações analisadas foi de 1,4474 e o valor de G_{ST} foi de 0,2568. A Tabela 5 apresenta uma matriz com os valores do Nm e G_{ST} , agrupando as populações duas a duas. O maior valor de Nm (6,3135) foi obtido entre Pop 1 e Pop 4 que correspondem *T. a. fiebrigi* de Maringá e Cianorte, mostrando que essas duas populações estão em contato (Tabela 5). O menor valor de Nm foi 1,0508 obtido entre as Pop 2 e Pop 3 (*T. a. angustula* de Maringá e Junqueirópolis).

De maneira geral, os valores de fluxo gênico (Nm) podem ser considerados baixos quando comparados com outras espécies de animais. Suzuki *et al.* (2004) encontraram um valor de Nm de 8,55 entre duas populações de *Euglossa truncata*. Paula *et al.* (2004), nos estudos com *E. pleosticta*, encontraram valores de Nm que variou entre 4,77 à 7,74.

Esses resultados permitem sugerir que pode estar ocorrendo endocruzamento entre as abelhas jataí analisadas. Essa redução de fluxo gênico pode ser resultado da fragmentação das matas na região noroeste do Paraná. Apesar do pouco tempo (em torno de 50 anos) decorrido desde a derrubada da cobertura natural, e da alta variabilidade genética observada, esses resultados sugerem que, em longo prazo, poderá ocorrer uma redução no grau de polimorfismo desses insetos, decorrendo em alterações importantes na sua estrutura de população. A redução das populações destes insetos poderá reduzir a polinização de plantas em mata natural e em culturas regionais, diminuindo as populações e a produção respectivamente.

TABELA 5. Valores do fluxo gênico (Nm) e G_{ST} obtidos pelo programa Popgene 1.31 para as cinco populações de *Tetragonisca angustula* L.

Pop/ID	1	2	3	4	5
1	0,0000	0,1785	0,2049	0,0734	0,0829
2	2,3011	0,0000	0,3224	0,1768	0,2003
3	1,9401	1,0508	0,0000	0,1813	0,2096
4	6,3135	2,3288	2,2576	0,0000	0,0802
5	5,5258	1,9960	1,8849	5,7317	0,0000

* Os valores de G_{ST} estão representados acima da diagonal e do fluxo gênico (Nm) abaixo da diagonal.

$$Nm = 0.5(1 - G_{ST})/G_{ST}$$

Os valores da distância genética de Nei (1978), entre as cinco populações analisadas, estão apresentados na Tabela 6. A população de Junqueirópolis (Pop 3, *T. a. angustula*) apresentou as maiores distâncias genéticas, indicando o isolamento dessa população em relação às demais populações do Paraná.

TABELA 6. Valores da Identidade Genética e Distância Genética de Nei (1978) obtidos pelo programa Popgene 1.31 para as cinco populações de *Tetragonisca angustula* L.

Pop/ID	1	2	3	4	5
1	0,0000	0,9428	0,8701	0,9732	0,9712
2	0,0589	0,0000	0,8201	0,9434	0,9368
3	0,1391	0,1984	0,0000	0,8892	0,8716
4	0,0272	0,0582	0,1174	0,0000	0,9725
5	0,0292	0,0653	0,1374	0,0279	0,0000

* Os valores da Identidade Genética de Nei estão representados acima da diagonal e da Distância Genética de Nei abaixo da diagonal.

O dendrograma (Figura 2) mostra que a Pop 3 forma um segundo grupo, se separando das outras populações. As populações de *T. a. angustula* coletadas em Cianorte e Maringá apresentaram pequena distância genética, contudo parece não estar ocorrendo hibridização entre elas. Tal fato pode ser observado no dendrograma de distância genética que mostra a formação de uma subpopulação com as *T. a. angustula* da Maringá (Figura 2).

