

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE
DUAS POPULAÇÕES DE *Melipona*
scutellaris (HYMENOPTERA, APIDAE,
MELIPONINI) POR MARCADORES
RAPD

Ana Paula Soraggi Campos

Warwick Estevam Kerr

DIRBI/UFU



1000191272

UBERLÂNDIA - MG
FEVEREIRO - 2000

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

M.D.W.
595.799-115
C198d
TES/MEM
1

DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE
DUAS POPULAÇÕES DE *Melipona*
scutellaris (HYMENOPTERA, APIDAE,
MELIPONINI) POR MARCADORES
RAPD

Ana Paula Soraggi Campos

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, para a obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica.

UBERLÂNDIA – MG
FEVEREIRO - 2000

22146

Campos, Ana Paula Soraggi, 1975 -
"Divergência Genética entre duas populações de *Melipona scutellatrix*
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por marcadores RAPD."
- Uberlândia: 2000
63,1
Warwick Estevam Kerr
Tese de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia. Coordenação de
Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui Bibliografia
1. *Melipona scutellatrix* - Teses. 2. Divergência genética - Teses. 3. RAPD - Teses.
I. Universidade Federal de Uberlândia. Coordenação de Pós-Graduação e
Genética e Bioquímica.
CDU 581.169

DEDICATÓRIA

Aos **meus pais**, Maria José e José Luiz que sempre serão eternas referências de perseverança e humildade.

À **minha avó**, Maria que sempre representará um recanto de proteção e aconchego em minha vida.

Aos **meus irmãos**, Rafael e Thiago que com pequenos gestos me ensinam grandes coisas.

E à você, Zé, que participou mais diretamente de mais esse passo em minha vida.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade de ter acesso ao mundo científico, e de conviver com pessoas ilustres que muito auxiliaram no meu amadurecimento espiritual.

Ao **Prof. D. Warwick Estevam Kerr**, exemplo de vida científica e humanitária, pela orientação, confiança e amizade.

Aos **Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho** pela disponibilidade e valiosas sugestões na elaboração deste trabalho como co-orientador.

À **Profa. Dra. Ana Maria Waldschmidt** pela gentileza de aceitar o convite de participar de minha banca examinadora e pelas sugestões apresentadas.

À **Profa. Dra. Ana Maria Bonetti** responsável pela minha introdução no mundo das abelhas, pela amizade e sugestões.

À **Prof. Dra. Cecília Lomônaco de Paula** pela disponibilidade de me atender gentilmente em sua sala, dando grandes sugestões neste trabalho.

À todos os professores de Departamento de Genética e Bioquímica pelos ensinamentos que muito auxiliaram na minha formação acadêmica.

Às amigas, **Gislene Almeida Carvalho, Rosana de Cássia Oliveira, Soraya Matos Vasconcelos e Vania Alves Nascimento** pela constante força, companheirismo e acompanhamento brilhante neste trabalho. Além do grande carinho e "puxões de orelhas" nas horas certas, que foram essenciais para a elevação da minha auto-estima.

À todos os colegas e funcionários do Laboratório de Genética e do Laboratório de Genética Molecular pelo excelente convívio, que direta ou indiretamente, proporcionaram momentos representativos para o meu crescimento pessoal e profissional.

Meus agradecimentos aos meliponicultores, **Sr. José Carlos Moraes** e ao Engenheiro Agrônomo **Rogério Marcos Oliveira** pela ótima

receptividade em suas cidades e pela valiosa disponibilidade de nos fornecer as amostras de uruçú relativas à Bahia, sem as quais esse trabalho não poderia ser realizado.

Ao meu marido **José Maria** pelo amor, paciência e apoio nas horas difíceis. Pelo constante incentivo para continuar seguindo em frente. Pela inenarrável forma de me suportar nas horas de agonia. Pelo excelente convívio no dia a dia, que muito me faz crescer pessoalmente e espiritualmente.

