



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Divergência genética por Marcadores RAPD
intra e inter colônias de *Trigona hyalinata*
Lep. (Meliponini) por meio de duas
abordagens de extração de DNA.**

VIVIANE SANTOS BRANDÃO

WARWICK ESTEVAM KERR

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Dezembro, 1999



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Divergência genética por Marcadores RAPD intra e
inter colônias de *Trigona hyalinata* Lep.
(Meliponini) por meio de duas abordagens de
extração de DNA.**

VIVIANE SANTOS BRANDÃO

WARWICK ESTEVAM KERR

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Dezembro, 1999



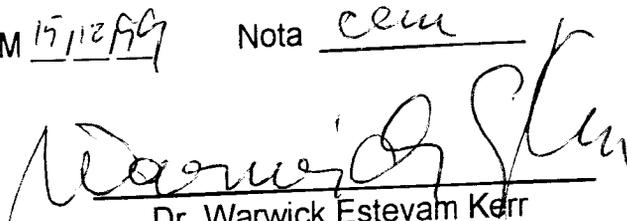
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

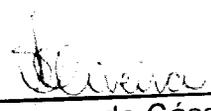
Divergência genética por Marcadores RAPD intra e inter colônias de *Trigona hyalinata* Lep. (Meliponini) por meio de duas abordagens de extração de DNA.

VIVIANE SANTOS BRANDÃO

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 15/12/99

Nota cem


Dr. Warwick Estevam Kerr
Orientador


MSc. Rosana de Cássia Oliveira
Co-Orientadora


Dra. Ana Maria Bonetti
Co-Orientadora

Uberlândia, 15 de Dezembro de 1999 .

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me concedido forças e determinação para vencer os obstáculos e alcançar meus objetivos.

Aos meus pais Maria Helena e Bento por terem me apoiado nesta etapa da vida, dando carinho, compreensão e, sobretudo, amizade. Deixo aqui, o meu muito obrigada.

Ao meu irmão Ricardo pelo companheirismo.

Agradeço ao meu namorado Geovane pelo carinho, solidariedade e por ter tido paciência quando em horas difíceis.

Agradeço ao professor Dr. Kerr, não só por ter desempenhado brilhantemente sua função de orientador, mas pela lição de vida que pude ter, convivendo ao seu lado.

Agradeço à minha co-orientadora MSc. Rosana de Cássia Oliveira por ter me incentivado nos momentos em que eu vacilava; se tornou para mim não só um exemplo de profissional, mas uma grande amiga, pois compartilhamos muito de nossas vidas.

Agradeço à professora Dra. Ana Maria Bonetti por ter me inspirado à ingressar na área de genética, bem como Ter se disposto a participar com brilhantes sugestões de minha banca examinadora.

Agradeço à uma grande amiga que consegui conquistar nesta trajetória pela UFU, a Doutoranda Veridiana de Melo Rodrigues. Pelas nossas longas conversas que me incentivaram a continuar seguindo em frente nesta profissão tão difícil, mas ao mesmo tempo, tão prazerosa.

Agradeço aos meus amigos Cícero, Cláudio, Francis e Rosana pelas divertidas coletas de abelhas.

Agradeço ao meu amigo Alexandre pelas fotos das colméias e abelhas que ilustraram este trabalho.

Agradeço ao prof. Gismar pelos cálculos estatísticos que fazem parte deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos do laboratório de genética (Alexandre, Ana Paula, Andreia, Cícero, Cláudio, Cristinas Faria e Rodrigues, Flávia, Francis, Gislene, Juliana, Katiere, Marcolino, Maria Alice, Rodrigo, Rosilene, Shângely, Soraya, Vanessa, Vânia) pelo companheirismo e pelos momentos alegres que passamos juntos.

Agradeço aos meus verdadeiros amigos da Biologia, com os quais caminhei durante estes quatro anos de vida acadêmica e que me fizeram crescer como ser humano.

A todos os meus professores da Biologia que, de uma forma ou de outra, me fizeram abraçar a profissão e dizer com orgulho:

“Agora eu sou uma Bióloga!”

Dedico este trabalho às pessoas que realmente caminharam comigo nesta jornada pela vida. Pessoas que me fizeram acreditar que o mundo seria bem melhor se houvesse mais amor e compreensão entre os seres humanos. Deixo aqui registrado o meu agradecimento às duas pessoas mais importantes de minha vida, a quem devo tudo o que sou hoje: meus pais Maria Helena e Bento. Obrigada por vocês fazerem parte dela.

“Porque tu és a minha rocha e a minha
fortaleza; pelo que, por amor do teu
nome, guia-me e encaminha-me”
(Salmo 31:3).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.....	19
FIGURA 2.....	20
FIGURA 3.....	21
FIGURA 4.....	22
FIGURA 5.....	23
FIGURA 6.....	24

ÍNDICE

1) INTRODUÇÃO.....	01
1.1) As abelhas.....	01
1.2) Marcadores RAPD.....	04
2) OBJETIVOS.....	11
3) MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4) RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5) CONCLUSÕES.....	25
6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

RESUMO

Trigona hyalinata, conhecida como guaxupé, abelha brava e irapuá da asa branca (SCHWARZ, 1948) se distribui no domínio dos cerrados, embora não se restrinja à esse habitat (PEDRO, 1992). Possui comportamento agressivo perante à aproximação de predadores e/ou competidores. *Trigona hyalinata* bem como *T. spinipes* são consideradas pestes em muitas áreas do Brasil, principalmente em laranjais. Elas cortam botões florais de muitas espécies antes de abrirem, para obterem néctar, pólen e seiva, sem no entanto desempenharem o papel de polinizadores. O objetivo deste trabalho foi: analisar a divergência genética entre colônias utilizando cinco indivíduos provenientes de seis colméias, sendo três colméias localizadas no Campus Umuarama em Uberlândia (MG), uma em Monte Carmelo (MG), outra em Ituiutaba(MG) e uma colméia em Catalão (GO); analisar a divergência genética dentro da colônia (Hemocentro), utilizando 15 indivíduos, isoladamente, para análise; e analisar a divergência em "bulks", utilizando três, cinco, dez e quinze indivíduos para extração de DNA em grupos, coletados na colméia do Hemocentro. A análise do DNA foi feita por RAPD e a matriz gerada pelo programa STATISTICA 4.5A (1993) foi usada para o cálculo das distâncias genéticas e análise de "cluster", método de Porcentagem de Desacordo. Na análise de divergência genética entre as colônias houve a formação de dois grupos à 0,0614 de dissimilaridade. Cinco grupos não apresentaram divergência genética, embora quatro destes apresentaram indivíduos de colônias diferentes. Na análise de divergência dentro da colônia do Hemocentro, a divergência máxima foi de 0,0827 para os 15 indivíduos analisados. Com o fracionamento para cinco e 10, dos 15 indivíduos analisados, obteve-se uma correlação positiva entre divergência genética e número de indivíduos analisados. A análise por meio de "bulks" não demonstrou dissimilaridade genética com o aumento do número de indivíduos utilizados. Estes experimentos permitiram inferir que a extração de DNA individual foi mais eficiente do que a extração de "bulks", sendo que o número mínimo de indivíduos necessários para a análise de divergência genética dentro de colônias por RAPD em *T. hyalinata* foi de 10 indivíduos. Repetições dos experimentos são necessários para a espécie estudada, bem como para outras espécies de Meliponíneos, a fim de tentar se obter o número mínimo de indivíduos por colônia adequado aos estudos de RAPD.

1) INTRODUÇÃO

1.1) As abelhas

Na classe Insecta, a ordem Hymenoptera destaca-se por sua grande diversidade de comportamentos sociais e por suas múltiplas relações com plantas e animais. Já se conhecem cerca de 120 mil espécies dentre vespas, formigas, abelhas e outras menos conhecidas (SAKAGAMI & ZUCCHI, 1966; CAMARGO *et al.*, 1973 e KERR *et al.*, 1996).

As abelhas podem ser agrupadas em duas famílias: Megachilidae e Apidae. Dentre os apídeos são encontradas três subfamílias: Xylocopinae, Nomadinae e Apinae. Os Apinae estão divididos em 19 tribos: os corbiculados (concavidade sem pêlos na tíbia das patas posteriores adaptadas ao transporte de pólen e resina): Meliponini, Euglossini, Bombini e Apini e os não-corbiculados: Pararhophitini, Fideliini, Lithurgini, Anthidiini, Megachilini, Osmiini, Xylocopini, Manueliini, Ceratinini, Allodapini, Ammobatini, Caenoprosopidini, Neolarrini, Townsendiellini, Nomadini, Biastini, Hexepeolini, Ammobatoidini, Brachynomadini, Epeolini, Tetrapediini, Rhathymini, Centridini, Anthophorini, Ericrocidini, Melectini, Osirini, Protepeolini, Isepeolini, Exomalopsini, Ancylini, Eucerini, Emphorini, Ctenoplectrini, Tapinotaspini (ALSINA & MICHENER, 1993).