Entre as duas populações de *T. a. fiebrigi* analisadas foram observadas as menores distâncias genéticas, apesar dessas duas populações estarem localizadas em pontos diferentes (Pop 1 - Maringá e Pop 4 - Cianorte). O dendrograma baseado na distância genética de Nei (Figura 2) mostra que essas duas populações podem ser

consideradas como única. Esses achados indicam que, apesar da distância, deve estar ocorrendo hibridização entre elas, como também foi observado pelo valor do fluxo gênico que foi o maior valor entre estas duas populações.

Os resultados obtidos permitem verificar um nítido isolamento entre as populações do noroeste do Paraná (Maringá e Cianorte) da população de Junqueirópolis (SP). Esses resultados permitem sugerir que as populações do Noroeste do Paraná estão se isolando, apresentando menores valores de polimorfismo que em outras localidades.

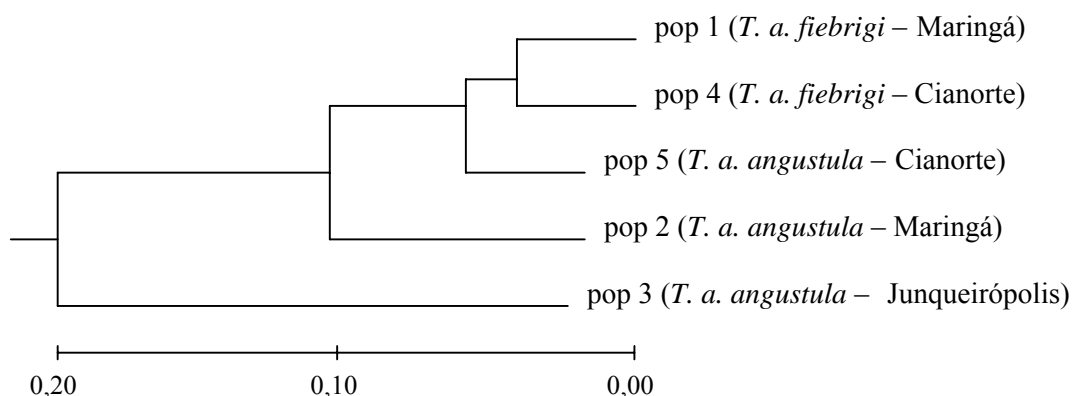


FIGURA 2. Dendrograma baseado no complemento aritmético da distância genética de Nei (1978), obtido por marcadores RAPD. Os indivíduos das populações de *Tetragonisca angustula*, coletadas em Maringá (pop 1 e pop 2), Junqueirópolis (pop 3) e Cianorte (pop 4 e pop 5), foram agrupados pelo método UPGMA, utilizando o programa Popgene 1.31.

O dendrograma baseado no índice de similaridade de Jaccard (Figura 3) separou as abelhas analisadas em dois grupos: as *T. a. angustula*, coletadas em Junqueirópolis e o segundo grupo com as *T. a. angustula* e *T. a. fiebrigi*, coletadas em Maringá e Cianorte. Nessa análise, os *primers* utilizados não diferenciaram as duas subespécies de *T. angustula* do Paraná (Figura 3).

As *T. a. angustula* de Maringá parecem estar mais isoladas e não haver contato com a população de Cianorte, enquanto as *T. a. fiebrigi* de Maringá conseguem hibridizar com a população de Cianorte (Figura 2, Tabela 6). Esses achados permitem sugerir que a fragmentação de matas naturais e o crescimento das cidades estão interferindo na dinâmica destas populações, dificultando o fluxo gênico entre elas. Portanto, apesar de ainda existir alto grau de polimorfismo entre essas populações, será necessário desenvolver métodos de manejo das abelhas e de manutenção dos fragmentos de mata para que essas abelhas possam continuar desempenhando de forma adequada seu papel como polinizadores.