À **Minha Família**, que apesar da distância e das horas de ausência, sempre me apoiaram em todas as decisões que tomei na vida, tanto no sentido profissional como pessoal.

Ao **CNPq** e a **Universidade Federal de Uberlândia** pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| ÍNDICE | VI |
| LISTA DE TABELAS | VII |
| LISTA DE FIGURAS | VIII |
| LISTA DE ABREVIATURAS | IX |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ABELHAS | 10 |
| 1.2. A ESPÉCIE <i>MELIPONA SCUTELLARIS</i> | 11 |
| 1.3. O USO DE DADOS MOLECULARES EM ESTUDOS DE POPULAÇÕES | 14 |
| 1.3.1. <i>RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)</i> | 16 |
| 1.3.2. <i>RAPD em Populações de Insetos</i> | 20 |
| 1.4. OBJETIVO E JUSTIFICATIVAS | 25 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 26 |
| 2.1. MATERIAL BIOLÓGICO | 26 |
| 2.2. ANÁLISE MOLECULAR..... | 28 |
| 2.2.1. <i>Extração do DNA genômico</i> | 28 |
| 2.2.2. <i>Quantificação do DNA genômico</i> | 30 |
| 2.2.3. <i>Amplificação com primers aleatórios</i> | 30 |
| 2.2.4. <i>Separação e Visualização dos produtos amplificados</i> | 32 |
| 2.2.5. <i>Análise dos dados</i> | 32 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 33 |
| 3.1. OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES UTILIZADAS..... | 33 |
| 3.2. ANÁLISE DOS PADRÕES DE AMPLIFICAÇÃO COM <i>PRIMERS</i> ALEATÓRIOS..... | 34 |
| 4. CONCLUSÕES..... | 44 |
| RESUMO | 46 |
| SUMMARY | 47 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 48 |
| ÍNDICE REMISSIVO | 57 |

LISTA DE TABELAS

| Tabela | Página |
|--|--------|
| 1 Origem das amostras de <i>Melipona scutellaris</i> | 24 |
| 2 Lista dos <i>primers</i> utilizados para amplificar o DNA das 14 amostras de <i>Melipona scutellaris</i> e suas respectivas seqüências de nucleotídeos..... | 29 |
| 3 Relação do número de posições de bandas monomórficas e polimórficas por <i>primer</i> selecionado..... | 33 |
| 4 Matriz das distâncias genéticas expressas em porcentagem de desacordo, obtida para os 14 genótipos de <i>Melipona scutellaris</i> , por meio de 136 posições de bandas RAPD..... | 34 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Vista interna de ninho de <i>Melipona scutellaris</i> | 22 |
| 2 | Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e agrupamento pelo método de UPGMA, entre os 14 genótipos de <i>Melipona scutellaris</i> , por meio de 136 posições de bandas RAPD..... | 36 |
| 3 | Padrão de amplificação de fragmentos de DNA (RAPDs) obtidos com o <i>primer</i> OPM 15, para os 14 genótipos de <i>Melipona scutellaris</i> , analisados por eletroforese em gel de agarose 1.2%. M-Marcador de peso molecular de DNA, 1-MG-322, 2-MG-335, 3-MG-441, 4-MG-445, 5-MG-480, 6-MG-519, 7-MG-533, 8-BA-32, 9-BA-33, 10-BA-34, 11-BA-35, 12-BA-36, 13-BA-38 E 14-BA-39. A seta indica o marcador OPM15.38Kb para a população de Uberlândia, MG..... | 39 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| ABS | absorbância |
| °C | graus Celsius |
| cm | centímetros |
| cM | centimorgans |
| DNA | ácido desoxirribonucléico |
| DNTP | desoxirribonucleotídeos |
| EDTA | ácido etilenodiaminotetra acético sal dissódico |
| g | grama (s) |
| h | hora (s) |
| HCl | ácido clorídrico |
| Kb | quilobases |
| M | molar |
| mA | miliampere (s) |
| mg | miligrama (s) |
| MgCl ₂ | cloreto de magnésio |
| ml | mililitro (s) |
| mm | milímetro (s) |
| mM | milimolar |
| min. | minuto (s) |
| h | haplóide |
| NaCl | cloreto de sódio |
| ng | nanograma (s) |
| nm | nanômetro (s) |
| pb | pares de base |
| pH | potencial hidrogeniônico |
| pmoles | pico-moles |
| rpm | rotações por minuto |
| RNA | ácido ribonucléico |
| SDS | lauril sulfato de sódio |
| Tris | tris (hidróxido metil amino metano) |
| UV | ultra-violeta |
| V | volts |
| µg | micrograma |
| µl | microlitro (s) |
| 2n | diplóide |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais sobre Abelhas