Os Meliponíneos, abelhas sem ferrão, distinguíveis dos outros Apinae pela redução e fragilidade da venação nas asas, atrofia do ferrão e presença de penicílio na tíbia posterior (MICHENER, 1990), são responsáveis pela polinização de 40 a 90% da flora brasileira, conforme o ecossistema (KERR *et al.*, 1996).

Estudos com diversas espécies de Meliponíneos envolvendo morfologia, localização, histologia e desenvolvimento das glândulas salivares (cabeça e tórax) mandibulares, hipofaringeanas, de cera e de cheiro, bem como estudos sobre a origem embrionária, diferença no grau de desenvolvimento e histologia segundo a idade e sexos ou castas das mesmas, permitiu a construção de um diagrama de relações filogenéticas que indica a derivação e grau evolutivo alcançado por este grupo. Tal diagrama fez com que *Trigona spinipes*, *T. hyalinata*, *T. freiremaiai*, *T. silvestrii*, *T. (Cephalotrigona) capitata*, *T. (Partamona) cupira*, *T. (Tetragonisca) jaty*, *Melipona rufiventris* e *M. quadrifasciata* ocupassem o mesmo patamar na escala evolutiva (LANDIM, 1963; MELLO & KERR, 1984).

Trigona é o maior gênero e o mais amplamente distribuído em relação aos outros Meliponini (56 gêneros). Representantes deste gênero encontram-se nos Neotrópicos (do México à Argentina). Possuem um interessante mecanismo de orientação e direção da fonte de alimento, utilizando marcação por trilha de cheiro entre o alimento e a colméia, com secreções produzidas pelas glândulas salivares (KERR & ESCH, 1965; SAKAGAMI & ZUCCHI, 1966; KERR *et al.*, 1980).

Este gênero contém cerca de 300 espécies, dentre as quais, as mais conhecidas são: *Trigona (Trigona) amalthea* Olivier, *cilipes* Fabricius, *corvina* Cockerell, *fulviventris* Guérin, *fuscipennis* Friese, *hyalinata* Lepeletier, *hypogea* Silvestri, *nigerrima* Cresson, *pallens* Fabricius, *silvestriana* Vachal e *williana* Friese (MICHENER, 1990).

Trigona hyalinata, conhecida como guaxupé, abelha brava e irapuá da asa branca (SCHWARZ, 1948) se distribui no domínio dos cerrados, embora não se restrinja à esse habitat (PEDRO, 1992). É muito confundida com *T. spinipes* (irapuá) devido ao seu comportamento agressivo perante à

aproximação de predadores e/ou competidores e pela coloração preta do corpo, comum à ambas as espécies. O que difere morfológicamente (à olho nú) uma da outra é que, enquanto *T. spinipes* apresenta asas pretas, *T. hyalinata* possui asas esbranquiçadas (SCHWARZ, 1948).

Trigona hyalinata bem como *T. spinipes* são consideradas pestes em muitas áreas do Brasil, principalmente em laranjais. Elas cortam, com suas mandíbulas robustas e denteadas, botões florais de muitas espécies antes de abrirem, para obterem néctar, pólen e seiva, sem no entanto desempenharem o papel de polinizadores. Elas, também, perfuram corola de *Ananas ananassoides* (PEDRO, 1992). Entretanto, este hábito é importante na polinização de *Crotalaria juncea* pois, quando as operárias destas duas espécies fazem um buraco no botão da carena de flores de *Crotalaria* para coletarem pólen e néctar, outras abelhas são atraídas e estas efetivam a polinização (AMARAL, 1953, 1955). Todavia, quando estão coletando alimento, um interessante comportamento agressivo é observado nestas duas espécies, tão intimamente ligadas. Elas, usualmente, atacam outras abelhas (até mesmo maiores) sobre as flores, fazendo com que elas voem para longe, evitando o combate (KERR *et al.*, 1980).

Operárias de *T. hyalinata* foram observadas em atividade sobre as flores apenas no mês de agosto, na estação ecológica de Cajuru (Estado de São Paulo). PEDRO e CAMARGO (1991) inferiram que elas podem estar sendo influenciadas pelo florescimento de espécies de plantas "atrativas" como *Vernonia ferruginea*, *V. rubriramea* e *Gochnatia barrosii*, mais do que por fatores climáticos estacionais. *Trigona* mostrou hábito alimentar altamente generalista e, embora interações agressivas entre *T. hyalinata* e *T. spinipes* já tenham sido observadas na literatura, em diferentes espécies de plantas

e lugares, isto não foi observado neste trabalho (PEDRO & CAMARGO, 1991). Também foi observado por PEDRO (1992) que a capacidade de comunicar a presença de fontes de alimento é muito desenvolvida nesta espécie. Isto permite que, em um curto espaço de tempo, seja encontrado um grande número de indivíduos de uma mesma colônia coletando na mesma fonte de recursos (PEDRO, 1992).

1.2) Marcadores RAPD

O PCR (Polymerase Chain Reaction) é um método *in vitro*, utilizado para produzir grandes quantidades de fragmentos de DNA a partir de pequenas amostras, por meio de uma DNA polimerase quase termoestável produzida por uma eubactéria termofílica (*Thermus aquaticus*) (WILLIAMS *et al.*, 1990). Envolve o uso de dois "primers" específicos que flanqueiam a região de interesse e amplificam um fragmento específico de DNA (KAMBHAMPATI *et al.*, 1992).

WILLIAMS *et al.* (1990) revolucionaram a área de marcadores moleculares baseados em PCR desenvolvendo, a partir deste, uma técnica que utiliza "primers" simples e curtos (10 bases) de sequência arbitrária de nucleotídeos, contendo 50-60% de G-C e denominada RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (CHALMERS *et al.*, 1992; KAMBHAMPATI *et al.*, 1992; TINGEY *et al.*, 1992; WILLIAMS *et al.*, 1992; KAZAN *et al.*, 1993; HOWELL *et al.*, 1994; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

A técnica de RAPD apresenta várias vantagens, tais como: não depender do conhecimento da sequência do DNA (CHALMERS *et al.*,

1992; STILES *et al.*, 1993; TINGEY *et al.*, 1992; KHANDKA *et al.*, 1997; OLIVEIRA, 1998), capacidade de amostrar regiões de DNA repetitivas (LU & RANK, 1996) fornecer resultados confiáveis (HAYMER & MCINNIS, 1994; HOWELL *et al.*, 1994), simplicidade (WEEDEN *et al.*, 1992; LANDRY *et al.*, 1993), alto nível de polimorfismos (WEEDEN *et al.*, 1992; LANDRY *et al.*, 1993), requerer somente alguns nanogramas de DNA (KESSELI *et al.*, 1992; TINGEY *et al.*, 1992; LANDRY *et al.*, 1993; STILES *et al.*, 1993), automatização do processo (muito eficiente em termos de baixo custo e tempo requerido) (KESSELI *et al.*, 1992; TINGEY *et al.*, 1992; WEEDEN *et al.*, 1992; LANDRY *et al.*, 1993; STILES *et al.*, 1993; HAYMER & MCINNIS, 1994; HOWELL *et al.*, 1994), não requer uso de isótopos radioativos (LANDRY *et al.*, 1993; LU & RANK, 1996) e nem construção de bibliotecas genômicas (LANDRY *et al.*, 1993).

É um método relativamente simples (baseado na amplificação do DNA) se comparado com outras técnicas como, por exemplo, RFLP, que necessita de hibridação do DNA com P^{32} radioativo, requerendo um desenvolvimento prévio de uma biblioteca de sondas específicas para o organismo de interesse. No que diz respeito à eficácia, marcadores RAPD são de 4 a 6 vezes mais eficientes do que marcadores RFLP no mapeamento de polimorfismos e 10 vezes mais eficientes em tempo e mão-de-obra (PARAN *et al.*, 1991) e as bandas são mais facilmente visualizadas do que bandas RFLP (THORMANN & OSBORN, 1992).