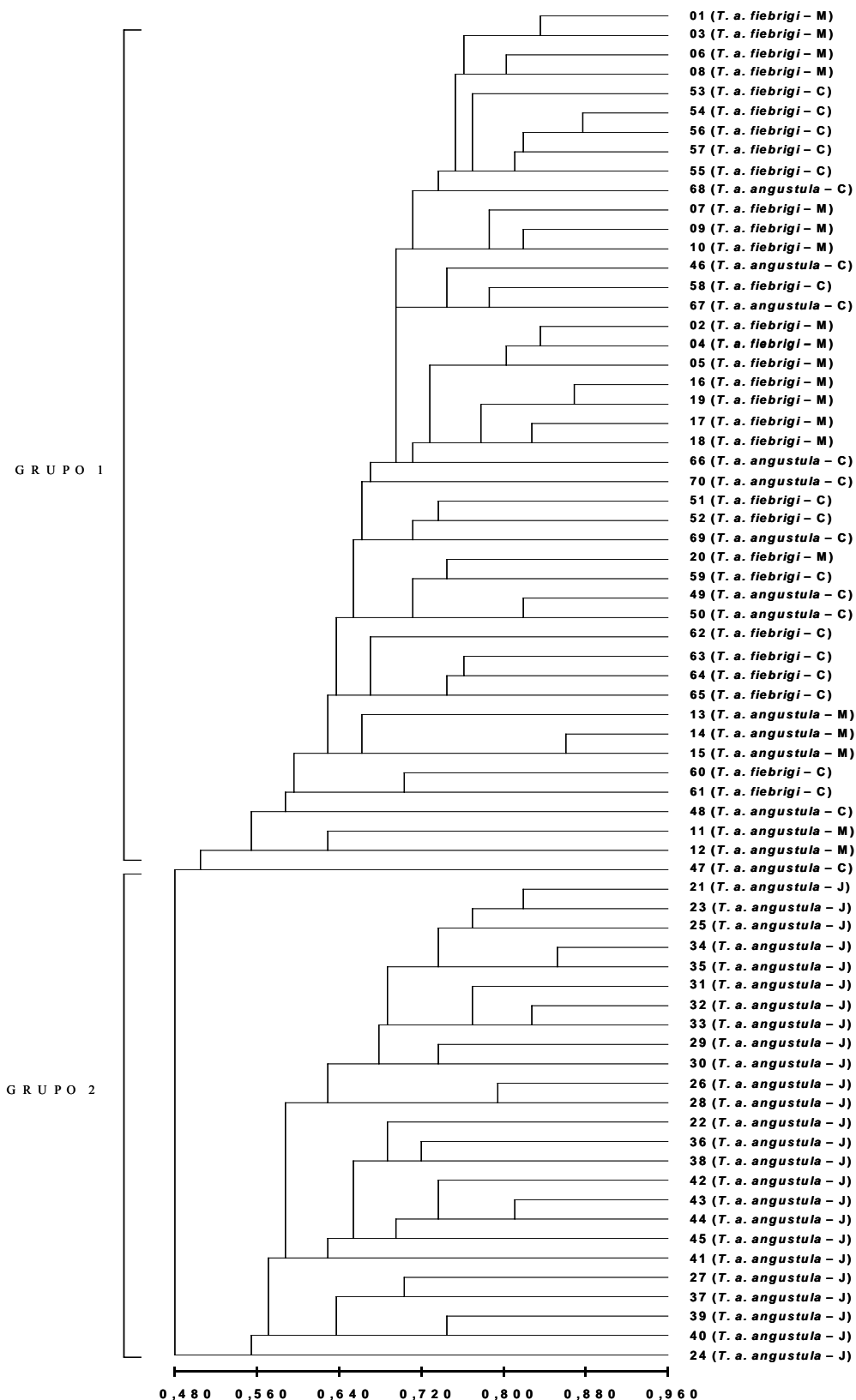


FIGURA 3. Dendrograma baseado no complemento aritmético do coeficiente de Jaccard, obtido por marcadores RAPD. Os indivíduos 1-10; 16-20 pertencem a subsespécie *T. a. fiebrigi* e foram coletados na cidade de Maringá (M); 11-15 *T. a. angustula* de Maringá (M); 21-45 *T. a. angustula* de Junqueirópolis (J); 46-50; 66-70 *T. a. angustula* de Cianorte (C) e 51-65 *T. a. fiebrigi* de Cianorte (C). Os indivíduos analisados foram agrupados pelo método UPGMA, utilizando o programa NTSYS.