No reino Animalia, o filo Arthropoda têm cerca de 34.000.000 de espécies, das quais 80% pertencem à classe Insecta, sendo portanto, o grupo com maior número de indivíduos, superando todos os outros grupos animais reunidos (ADIS, 1990). A classe Insecta divide-se em várias ordens. Uma delas são os Hymenoptera que compreendem as formigas, vespas e abelhas. As abelhas podem ser reunidas na superfamília Apoidea, com 10 famílias, que se destacam por exibirem grande diversidade de habitats e uma alta complexidade de comportamentos, culminando em uma alta organização social. A família Apidae subdivide-se em 3 subfamílias: Xylocopinae, Nomadinae e Apinae. Dentre os Apinae, encontramos as tribos corbiculadas: Apini, Meliponini, Bombini e Euglossini (ROIG-ALSINA & MICHENER, 1993). As três primeiras estão num estágio social avançado. A grande maioria das outras Apoidea são abelhas solitárias ou de hábitos sociais primitivos (NOGUEIRA-NETO, 1997).

A origem das abelhas do globo é relativamente recente e está relacionada com o aparecimento das Angiospermas (MULLER 1972, 1981 *apud* CRUZ, 1960). Os primeiros fósseis conhecidos de himenópteros datam do carbonífero inferior, mas as abelhas só apareceram muito mais tarde, há cerca de 150 milhões de anos atrás, no Cretáceo (CRUZ, 1960).

As abelhas da tribo Meliponini, também conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão, em geral, são distinguíveis das outras, principalmente pela atrofia do ferrão, redução e fragilidade da venação alar e por não possuírem pêlos nos olhos (MOURE, 1961; SAKAGAMI, 1982; WILLE, 1983; CAMARGO, 1989; MICHENER, 1990).

Ao longo de sua história evolutiva, os Meliponínios conquistaram vários habitats, ocupando grande parte da região de clima tropical e algumas importantes regiões de clima temperado subtropical (NOGUEIRA-NETO, 1997). Contudo, sua maior diversidade e abundância de formas encontra-se nos trópicos (região Neotropical e Indo-Malaia) apesar de certos taxa estarem restritos às zonas subtropicais do

hemisfério sul (MOURE, 1961; KERR & MAULE, 1964; CAMARGO, 1989; MICHENER, 1990; CAMARGO E PEDRO, 1992).

A importância dessas abelhas reside no fato de apresentarem uma grande associação com plantas e outros animais, inclusive o homem. São consideradas as mais eficientes polinizadoras da flora americana, polinizando até 90% das espécies de plantas nativas (KERR *et al.*, 1996). ABSY *et al.* (1984) mostraram que 8% das árvores do médio Amazonas são polinizadas por no mínimo 5 espécies de abelhas. Todavia, nessa mesma amostra, 5 árvores são polinizadas por apenas 1 espécie de abelha. Assim, a extinção dessas abelhas pode resultar na possibilidade de extinção de espécies vegetais e conseqüente desequilíbrio no ecossistema (ROUBIK, 1989).

O entendimento dos aspectos biológicos, que compreendem os mecanismos de reprodução das abelhas nativas, está associado a todos os esforços que estão sendo executados, nos últimos 50 anos, para a possível manutenção de algumas espécies geograficamente mais próximas do homem (AIDAR, 1999).