Para que haja amplificação de um fragmento RAPD no genoma analisado, duas sequências de DNA complementares ao "primer" arbitrário devem estar suficientemente adjacentes (menos de 4000 pares de bases) e em orientação oposta, de maneira a permitir a amplificação. Tipicamente, cada "primer" arbitrário utilizado se anela ao DNA em um ou mais locais,

dirigindo a síntese de vários segmentos de DNA, simultaneamente, em diversos pontos do genoma, resultando assim, na amplificação da região de intervenção e fornecendo várias bandas no gel de agarose, que podem ser visualizadas diretamente com brometo de etídio, sob luz ultravioleta (KAMBHAMPATI *et al.*, 1992; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). Algumas das regiões amplificadas são repetitivas e outras são cópias únicas. A técnica RAPD, também, mostra que os fragmentos amplificados são herdados segundo o sistema Mendeliano (WILLIAMS *et al.*, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1992; *apud* KAMBHAMPATI *et al.*, 1992).

O comportamento dos marcadores RAPD é de caráter dominante. Os polimorfismos são detectados como presença (homozigoto dominante e heterozigoto) ou ausência de bandas (homozigoto recessivo) (TINGEY *et al.*, 1992). Diferenças de apenas uma base (mutações de ponto) são suficientes para causar a não complementariedade do "primer" com o sítio de iniciação e assim impedir a amplificação de um segmento (KESSELI *et al.*, 1992; SKROCH *et al.*, 1992; TINGEY *et al.*, 1992; WILLIAMS *et al.*, 1992; KAZAN *et al.*, 1993; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996), bem como interseções e deleções na região entre os sítios de ligação do "primer" (TINGEY *et al.*, 1992; KAZAN *et al.*, 1993), eventos estes que não podem ser detectados por marcadores RFLP (KESSELI *et al.*, 1992).

Vários fatores, incluindo quantidade de "primer" em relação ao DNA molde, diferenças nos procedimentos entre diferentes laboratórios (KESSELI *et al.*, 1992), concentração de magnésio (KESSELI *et al.*, 1992; TINGEY *et al.*, 1992), concentração de DNA molde, temperatura de anelamento do "primer", comprimento do "primer" e composição das bases afetam a reação e deverão ser cuidadosamente controladas (TINGEY *et al.*, 1992; KHANDKA *et al.*, 1997).

Diferentes métodos de extração de DNA produzem grau de pureza variados, sendo necessário padronizar o protocolo de extração, garantindo assim, a quantidade e qualidade do DNA, a fim de se obter reprodutibilidade e nitidez dos marcadores RAPD (WEEDEN *et al.*, 1992; WILLIAMS *et al.*, 1992). A qualidade do DNA genômico tem um grande efeito na geração e resolução de produtos amplificados. DNAs isolados com quantidades significativas de polissacarídeos ou produtos fenólicos não são adequados para a amplificação e DNA contendo moderados níveis de impurezas produz bandas RAPD fracas ou "borradas" (WEEDEN *et al.*, 1992). Muito DNA genômico pode resultar em empacotamento ou em ausência de bandas claramente definidas no gel, enquanto que pouco DNA fornece padrões irreprodutíveis (WILLIAMS *et al.*, 1992).

RAPD de "bulks" de DNA de pedigrees anônimos (juntados ao acaso e sem critério no "bulk") devem ser criticamente avaliados para frequentes marcadores falso-positivos resultantes dos diversos alelos amostrados. Os falsos fragmentos polimórficos podem ser devidos à formação de uma molécula de DNA "heteroduplex" (HUNT & PAGE, 1992; KHANDKA *et al.*, 1997). A variabilidade genética no "bulk" de DNA pode ser responsável pelo falso polimorfismo. Uso de material genético mais homogêneo, como "bulk" de gerações F1, F2, F3, obtidas por retrocruzamento, pode reduzir a probabilidade de obter tais resultados (KHANDKA *et al.*, 1997).

Concentrações de Mg^{+2} entre 1,5 e 3,0 mM e pequenas alterações na concentração de tampão não proporcionam uma mudança muito significativa no fenótipo RAPD (WEEDEN *et al.*, 1992). Todavia a concentração de cada dNTP influencia na intensidade das bandas, sendo que, concentrações menores do que 100mM produz bandas fracamente coradas (WILLIAMS *et al.*, 1992).

O óleo mineral, usado para impedir a volatilização da reação quando submetida à altas temperaturas no termociclador, também pode conter impurezas que inibem a reação de amplificação (WEEDEN *et al.*, 1992).

Diferentes marcas de Taq DNA polimerase revelam variações drásticas entre as cópias obtidas a partir de um único "primer", podendo ser explicado principalmente pela diferença nas atividades das enzimas e pela diferença na composição do tampão de reação (MEUNIER & GRIMONT, 1993). Todas as polimerases que derivam de *Thermus aquaticus* produzem padrões de amplificação similares (mas não idênticos) entretanto, todas as polimerases de outras fontes amplificam muito pouco ou nem discriminam (SCHIERWATER & ENDER, 1993). Quando se aumenta a quantidade de Taq DNA polimerase, aumenta-se o número de produtos amplificados (KHANDKA *et al.*, 1997).

Mudanças significativas nos parâmetros do ciclo produzem os principais efeitos nos fenótipos RAPD (WEEDEN *et al.*, 1992), assim, ao se utilizar diferentes termocicladores, diferenças discrepantes na comparação dos resultados serão encontradas (MEUNIER & GRIMONT, 1993).

Concentrações de "primer" entre 0,1 e 2,0mM são ideais, sendo que, concentrações menores, torna difícil a detecção de produtos amplificados, enquanto que concentrações maiores, fazem aparecer bandas até antes inexistentes (WILLIAMS *et al.*, 1992). Quando a concentração do "primer" é menor, tende a amplificar fragmentos maiores (1500 a 3000pb), enquanto que, os mesmos desaparecem quando a concentração aumenta, sendo substituídos, às vezes, por muitos fragmentos menores (200 a 400pb) (WEEDEN *et al.*, 1992; KHANDKA *et al.*, 1997).

A distribuição de variabilidade entre e dentro populações varia entre "primers". Alguns deles detectam maior variabilidade entre populações,

enquanto outros detectam maior grau de polimorfismo dentro das populações (CHALMERS *et al.*, 1992), mas o número de bandas no perfil RAPD é independente da complexidade do genoma (WILKIE *et al.*, 1993).

WILKIE *et al.* (1993) analisaram cinco espécies do gênero *Allium* por RAPD por meio de 20 "primers" (10b) e obtiveram 91 posições de bandas. O dendrograma por RAPD foi similar à outras classificações existentes. Eles ainda ressaltaram que, para maior confiabilidade na obtenção dos valores de distância genética e produção de dendrograma, deve-se analisar no mínimo 50 locos.

Uma desvantagem da técnica é que, por ter problemas na reprodutibilidade dos resultados (WEEDEN *et al.*, 1992; KHANDKA *et al.*, 1997), torna-se inviável na constituição de um banco de dados de cópias para identificação de cepas (KESSELI *et al.*, 1992; MEUNIER & GRIMONT, 1993). Outra desvantagem é quanto à amostragem do número de alelos/"locus" (onde alelo dominante é representado por presença de banda e alelo recessivo por ausência de banda) (KESSELI *et al.*, 1992; KHANDKA *et al.*, 1997). A técnica é incapaz de identificar "loci" heterozigoto (CHALMERS *et al.*, 1992; KAMBHAMPATI *et al.*, 1992; KESSELI *et al.*, 1992; TINGEY *et al.*, 1992), o que impossibilita testar a hipótese de acasalamento ao acaso em populações naturais (KAMBHAMPATI *et al.*, 1992). Esta desvantagem pode ser superada utilizando-se progênies haplóides, linhagens recombinantes ou populações retrocruzadas. Uma outra limitação é o fato de que bandas geradas por diferentes "loci" migrem juntas no gel. Isto dificulta a comparação com dados de outra taxa, especialmente aqueles baseados em diferentes técnicas (LU & RANK, 1996).

Mesmo com restrições, esta técnica revolucionou os laboratórios de Biologia Molecular no mundo, em estudos de populações. Pesquisadores têm utilizado os marcadores RAPD no mapeamento genético (HUNT & PAGE, 1992; KESSELI *et al.*, 1992; TINGEY *et al.*, 1992; WEEDEN *et al.*, 1992; WILLIAMS *et al.*, 1992; KAZAN *et al.*, 1993; LANDRY *et al.*, 1993; WILKIE *et al.*, 1993), estudos filogenéticos e de população (CHALMERS *et al.*, 1992; KAMBHAMPATI *et al.*, 1992; TINGEY *et al.*, 1992; WEEDEN *et al.*, 1992; SKROCH *et al.*, 1992; WILLIAMS *et al.*, 1992; KAZAN *et al.*, 1993; PUTERKA *et al.*, 1993; STILES *et al.*, 1993; WILKIE *et al.*, 1993; HAYMER & MCINNIS, 1994; HOWELL *et al.*, 1994; LU & RANK, 1996; OLIVEIRA, 1998), caracterização de germoplasma (SKROCH *et al.*, 1992; TINGEY *et al.*, 1992; HOWELL *et al.*, 1994; THORMANN & OSBORN, 1992), "fingerprinting" (LANDRY *et al.*, 1993; HOWELL *et al.*, 1994), manejo, conservação e melhoramento de árvores tropicais (CHALMERS *et al.*, 1992), clonagem de genes de resistência (KESSELI *et al.*, 1992), dentre outros.