Marcadores de população

De acordo com a Tabela 1, que apresenta a identificação das abelhas *Tetragonisca* por meio de marcadores morfológicos, podemos verificar que nas populações de Maringá e Cianorte foram identificados mais ninhos de *T. a. fiebrigi*, contudo por meio de RAPD, não foi possível separar as duas subespécies (Figura 2).

Apesar do *primer* OPL-11 ter sido identificado por Oliveira *et al.* (2004) como marcador molecular entre as duas subespécies de *T. angustula*, neste trabalho não foi possível utilizá-lo com esta finalidade, no entanto, ele serviu como marcador para separar as cinco populações avaliadas em dois grupos: Maringá, Cianorte e Junqueirópolis.

Além do marcador proposto por Oliveira *et al.* (2004), encontramos seis novos marcadores (OPA-07, OPA-11, OPB-10, OPP-02, OPP-07 e OPP-11) que possibilitaram diferenciar as populações de *T. angustula* dos Estados de São Paulo e Paraná.

O *primer* OPA-07 apresentou um fragmento com aproximadamente 2100 pb presente somente na população coletada em Junqueirópolis (*T. a. angustula*). Os *primers* OPA-11, OPP-07 (Figura 4A) e OPP-02 apresentaram regiões informativas com 700 e 1300 pb; 450 e 2100 pb; e 1100 pb respectivamente, para as populações de Junqueirópolis.

O *primer* OPB-10 apresentou um fragmento com aproximadamente 450 pb característico das populações de Maringá e Cianorte. O *primer* OPP-11 apresentou dois fragmentos capazes de identificar as duas populações: o fragmento de aproximadamente 950 pb, característico das populações do Paraná, e outro com 3000 pb característico da população de Junqueirópolis (Figura 4B).

O uso de marcador molecular RAPD foi eficiente para separar populações diferentes, porém não conseguiu diferenciar as duas subespécies de *T. angustula*. A utilização desse marcador será importante, pois contribui para o entendimento do grau de variabilidade genética dentro e entre as populações dessas abelhas. As informações obtidas, utilizando este marcador molecular, poderão contribuir para o melhor conhecimento da estrutura de populações das abelhas jataí e, futuramente, serem utilizados como ferramenta para a sua manutenção e/ou manejo.