1.2. A espécie *Melipona scutellaris*

A espécie *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 pertence à tribo Meliponini, subfamília Apinae, família Apidae (ROIG-ALSINA & MICHENER, 1993). A subfamília Apinae engloba as abelhas indígenas sem ferrão, das quais, muitas são conhecidas como “uruçu”, que na língua tupi significa “abelha grande”. Muitas outras espécies desse grupo foram domesticadas pelos índios, sendo atualmente descritas mais de 300 espécies, com cerca de 54 gêneros que se distribuem em toda a Região Neotropical (CAMARGO & PEDRO, 1992).

A abelha *Melipona scutellaris* é basicamente conhecida como “uruçu do Nordeste” devido à sua distribuição geográfica alcançar desde a Bahia até o Estado do Rio Grande do Norte, ocupando principalmente o Bioma chamado de Zona da Mata (CARVALHO, 1996).

As abelhas sem ferrão, em seu ambiente natural, têm dificuldades de achar um lugar para seu novo enxame. A grande maioria usa ocos de árvores, em diferentes alturas. KERR *et al.* (1996) encontraram colônias de *M. scutellaris* (uruçu do Nordeste) e *M. rufiventris* (uruçu amarela) ocupando ocos de árvores a 40m de altura. Os ninhos

são construídos basicamente de cera pura ou cerume, que é uma mistura de cera, própolis e barro. Batume é a denominação para a mistura de própolis e barro e é geralmente usada na delimitação da morada. A maior parte dos Meliponínios faz reserva de cera, que é armazenada nas bordas dos favos de cria ou sobre o invólucro em pequenas bolinhas, formando pequenos montes próximas à entrada do ninho. Dentro dos ninhos, os favos de cria são dispostos na forma de placas horizontais, cujas células ou alvéolos se abrem para cima. Estas placas se sobrepõem e são separadas por pilastras de cera, permitindo a passagem das abelhas entre as placas. O mel e o pólen são armazenados em potes de cera ovais, com volume variável (MARIANNO FILHO, 1911).

Os Hymenoptera constituem a 3ª maior ordem de insetos. Grande parte de suas peculiaridades, inclusive sua maior freqüência de espécies com vida social, é devida ao seu sistema de determinação de sexo (KERR *et al.*, 1978). O sistema genético usado por essas abelhas, denomina-se haplo-diploidia, em que as fêmeas originam-se de ovos fecundados, sendo diplóides e os machos originam-se de ovos não fecundados, sendo haplóides. Este tipo de sistema genético denomina-se partenogênese arrenótoca (DZIERZON, 1845). KERR *et al.* (1978) sugerem que a determinação de sexo nas abelhas ocorre em duas fases: a primeira fase ocorre poucas horas após a postura e a segunda, no final da fase de pré-pupa, anteriormente à desenvolvimento de todos os discos imaginais. Existe um equilíbrio entre os genes reguladores, que atuam sobre um conjunto de genes aditivos (não compensados) determinadores do sexo feminino e sobre os genes parcialmente não aditivos ou não aditivos (compensados), determinadores da masculinidade. Esse balanceamento gênico para determinação do sexo é um mecanismo geral que explica a definição do sexo por arrenotoquia. O *locus xo* é o principal responsável pela determinação do sexo nas abelhas.

A determinação de castas nos Meliponínios se dá pelo sistema "genético alimentar". KERR (1975) propôs uma explicação molecular deste mecanismo, mostrando que este processo seria em consequência da combinação dos alelos dos genes determinantes de casta : xa e xb . Cada um desses genes possui dois alelos : xa^1 , xa^2 , xb^1 , xb^2 . Assim, as larvas duplo heterozigotas são rainhas e as que possuem homozigose em qualquer um dos dois alelos ou em ambos, são operárias.