2) OBJETIVOS

- 1) Estimar a divergência genética entre colônias de *T. hyalinata* provenientes de Uberlândia, Monte Carmelo, Ituiutaba (MG) e Catalão (GO).
- 2) Estimar a divergência genética dentro da colônia de *T. hyalinata*.
- 3) Estimar o número mínimo de indivíduos dentro de colônias a ser utilizado em ensaios RAPD em *T. hyalinata*.
- 4) Analisar as extrações de DNA em “bulks” e individuais e compará-las na sua eficiência no fornecimento de polimorfismos.

2) MATERIAL E MÉTODOS

A abelha, material material biológico desse estudo, espécie *Trigona hyalinata* Lepeletier, foi identificada pelo prof. Dr. José Maria Franco de Camargo - USP de Ribeirão Preto.

Foram estabelecidos os seguintes experimentos:

- 1) **Análise da divergência genética entre colônias:** utilizou-se cinco indivíduos provenientes de seis colméias, sendo três colméias localizadas no Campus Umuarama em Uberlândia (MG) (blocos 2E, 4C, Hemocentro), uma em Monte Carmelo (MG), outra em Ituiutaba(MG) e uma colméia em Catalão (GO). Os 30 indivíduos foram processados em extrações individuais de DNA.
- 2) **Análise da divergência genética dentro da colônia (Hemocentro):** foram utilizados 15 indivíduos, isoladamente, para análise.
- 3) **Análise da divergência em “bulks”:** foram utilizados três, cinco, dez e quinze indivíduos para extração de DNA em grupos. Estes foram, também, coletados na colméia do Hemocentro. As datas e locais de coleta constam na Tabela 1.

Os indivíduos foram coletados com puças na entrada das colméias que, no geral, localizam-se no alto de muros e paredes, a mais ou menos 7 metros de altura.

TABELA 1: Relação dos locais e datas de coleta das abelhas.

LOCAL	DATA DE COLETA
HEMOCENTRO (Uberlândia-MG)	OUTUBRO/1998 OUTUBRO/1999
BLOCO 2E (Uberlândia)	OUTUBRO/1998
BLOCO 4C (Uberlândia)	OUTUBRO/1998
CATALÃO (GO)	MARÇO/1999
ITUIUTABA (MG)	MARÇO/1999
MONTE CARMELO (MG)	MARÇO/1999

As amostras de Uberlândia foram colocadas em vidros de coletas e estocadas em "freezer" à -80° C, até a extração do DNA. As demais foram colocadas em recipientes com álcool 70% até chegarem ao laboratório e então, colocadas em "freezer" -80° C. As abelhas estocadas em álcool, foram submetidas à lavagens sucessivas em tampão (10mM de Tris HCl pH 8,0; 100mM de NaCl; 1mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$), antes do processo de extração do DNA a fim de hidratá-las.

A extração de DNA destas abelhas foi feita utilizando-se o protocolo de SHEPPARD *et al.* (1992) modificado. Em microtubos de 2ml, macerou-se a abelha (somente o tórax) em nitrogênio líquido, acrescentou-se 600 μ l de tampão de Maceração (Tris 10mM, NaCl 60mM, Sacarose 30mM, EDTA 10mM), 600 μ l de tampão de Lise (Tris 300mM, SDS 40mM, EDTA 20mM, DEPEC 0,7%). Em seguida, adicionou-se 10 μ l de proteinase K (10mg/ml) e os microtubos foram mantidos em banho-maria à 45° C, por 45 min. Acrescentou-se 10 μ l de RNase (10mg/ml) e foram mantidos por 1 hora à 37° C. Procedeu-se a duas lavagens sucessivas com fenol, a fim de se retirar o excesso de corantes da abelha que sempre ficou no DNA ao se utilizar apenas uma lavagem com fenol. Em seguida à duas lavagens com

clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico - 24:1) seguidas do acréscimo de 1/10 do volume de NaCl 2M, completando-se o volume com etanol 100% gelado. Incubou-se o DNA por 2 horas ou “overnight” para a precipitação. Os DNAs foram centrifugados por 15 min à 13.000 rpm, lavados com etanol 70% e secados à vácuo. Em seguida, ressuspensos em 70µl de água destilada.

Houve dificuldades à princípio, em relação à este protocolo. Quando acrescentava-se fenol e/ou clorofil pela segunda vez, não havia formação de duas fases (o que era de se esperar), fazendo com que toda a extração fosse inutilizada pois, o sobrenadante, que era o que interessava, não era delimitado. Não se sabe ainda o que causou esta homogeneização da solução, talvez problema de pH ou concentrações destas soluções. Quando foi feito novo fenol o problema não se repetiu.’

A qualificação e quantificação do DNA foi feita por meio de aplicação de uma alíquota (10µl) das amostras em gel de agarose à 0,8% com coloração por brometo de etídio e leitura em espectrofotômetro do DNA à 260 nm, respectivamente. Em seguida, os DNAs foram diluídos com água ultrapura, para 5ng e estocados à - 20°C.

Foram testados 22 “primers” de sequência arbitrária. Oito “primers” (sendo seis “primers” curtos da Operon Technology e dois longos sintetizados pelo Laboratório de Genética da UFU) que forneceram um bom padrão de amplificação, foram selecionados (Tabela 2).

TABELA 2: Lista de “primers” utilizados nos experimentos e suas respectivas sequências de nucleotídeos.

“Primer” 5’→3’	Sequência
OPC7	GTCCCGACGA
OPV1	TGACGCATGG
OPV7	GAAGCCAGCC
OPV10	GGACCTGCTG
OPV15	CAGTGCCGGT
OPV18	TGGTGGCGTT
MAU101	TCAAACAGCATCTAGGCGG
MAU902	CCAATTCAGTATGTGCTGAGT

Cada reação de amplificação consistiu de Tampão da Taq 1X; MgCl₂ 1.5mM; dNTPs 100µM de cada (dCTP, dATP, dGTP, dTTP); 10 pmoles de “primer”; 1U de DNA polimerase; 15 ng de DNA genômico e volume final completado, com água ultrapura, para 20µl. Cada reação foi coberta com uma gota (~20µl) de óleo mineral para evitar a evaporação e centrifugada à 4000 rpm por 10 segundos.

Cada bateria de reações apresentou um controle negativo, com todos os componentes da reação, exceto o DNA, para confirmar se os produtos amplificados representavam DNA genômico amplificado, contaminações ou artefatos do “primer”.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,2%, corados com brometo de etídio, visualizados e fotografados em UV.

Foi construída uma matriz binária de acordo com presença (1) ou ausência (0) de bandas para estimar a distância genética entre as colônias e entre os indivíduos da colônia testada.

A matriz gerada pelo programa STATISTICA 4.5A (1993) foi usada para o cálculo das distâncias genéticas e análise de “cluster”, segundo o método de Porcentagem de Desacordo, dado pela fórmula:

$$N'_{AB} / N_T \quad \text{PUTERKA et al., (1993)}$$

Onde, N'_{AB} é o número total de bandas polimórficas entre os genótipos comparados e N_T é o número total de bandas. A análise de “cluster” foi feita pelo método não-ponderado de agrupamento aos pares utilizando médias aritméticas (UPGMA – “Unweighted pair-group method using arithmetic averages”) o qual agrupa, inicialmente, indivíduos mais similares e assim, sucessivamente, até os indivíduos ou grupos mais distantes.

O gráfico de correlação das distâncias genéticas pelo número de indivíduos foi obtido por meio do programa STATISTICA 4.5A (1993) – BASIC STATISTICS AND TABLES.

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar a descrição dos resultados obtidos, os genótipos de *T. hyalinata* serão discriminados pelo local de origem.