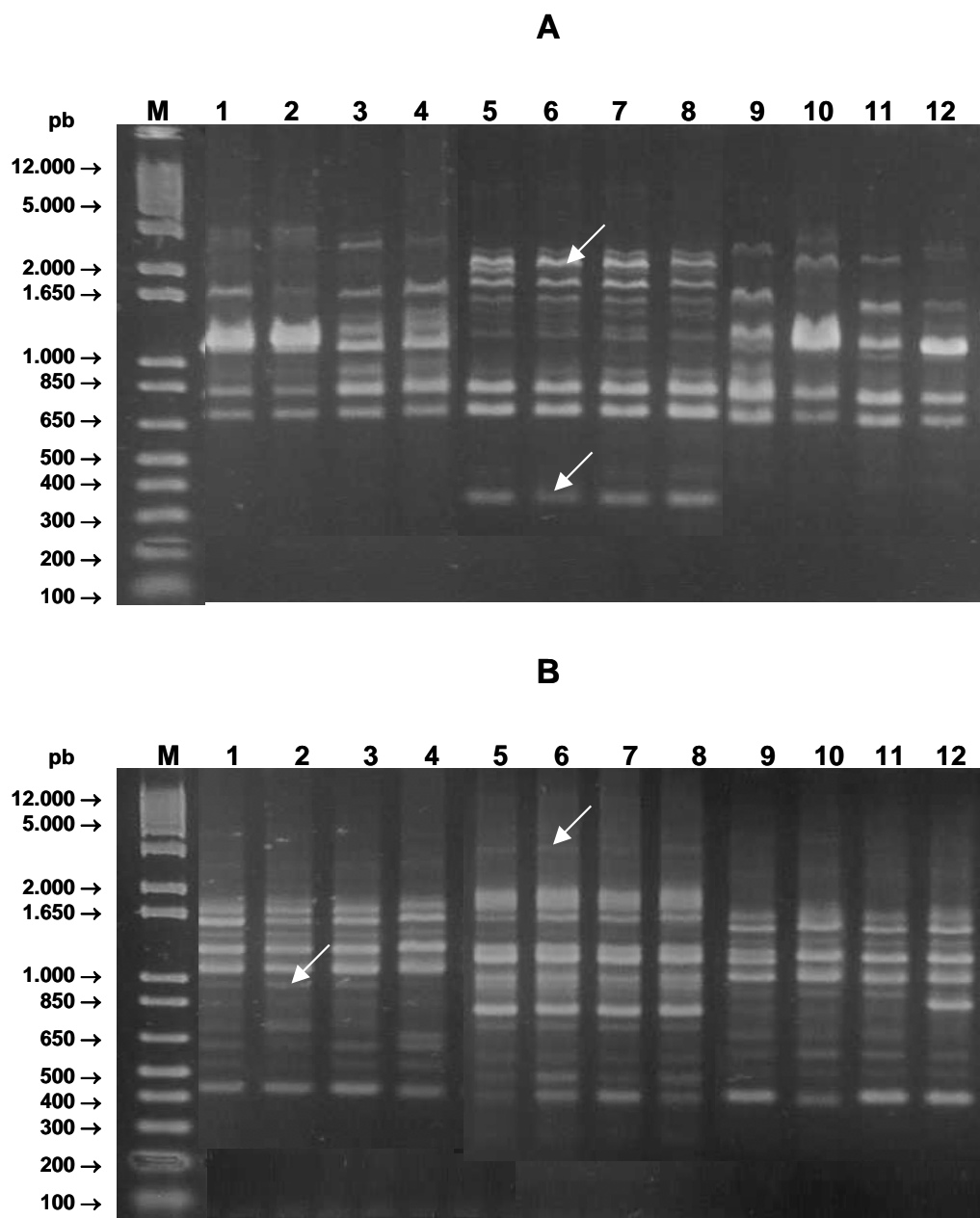


FIGURA 4. Perfis eletroforéticos de RAPD das populações de *Tetragonisca angustula*, coletadas em Maringá (1 a 4), Junqueirópolis (5 a 8) e Cianorte (9 a 12). (A) e (B) Fragmentos amplificados com o *primer* OPP-07 e OPP-11 respectivamente. M = Marcador de peso molecular de DNA (DNA Ladder-Invitrogen). As setas indicam os marcadores encontrados para os grupos.

CONCLUSÕES

Foi observada alta variabilidade genética e baixo fluxo gênico dentro e entre as populações de *T. a. angustula* no noroeste do Paraná. Já nas *T. a. fiebrigi*, foram detectados alta variabilidade genética e alto fluxo gênico. Esses achados indicam que está ocorrendo hibridização entre as populações de *T. a. fiebrigi*.

A utilização de RAPD foi eficiente em detectar novos marcadores moleculares para populações de *T. angustula*, tendo sido encontrados seis marcadores.

A utilização de RAPD não permitiu identificar as *T. a. angustula* e *T. a. fiebrigi*.

Essas abelhas possuem ótimo material genético para sua manutenção em ambientes naturais e para seu posterior manejo e utilização na meliponicultura.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. João M. Franco de Camargo (USP-Ribeirão Preto) pela identificação das abelhas; ao Wainer C. Chiari pelo fornecimento das abelhas de Junqueirópolis; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro para execução deste projeto.

REFERÊNCIAS

BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D. O. Application of the RAPD technique in Tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, v.73, p.117-123, 1994.

CASTANHEIRA, E. B. Marcadores genéticos e sua utilização em estudos populacionais em *Tetragonisca angustula* e *Plebeia droryana* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). 1995. 80 f. Tese (Doutorado em Ciências: Genética) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 1995.