Outro aspecto importante da biologia dessas abelhas, que tem muita influência no comportamento de populações isoladas, refere-se ao fato de serem particularmente sensíveis à homozigose dos alelos x_0 . Nesta condição, aparecem machos diplóides (duplo homozigotos para os alelos sexuais) considerados “estéreis”. Em algumas espécies sociais estes machos são eliminados pelas operárias, o que também pode ocorrer com a rainha, podendo ocasionar assim, a morte da colônia. A manutenção de pequenas populações, com menos de 44 colônias da mesma espécie na sua área reprodutiva, promove a diminuição do número dos alelos sexuais x_0 , induzindo a formação desses machos diplóides (KERR & VENCOVSKY, 1982). Em regiões onde o número de colônias é baixo, a espécie pode desaparecer devido à formação da homozigose dos alelos x_0 , e isto ocorre com frequência nas pequenas matas primárias que são conservadas (AIDAR, 1996, 1997).

No Brasil, muitas espécies de Meliponíneos têm sido criadas principalmente para a produção de enxames, mel, pólen, cera e própolis. Contudo, estão sendo seriamente ameaçadas de extinção em consequência de alterações em seus habitats causadas por desmatamentos, uso indiscriminado de agrotóxicos e várias outras ações antrópicas prejudiciais ao meio ambiente. A criação e exploração racional dessas abelhas é uma alternativa que poderá preservar muitas espécies, permitindo a obtenção de seus produtos, sua utilização como polinizadoras e facilitar as pesquisas científicas com as mesmas.

Melipona scutellaris, em seu ambiente natural, está separada por mais de 300Km de distância da área de ocorrência *M. capixaba*. Em Uberlândia, elas foram colocadas no mesmo meliponário, na suposição de que fossem completamente isoladas reprodutivamente (NASCIMENTO, 1996). Contudo, segundo MOURE & CAMARGO (1994) *M. scutellaris* é a espécie, relacionada ao grupo da Amazônia, mais próxima geograficamente da *M. capixaba*. Estas espécies apresentam algumas similaridades, como a estrutura das genitálias, que são praticamente idênticas, mostrando que são evolutivamente muito próximas.

Entre novembro/95 e março/96, foi verificado por NASCIMENTO (1996) uma troca natural de rainha nas colônias de *M. capixaba*. Pela observação morfológica dos descendentes das colônias de *M. capixaba*, detectou-se que eram distintos dos demais e supôs-se a fecundação de uma rainha virgem de *M. capixaba* por machos de *M.*

scutellaris, que ocorriam em maior quantidade. Detectou-se também que os descendentes desta colônia (supostos híbridos) eram capazes de se reproduzirem e originarem descendentes férteis, pois, uma das rainhas virgens, filha da rainha que estava produzindo híbridos, foi fecundada. A confirmação dessa hibridação foi realizada por NASCIMENTO & MATUSITA (1996) e NASCIMENTO *et al.* (1999) comparando o padrão esterásico entre elas.

1.3. O Uso de Dados Moleculares em Estudos de Populações

Até os anos 60, os marcadores utilizados em estudos genéticos eram controlados por genes associados à caracteres morfológicos de fácil identificação visual (OLIVEIRA, 1998).

A utilização da dados moleculares, em diversos estudos, vem sendo feita cada vez com mais freqüência, nos mais diferentes grupos taxonômicos e tem contribuído para avanços consideráveis na genética e sistemática da ordem Hymenoptera (COSTA, 1998). A utilização de marcadores moleculares tem várias vantagens sobre marcadores morfológicos convencionais: os marcadores moleculares exibem neutralidade fenotípica sem influência ambiental, são herdados codominantemente (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) e/ou de forma dominante (RAPD, *Random Amplified Polymorphic DNA*), raramente exibem interações epistáticas ou pleiotrópicas, podendo ser detectados tanto em indivíduos jovens como adultos (TANKSLEY *et al.*, 1989). Outros marcadores como isoenzimas, análises de DNA_{mt}, mini e microsatélites também são amplamente usados em uma grande variedade de estudos de populações.