Ao se analisar a divergência genética entre as colônias provenientes das cidades de Uberlândia (Blocos 4C, 2E e Hemocentro), Monte Carmelo (MG), Catalão (GO) e Ituiutaba (MG) por meio dos oito “primers” selecionados, foi obtida uma divergência genética máxima de 0,0614, que dividiu os indivíduos em dois grupos, um contendo 23 indivíduos e o outro com os sete genótipos restantes (Figura 1). Foi observado a presença de cinco grupos de genótipos que não diferiram geneticamente, com indivíduos de diferentes colônias e lugares, sendo agrupados no mesmo “cluster”. Apenas os representantes da colônia do Bloco 4C apresentou todos os seus indivíduos agrupados, embora este mesmo “cluster” também apresentou genótipos de outros locais, padrão este, que não era o esperado, visto que, indivíduos mais próximos geneticamente deveriam estar agrupados em “clusters” isolados (TABERNER *et al.*, 1997). FUTUYMA (1992) menciona que quanto mais distanciadas estão as populações, mais divergentes elas são em frequências alélicas e nas características de base genética, embora não haja, geralmente, correlação estrita entre ambas.

Neste dendrograma foram observados dois genótipos (Ituiutaba 4 e 5) que não se agruparam em “clusters”, mantendo-se também isolados entre si.

Estes resultados permitem algumas inferências:

- 1) Que talvez *T. hyalinata* possa apresentar múltiplas rainhas fisogástricas, ovipondo simultaneamente na colônia. Estudos com a espécie

congenérica *T. spinipes* mostraram que nesta espécie ocorre apenas uma única rainha poedeira, embora em *Melipona bicolor* já foram observadas várias rainhas ovipondo ao mesmo tempo (KERR, 1949). Não são conhecidos trabalhos sobre comportamento reprodutivo de *T. hyalinata*, bem como outros trabalhos de sua biologia são escassos. Acredita-se que um dos fatores que contribuam para esta deficiência seja o seu alto grau de agressividade, o que dificulta os trabalhos de observação direta.

- 2) Que as rainhas desta espécie possam ser fecundadas por múltiplos zangões. Esta não é uma característica comum para os meliponínios, embora já tenha sido relatado para *Plebeia* por FALCÃO & CONTEL (1991).
- 3) O número de “primers” tenha sido insuficiente para estabelecer o parentesco filogenético. O aumento do número de “primers” cobriria uma maior região no genoma e, conseqüentemente, uma maior taxa de polimorfismos poderia confirmar os dados obtidos. WILKIE *et al.* (1993), analisando cinco espécies do gênero *Allium* por meio de 20 “primers”, observaram que o número mínimo de locos para uma análise significativa por RAPD deve ser de 50. Neste trabalho, especificamente, no estudo da divergência entre as seis colméias, a quantidade de locos foi inferior à este valor (46 locos).

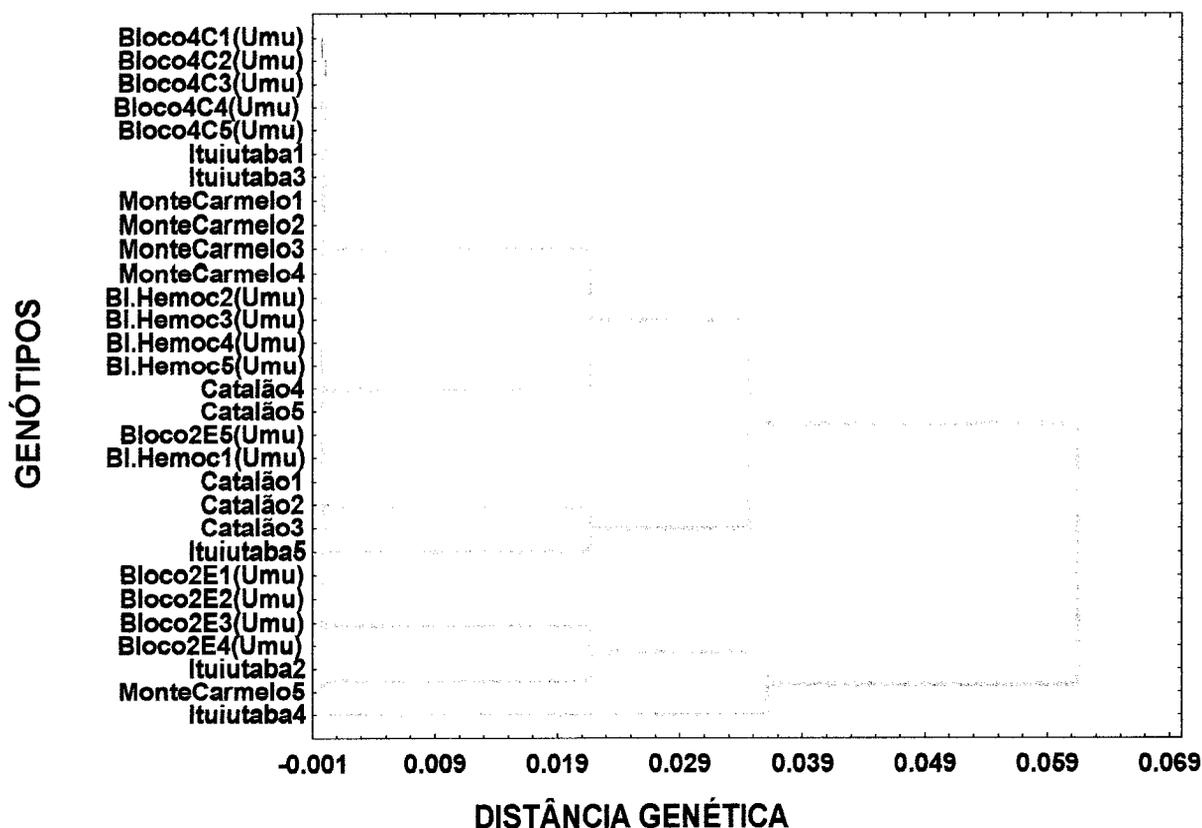


FIGURA 1: Dendrograma da divergência genética entre 30 indivíduos de seis colônias de *T. hyalinata* coletados em Outubro de 1998 (indivíduos dos Blocos 2E, 4C e Hemocentro) e em Março de 1999 (indivíduos de Catalão, Ituiutaba e Monte Carmelo) apoiada em 46 marcadores RAPD.

Um exemplo do padrão de amplificação com o “primer” OPV01, obtido entre os 30 indivíduos (análise entre as seis colônias) é observado na Figura 2. Pode-se visualizar uma banda polimórfica, presente para as colônias dos Blocos 2E e Hemocentro (Uberlândia) e Catalão. As outras posições de bandas analisadas foram monomórficas para todos os indivíduos.

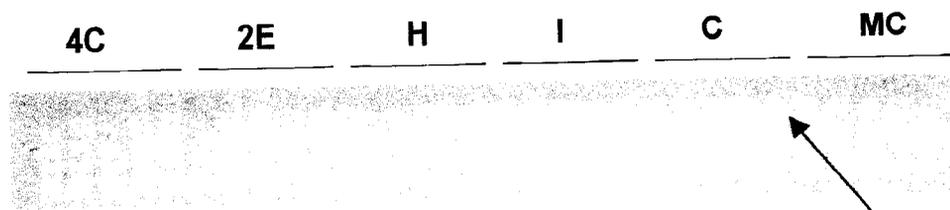


FIGURA 2: Eletroforese em gel de agarose (1.2%) dos produtos amplificados obtidos com o “primer” OPV01. 4C – Bloco 4C, 2E – Bloco 2E, H – Hemocentro, todas de Uberlândia. I – Ituiutaba, C – Catalão e MC – Monte Carmelo. A seta indica uma posição de banda polimórfica para as colônias 2E, H e Catalão.

A análise da distância genética entre os indivíduos de mesma colônias (Figura 3) por meio dos mesmos oito “primers” usados na análise anterior forneceu 58 locos, que produziram uma dissimilaridade genética máxima de 0,0827. Neste valor foram encontrados dois grupos, um com 13 indivíduos e outro com dois. Ao se comparar a divergência máxima encontrada nesta análise com o valor máximo (0,0614) da análise entre as colônias, observa-se que este foi maior. Isto pode ser devido à dois fatores:

- 1) A fotografia do gel com os 15 indivíduos é mais ampliada do que a do gel com os 30 indivíduos, favorecendo a melhor resolução da posição das bandas mais discretas. Isto pode ter influenciado na escolha de um número maior de posição de bandas para a análise da distância genética entre indivíduos da colônia.
- 2) Na análise da divergência dentro da colônia, utilizou-se um maior número de indivíduos, isto também pode ter contribuído para o aumento observado de distância genética, visto que com uma amostragem maior

por colônias, aumentou-se a probabilidade de se mapear locos polimórficos.