CURSINO, J. R. S. Estudo comparativo dos padrões isoenzimáticos e de proteínas não catalíticas em espécies de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae). 1993. 152 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 1993.

DIAS, L. A. S. Variância de frequências alélicas. *In: ALFENAS, A. C. (Ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos.* 2. ed. Viçosa: UFV, 1998. p. 381-404.

FALCÃO, T. M. M. A.; CONTEL, E. P. B. Genetic variability in natural populations of Brazilian social bees. I. Eletrophoretic data for PGM and MDH give evidence for multiple fertilization in stingless bees. *Revista Brasileira de Genética*, v. 14, n. 1, p. 47-59, 1991.

FALCÃO, T. M. M. A.; CONTEL, E. P. B. Genetic variability in natural populations of Brazilian social bees. I. Isozyme patterns and polymorphism for esterases and total protein. *Revista Brasileira de Genética*, v. 13, n. 4, p. 731-54, 1990.

FRANCISCO, F. O. Diversidade genética de populações da abelha sem ferrão *Plebeia remota*: Análise do DNA mitocondrial e microssatélites. 2002, 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Biologia/Genética) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. *Evol. Biol.*, v. 6, p. 381-398, 1972.

MACHADO, M. F. P. S.; CONTEL, E. P. B. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase isozyme variation in adult meliponids (Hymenoptera: Apidae). *Biochemical Genetics*, v. 29, p. 593-600, 1991.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 70, p. 3321-3323, 1973.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, v. 89, p. 583-590, 1978.

NOGUEIRA-NETO, P. Ainda a questão da viabilidade genética e ecológica das pequenas populações e dos fragmentos florestais. *In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS*, 5., 2002, Ribeirão Preto. *Anais...* Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, 2002. p. 15-17.

OLIVEIRA R. C. *et al.* Genetic divergence in *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on rapid markers. *Genetics and Molecular Biology*, v. 27, n. 2, p. 181-186, 2004.

PAULA, F. M. *et al.* Genetic structure analysis of *Euglossa pleosticta* (Hymenoptera, Apidae) populations from remnants of Atlantic Forest in southern Brazil. *In: 8th INTERNATIONAL CONFERENCE ON TROPICAL BEES*, 8., and *ENCONTRO SOBRE ABELHAS*, 6., 2004, Ribeirão Preto. *Proceedings...* Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, 2004. p. 438.

ROHLF, F.J. NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. New York: Exeter Publishers, 1989.

SILVA, A. C. *et al.* Estimativa da variabilidade genética das esterases de abelhas jataí (*Tetragonisca angustula angustula*) em duas populações da região noroeste do Paraná. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 5., 2001, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre, 2001b. p. 73.

SILVA, A. C. *et al.* Estimativa da variabilidade genética das isozimas isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase e enzima málica de abelhas jataí (*Tetragonisca angustula angustula*) em duas populações da região noroeste do Paraná. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 47., 2001, Águas de Lindóia. *Anais...* Águas de Lindóia, 2001a. 1CDROM.

SUAZO, A. *et al.* Differences between African and European honey bees (*Apis mellifera* L.) in Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Heredity*, v. 9, p. 32-36, 1998.

SUZUKI, K. M. *et al.* Variabilidade e estrutura genética de populações de *Euglossa truncata* (Hymenoptera, Apidae) de duas áreas urbanas, Londrina-PR. In: VII Encontro Paranaense de Genética, 2004, Londrina. *Anais...* Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2004. 1CDROM.

VASCONCELOS, S. M. Divergência genética entre populações de *M. rufiventris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). 1998, 49 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1998.

WALDSCHMIDT, A. M. *et al.* A molecular marker distinguishes the subspecies *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, n. 3, p. 609-611, 2000.

WALDSCHMIDT, A. M. *et al.* Genetic analysis of *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) with RAPD markers. *Brazilian Journal of Biology*, v. 62, n. 4B, p. 923-928, 2002.

WILLIAMS, J. G. K. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

YEH, F. C. *et al.* POPGENE Version 1.31: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.