CONTEL & MESTRINER (1974) foram os primeiros publicar a dados sobre a variabilidade alozímica em Meliponíneos. Eles descreveram o polimorfismo no *locus Est 3* de *Melipona subnitida* e *M. quadrifasciata*. Depois, vários trabalhos surgiram sobre polimorfismos de populações do grupo. CONTEL & MESTRINER (1975) e RESENDE (1997) caracterizaram a atividade esterásica durante o desenvolvimento ontogenético de três espécies de *Melipona*. DEL LAMA & MESTRINER (1984), LIMA & MESTRINER (1985), CURSINO & CONTEL (1991), MACHADO *et al.* (1992), SANTOS (1993), dentre outros, avaliaram padrões proteicos de vários sistemas enzimáticos para diferentes espécies, analisando a variabilidade entre elas.

Análises de proteínas por eletroforese têm sido usadas para detectar variações em insetos mas, alguns grupos de insetos com baixos níveis de variação genética detectáveis, não podem ser estudados a não ser por marcadores mais sensíveis, como os provenientes de análises de DNA (HOY, 1994).

O aspecto físico do DNA também oferece várias vantagens sobre isoenzimas. O DNA é encontrado em todas as células, de todos os organismos e pode ser extraído tanto de tecido vivo, quanto de tecido morto. Além disso, tecidos podem ser facilmente estocados sob várias condições, e em muitos casos apenas poucos nanogramas de DNA são necessários para as análises (quando amplificados por PCR, *Polymerase Chain Reaction*). A molécula é tão estável que pode se manter intacta por milhões de anos (PARKER *et al.*, 1998).

A diversidade genética dentro de populações e espécies é influenciada por uma multiplicidade de fatores, incluindo ciclo de vida, tempo de geração, princípios de dispersão de pólen, proporção geográfica e nicho ecológico. Essas características biológicas poderão ser reconhecidas mais a fundo, em estratégias desenvolvidas pela diversidade quantificada por marcadores de DNA (WILLIAMS *et al.*, 1993). No mais, análises moleculares permitem comparações de seqüências de DNA e produzem dados, que podem ser convertidos para estimar seqüências divergentes.

Na década de 80, um enorme avanço ocorreu na genética quando Kary Mullis desenvolveu a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR torna-a particularmente poderosa para estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

Esta técnica tem sido utilizada em vários estudos de seqüências específicas e aleatórias do DNA. Ela envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento de DNA, na presença da enzima DNA polimerase, dNTPs e magnésio. Esta reação baseia-se no anelamento e extensão enzimática de oligonucleotídeos (*primers*, pequenas moléculas de DNA fita simples) utilizados como iniciadores, que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Estes *primers* são sintetizados artificialmente, de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares às seqüências específicas que flanqueiam a região alvo. Um ciclo de PCR envolve 3 etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA alvo

é desnaturada por meio da elevação da temperatura para 90-94°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35-60°C, dependendo essencialmente do tamanho e seqüência do *primer* utilizado, permitindo a hibridação DNA-DNA de cada *primer* com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 70-72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada extremidade 3' dos *primers*. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência-alvo, de maneira que uma cópia desta seqüência é feita no processo. Este ciclo é repetido algumas dezenas de vezes até que se consiga a quantidade de DNA desejada (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

Com base na PCR, várias outras técnicas foram desenvolvidas para a detecção de polimorfismos de DNA, como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RNA display, VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), dentre outras.

1.3.1. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

A tecnologia de *primers* arbitrários em PCR (AP-PCR), mais comumente conhecida como Amplificação ao Acaso de DNA Polimórfico (RAPD) utiliza um único *primer* específico (WELSH & McCLELLAND, 1990) ou dois *primers* diferentes (WILLIAMS *et al.*, 1990) para produzir uma impressão digital do DNA genômico, via PCR. Nesta reação, os *primers* se associam às regiões homólogas do DNA genômico, em dois sítios diferentes nas fitas opostas do DNA. Nestes dois sítios, dentro de uma distância amplificável, não superior a 4000pb, o produto de DNA é produzido por meio de uma amplificação termocíclica.