Esta relação pode ser observada na Figura 4. Ao se fracionar o número de genótipos aleatoriamente para cinco e 10 indivíduos, obteve-se 0,0775 e 0,0819 de distância genética, respectivamente.

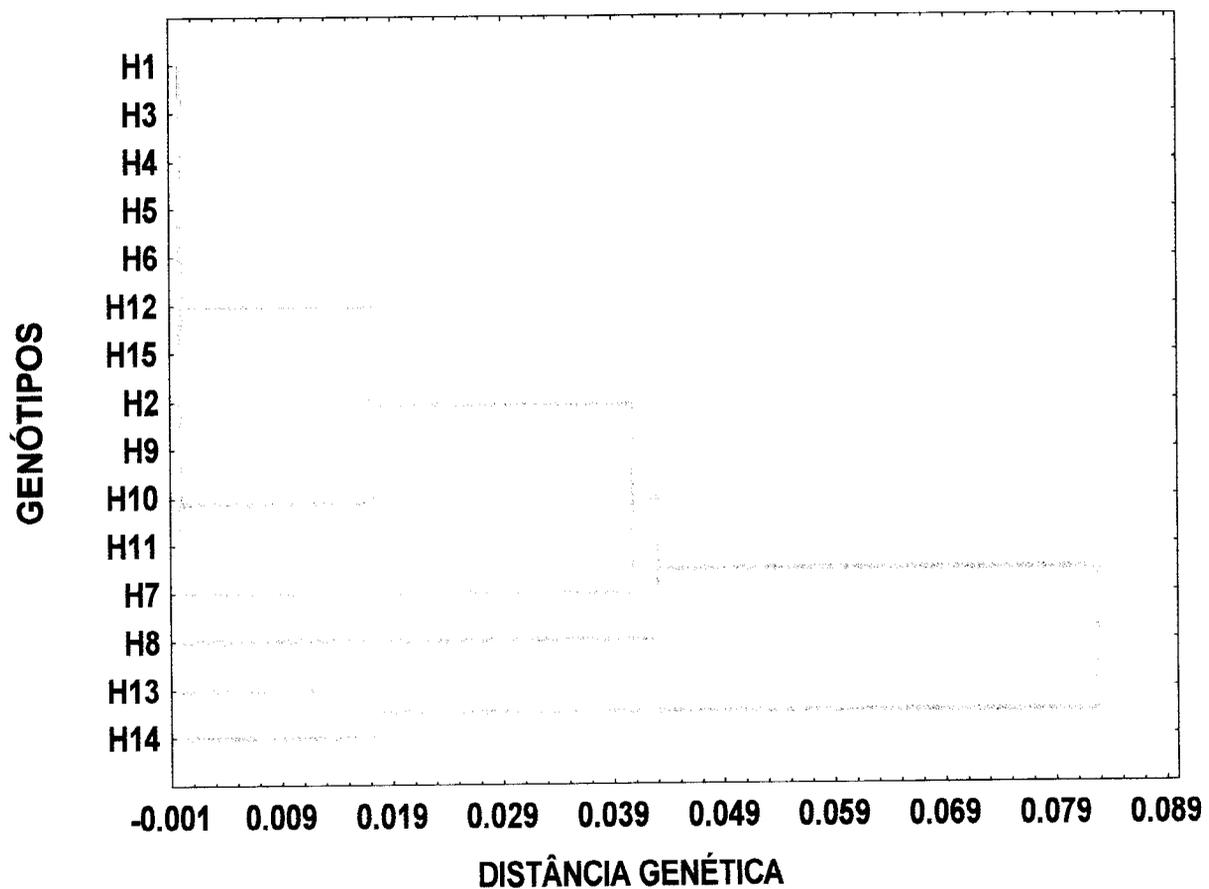
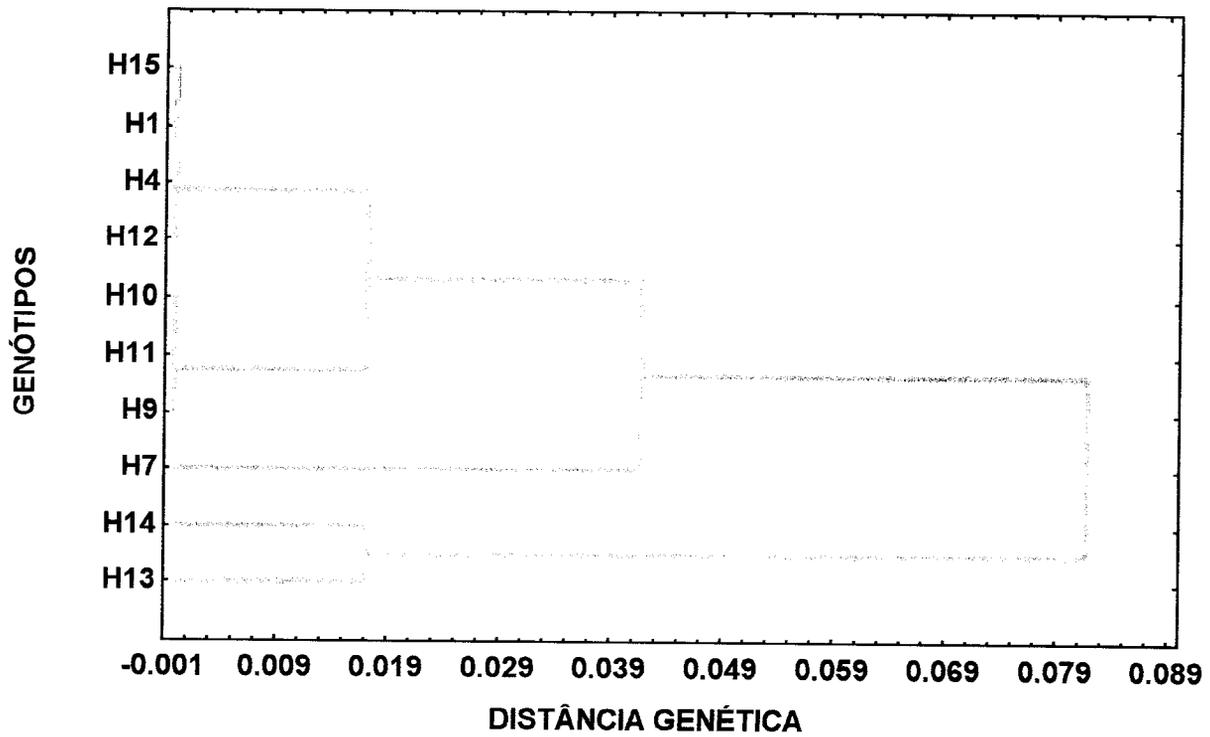
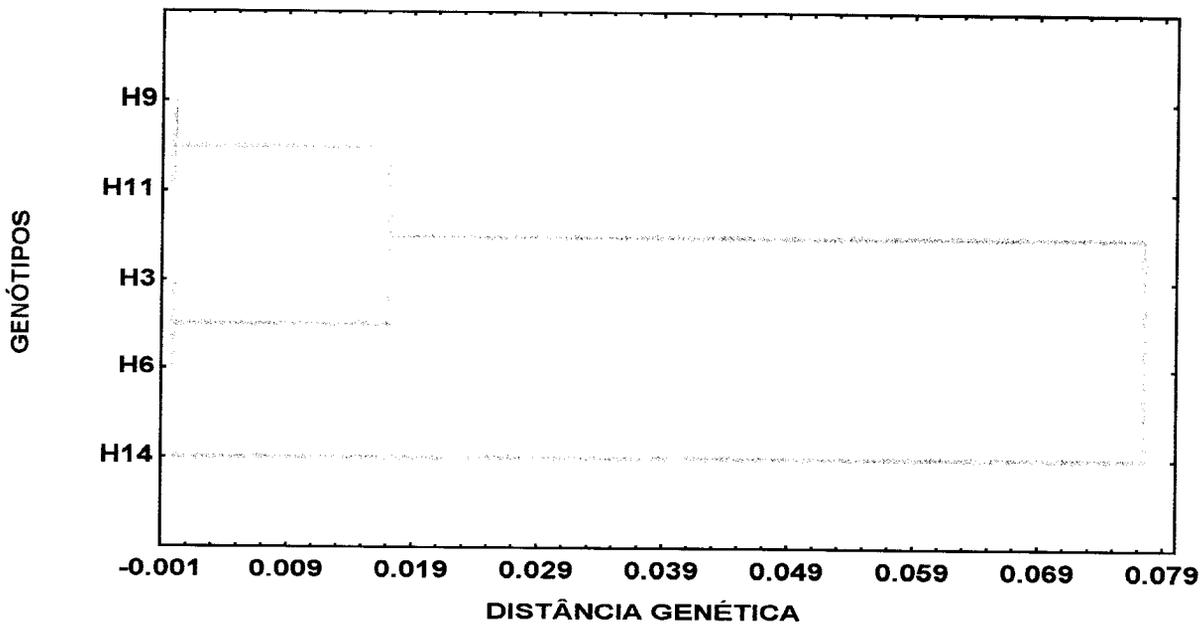


FIGURA 3: Dendrograma da divergência genética entre 15 indivíduos da colônia do Hemocentro de *T. hyalinata* coletados em Outubro de 1999, apoiado em 58 marcadores RAPD.



A



B

FIGURA 4: Dendrograma da divergência genética entre 10 (A) e cinco (B) indivíduos de *T. hyalinata* escolhidos ao acaso dentre os 15 indivíduos analisados anteriormente.

A correlação (Figura 5) foi positiva, sendo que o maior valor de incremento de distância obtido, de cinco para 10 genótipos, foi de 0,004 (80% da distância genética total), enquanto que, de 10 para 15 indivíduos foi apenas de 0,001 (20% restante). Pôde-se observar que a inclinação da reta diminuiu ao se utilizar mais de 10 indivíduos na análise. Se tivessem sido acrescentados mais indivíduos (acima de 20) neste experimento, talvez fosse obtido a estabilização da reta e conseqüentemente, o número adequado de indivíduos a serem analisados, a fim de se mapear a distância genética “real” dentro da colônia. Mesmo assim, vale ressaltar que, a partir de 10 indivíduos, os valores de distância não se alteraram significativamente, indicando, assim, um número mínimo a ser amostrado sem perder a confiabilidade dos dados e, simultaneamente, sem dispendir material biológico e dinheiro com trabalhos futuros a serem desenvolvidos com essa espécie.

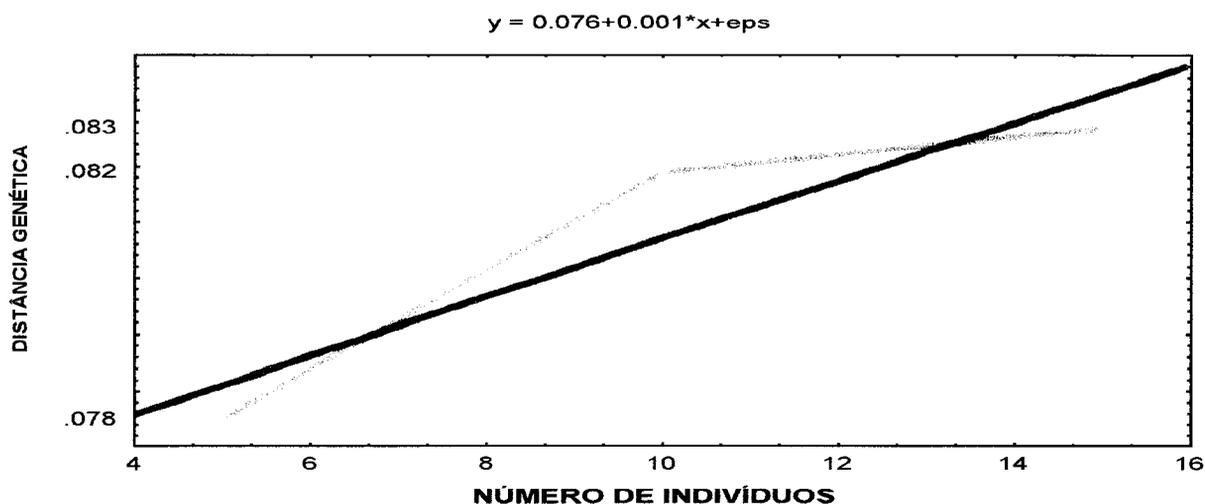


FIGURA 5: Correlação entre a distância genética obtida por UPGMA e número de indivíduos da colônia de *T. hyalinata* (Hemocentro) coletados em Outubro de 1999, com base em 58 marcadores RAPD.

Estes experimentos deverão ser reforçados com análise de um maior número de indivíduos dentro da colônia, maior número de colônias e “primers”.

A análise da divergência genética de indivíduos de mesma colônias (Hemocentro) por meio de “bulks” com três, cinco, 10 e 15 indivíduos forneceram 51 bandas, não demonstrando dissimilaridade genética com o aumento do número de indivíduos amostrados. Estes resultados não são condizentes com os dados obtidos por meio de análise de DNA extraído individualmente. Era esperado que, com o aumento do número de indivíduos, o número de posição de bandas polimórficas aumentaria. Isto não foi verificado (Figura 6). Existem relatos na literatura que polimorfismos resultantes de “bulks” podem ser devido à formação de “heteroduplex”, são os chamados “falsos-polimorfismos” que não aparecem nas análises individuais, tornando pouco confiável a utilização de “bulks” para testes de divergência genética (HUNT & PAGE, 1992; KHANDKA *et al.*, 1997). Se existem estes polimorfismos no experimento dos “bulks”, não foi possível detectá-los, porque não foram utilizadas amostras de DNA extraídas individualmente no mesmo conjunto de reações para serem comparadas.

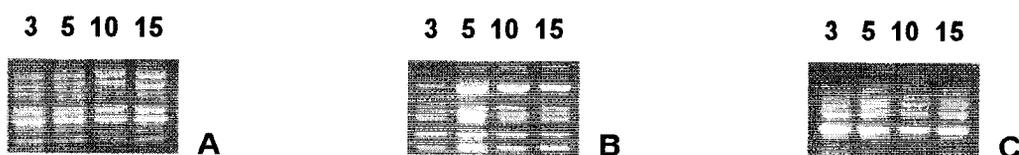


FIGURA 6: Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos produtos amplificados obtidos com os “primers” OPV1 (A), MAU101 (B) e OPV10 (C), a partir de “bulks” de três (3), cinco (5), 10 (dez) e 15 (quinze) indivíduos.

5) CONCLUSÕES

- ↪ O método de extração de DNA para *T. hyalinata* foi eficiente, fornecendo DNA de boa qualidade com alta quantidade.
- ↪ Na análise de divergência genética entre as colônias (Blocos 4C, 2E e Hemocentro) – Uberlândia (MG) e de Monte Carmelo (MG), Ituiutaba (MG) e Catalão (GO), por meio de oito “primers” (46 posições de bandas), houve a formação de dois grupos à 0,0614 de dissimilaridade. Na mesma análise houve a formação de cinco grupos que não apresentaram divergência genética, embora quatro destes mesmos apresentaram indivíduos de colônias diferentes. Isto pode ter sido devido à presença de múltiplas rainhas fisogástricas, rainha fecundada por múltiplos zangões e/ou baixo número de “primers” utilizados no experimento.
- ↪ Na análise de divergência dentro da colônia do Hemocentro por meio dos mesmos “primers” anteriores (58 posições de bandas), a divergência máxima foi de 0,0827 para os 15 indivíduos analisados. Este valor, superior à análise de divergência máxima obtida entre as colônias (0,0614), pode ter sido devido ao maior número de indivíduos utilizados na análise que proporcionou uma maior probabilidade de se mapear locos polimórficos e/ou um artefato de fotografia, que possibilita fotos de géis com melhor resolução do que as obtidas de géis com maior quantidade de reações.

- ↳ Com o fracionamento para cinco e 10, dos 15 indivíduos analisados, obteve-se um maior incremento de divergência na classe um (cinco para 10 indivíduos) correspondendo à 80% da dissimilaridade genética total do que o encontrado para a classe dois (dez para 15 indivíduos) que contribuíram apenas com os 20% restantes. A correlação foi positiva entre divergência genética e número de indivíduos analisados.

- ↳ A análise da divergência de indivíduos de mesma colônia (Hemocentro) por meio de “bulks” contendo três, cinco, 10 e 15 indivíduos com os mesmos “primers” (51 posições de bandas) não demonstrou dissimilaridade genética com o aumento do número de indivíduos utilizados. Isto pode ter ocorrido devido à formação de bandas “heteroduplex”, as quais já foram relatadas por outros autores.

- ↳ Estes experimentos permitiram inferir que a extração de DNA individual foi mais eficiente do que a extração de “bulks”, sendo que o número mínimo de indivíduos necessários para a análise de divergência genética dentro de colônias por RAPD em *T. hyalinata* foi de 10 indivíduos.

- ↳ Repetições dos experimentos são necessários para a espécie estudada, bem como para outras espécies de Meliponínios, a fim de tentar se obter o número mínimo de indivíduos por colônia adequado aos estudos de RAPD.

6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALSINA, A.R. & MICHENER, C.D. (1993). Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). **The University of Kansas Science Bulletin** 55 (4-5): 123-173.
- AMARAL, E. (1953). **Estudos apícolas em Leguminosas**. Tese de Doutorado – ESALQ/USP, 60p.
- AMARAL, E. (1955). As abelhas irapuás e a polinização de *Crotalaria juncea* L. **Suplemento Agrícola do Jornal “Estado de São Paulo”**, 36: 14.
- CAMARGO, J.M.F. & STORT, A. C.(1973). **A Abelha**. Ed.Edart, p.14.
- CHALMERS, K.J.; WAUGH, R.; SPRENT, J.I.; SIMONS, A.J. & POWELL, W. (1992). Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. **Heredity**, 69: 465-472.
- FALCÃO, T.M.M.A. & CONTEL, E.P.B. (1991). Genetic variability in natural populations of Brazilian social bees: I Electrophoretic data for PGM and MDH give evidence for multiple fertilizations in stingless bees. **Rev. Bras. Genet.** 14: 47-59.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. (1996). **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Embrapa, 2ª edição, p.38-53.
- FUTUYMA, D.J. 1992. **Biologia Evolutiva**. Trad. Mario de Vivo e Coord. de Fábio de Melo Sene. 2ª ed. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 646p.
- HAYMER, D.S. & MCINNIS, D.O. (1994). Resolution of populations of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. **Genome** 37: 244-248.

- HOWELL, E.C.; NEWBURY, H.J.; SWENNEN, R.L.; WITHERS, L.A & FORD-LLOYD, B.V. (1994). The use of RAPD for identifying and classifying *Musa* germplasm. **Genome** **37**: 328-332.
- HUNT, G.J. & PAGE, R.E.J. (1992). Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. **Theoretical and Applied Genetics**: 1-7.
- KAMBHAMPATI, S.; BLACK IV, W.C.; RAI, K.S. (1992). Random amplified polymorphic DNA of *Mosquito* species and populations (Diptera, Culicidae): Techniques, Statistical analysis and applications. **Entomological Society of America**, **29(6)**: 939-945.
- KAZAN, K.; MANNERS, J.M. & CAMERON, D.F. (1993). Genetic relationships and variation in the *Stylosanthes guianensis* species complex assessed by random amplified polymorphic DNA. **Genome**, **36**: 43-49.
- KERR, W.E. & ESCH, H. (1965). Comunicação entre as abelhas sociais brasileiras e sua contribuição para o entendimento da sua evolução. **Ciência e Cultura** **17(4)**: 529-538.
- KERR, W.E. (1949). Algumas comparações entre a abelha européia *Apis mellifera* L. e as abelhas nativas brasileiras (Meliponini). **O solo** **41(16)**: 39-47.
- KERR, W.E. (1981). **Bee Genetics in Brazil**. U.C. Apiaries Univ. California, Aug/Sept., 3-6.
- KERR, W.E. (1996). **Biologia e manejo da tíuba: a abelha do Maranhão**. São Luís: EDUFMA, 156 p.
- KERR, W.E.; BLUM, M. & FALES, H.M. (1980). Communication of food source between workers of *Trigona (Trigona) spinipes*. **Rev. Bras. Biologia**, **41(3)**: 619-623.
- KERR, W.E.; CARVALHO, G.A. & NASCIMENTO, V.A. (1996). **Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação**. Ed. Fundação Acangaú, p. 14-18.

- KESSELI, R.V.; PARAN, I. & MICHELMORE, R.W.(1992). Efficient mapping of specifically targeted genomic regions and the tagging of these regions with reliable PCR-based genetic markers. **Applications of RAPD Technology to plant breeding**, Minneapolis, p.31-36.
- KHANDKA, D. K.; TUNA, M.; TAL, M.; NEJIDAT, A & GOLDBIRSH, A G. (1997). Variability in the pattern of random amplified polymorphic DNA. **Electrophoresis 18**: 2852-2856.
- LANDIM, C da C. (1963). Contribuição ao estudo da evolução das abelhas (Hymenoptera, Apoidea). **Ciência e Cultura 15(3)**: 202-203.
- LANDRY, B.S.; DEXTRAZE, L. & BOIVIN, G. (1993). 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 36** : 580-587.
- LU, R. & RANK, G. H. (1996). Use of RAPD analyses to estimate population genetic parameters in the alfalfa leaf-cutting bee, *Megachile rotundata*. **Genome 39**:655-663.
- MELLO, M.L.S. & KERR, W.E. (1984). Histochemistry of salivary gland and Malpighian tubule secretions contributing to the cocoon in *Plebeia droryana* and *Scaptotrigona postica*. **Zoologische Anzeiger, 213 (3-4)**: 177-189.
- MEUNIER, J.R. & GRIMONT, P.A.D. (1993). Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Res. Microbiol. 144**: 373-379.
- MICHENER, C.D. (1990). Classification of the Apidae (Hymenoptera). **The University of Kansas Science Bulletin. 54 (4)**: 164p.
- OLIVEIRA, R.C. (1998). **Divergência genética por marcadores RAPD em *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Tese de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia. 50p.

- PARAN, I; KESSELI, R. & MICHELMORE, R. (1991). Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. **Genome** **34**:1021-1027.
- PEDRO, S.R.M. & CAMARGO, J.M.F. (1991). Interactions on floral resources between the Africanized honey bee *Apis mellifera* L. and the native bee community (Hymenoptera: Apoidea) in a natural "cerrado" ecosystem in southeast Brazil. **Apidologie** **22**: 397-415.
- PEDRO, S.R.M. (1992). **Sobre as abelhas (Hymenoptera, Apoidea) em um ecossistema de cerrado (Cajuru, NE do estado de São Paulo): composição, fenologia e visita às flores.** Tese de Mestrado, USP – Ribeirão Preto, 200p.
- PUTERKA, G.J.; BLACK IV, W.C.; STEINER, W.M. & BURTON, R.L.. (1993). Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. **Heredity** **70**: 604-618.
- SAKAGAMI, S.F. & ZUCCHI, R. (1966). Estudo comparativo do comportamento de várias espécies de abelhas sem ferrão, com especial referência ao processo de aprovisionamento e postura das células. **Ciência e Cultura** **18(3)**: 283-296.
- SCHIERWATER, B. & ENDER, A. (1993). Different thermostable DNA polymerase may amplify different RAPD products. **Nucleic Acids Research** **21(19)**: 4647-4648.
- SCHWARZ, H.F. (1948). Stingless bees (Meliponidae) of the western hemisphere. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, **90**: 546p.
- SHEPPARD, W.S., STECK, G.J. & McPHERON; B.A.. (1992). **Experiment** **48**: 1010-1013.
- SKROCH, P.; TIVANG, J. & NIENHUIS, J. (1992). Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. **Applications of RAPD Technology to plant breeding**, Minneapolis, p. 26-30.

- STILES, J.I.; LEMME, C.; SONDUR, S.; MORSHIDI, M.B. & MANSHARDT, R. (1993). Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. **Theoretical and Applied Genetics** **85**: 697-701.
- TABERNER, A.; DOPAZO, J. & CASTAÑERA, P. (1997). Genetic characterization of populations of a de novo arisen sugar beet pest, *Aubeonymus mariaefranciscae* (Coleoptera, Curculionidae), by RAPD analysis. **Jor. Mol. Evol.** **45**: 24-31.
- THORMANN, C.E. & OSBORN, T.C. (1992). Use of RAPD AND RFLP markers for germplasm evaluation. **Applications of RAPD Technology to plant breeding**, Minneapolis, p. 9-11.
- TINGEY, S.V.; RAFALSKI, J.A & WILLIAMS, J.G.K. (1992). Genetic Analysis with RAPD markers. **Applications of RAPD Technology to plant breeding**, Minneapolis, p. 3-8.
- WEEDEN, N.F.; TIMMERMAN, G.M.; HEMMAT, M.; KNEEN, B.E. & LODHI, M.A.(1992). Inheritance and reliability of RAPD markers. **Applications of RAPD Technology to plant breeding**, Minneapolis, p. 12-17.
- WILKIE, S.E.; ISAAC, P.G. & SLATER, R.J. (1993). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. **Theor. Appl. Genet.** **86**: 497-504.
- WILLIAMS, J.G.; KUBELIK,A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A & TINGEY, S.V. (1990). DNA polymorphism Amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.** **18**: 6531-6535.
- WILLIAMS, J.G.K.; HANAFEY, M.K.; RAFALSKI, J.A & TINGEY, S.V. (1992). Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in enzymology**, **218**: 704-740.