A idéia de se utilizar *primers* curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade de conhecimento prévio da seqüência, gerou um grande avanço na área de marcadores moleculares. Além desta vantagem do RAPD, podem ainda ser citadas a necessidade de pequena quantidade de DNA, a não utilização de sondas e eliminação da necessidade de isótopos radioativos. O uso da técnica não requer experiência aprofundada em biologia molecular e nem

tampouco instalações sofisticadas de laboratório, além de ser simples, rápida e de baixo custo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996, WILLIAMS *et al.*, 1993). Outra importante vantagem desta técnica é que ela permite uma "busca" por todo genoma, permitindo a análise de regiões codificadoras e não-codificadoras e de seqüências repetitivas (RAFALSKI & TINGEY, 1993; SCHIERWATER, 1995). Considerando as regiões não-codificadoras e seqüências de DNA repetitivas, variações mais consideráveis podem ser encontradas, como mudanças de seqüências de nucleotídeos. Essas mudanças, teoricamente, tem maiores chances de persistirem no genoma, uma vez que são consideradas mutações nulas. Tais seqüências são consideradas como um reservatório de variação genética. Princípios evolutivos operam diferentemente nestas regiões e em regiões de genes de cópia única, e por isso podem ser mais apropriadas para descrever certos relacionamentos sistemáticos e filogenéticos (HAYMER & McINNIS, 1994).

Contudo, algumas desvantagens também são citadas na literatura. Os fragmentos gerados por RAPD geralmente apresentam de 200 até 2700 pb. O polimorfismo é reconhecido como a presença de um fragmento específico amplificado em um genótipo e não amplificado no outro genótipo. Tais polimorfismos comportam-se como marcadores genéticos dominantes, de forma que não é possível a identificação de heterozigotos (WILLIAMS *et al.*, 1990). Esse baixo conteúdo de informação por *locus*, é sua principal limitação. Outra grande desvantagem é que os padrões gerados são bastantes sensíveis às condições das reações, podendo haver uma baixa repetibilidade nos resultados (quando as condições das reações não são mantidas constantes).

Devido à grandes críticas sobre a falta de repetibilidade no padrão de bandas geradas pelo RAPD, vários autores têm publicado sobre como a fidelidade nas condições das reações é importante para minimizar essa limitação.

MEUNIER & GRIMONT (1993) testaram a repetibilidade de 2 termocicladores e três marcas da enzima *Taq* DNA Polimerase. Utilizando três *primers* e DNA de 3 espécies diferentes de bactérias, eles concluíram que houve diferenças no padrão de amplificação entre enzimas de marcas diferentes, como também entre enzimas com tampões diferentes. Detectaram também diferenças com a mudança da temperatura de anelamento com o mesmo *primer*.

WEEDEN *et al.* (1992) investigaram a herança e confiança dos marcadores RAPD em populações de ervilhas e maçãs. Eles testaram todos os reagentes da reação e verificaram que a menor mudança no fenótipo RAPD foi com 1,5 a 3,0 mM de MgCl₂ e temperatura de anelamento entre 35 e 42°C. Detectaram que o óleo mineral usado nas reações (para evitar a evaporação dos reagentes) quando contaminado, as inibia.

Em um estudo mais recente, KHANDKA *et al.* (1997) usando DNA de 4 espécies diferentes (*Asparagus officinalis*, *Dactylis glomerata*, *Mercurialis annua* e *Escherichia coli*) também examinaram a variabilidade no padrão de amplificação associada aos constituintes da reação. Detectaram que existe uma proporção de DNA e enzima *Taq* polimerase e que um aumento na proporção da enzima em relação ao DNA, aumenta o número de fragmentos amplificados, enquanto que o contrário, reduz esse número. Verificaram também que um aumento na concentração de *primer* resulta na amplificação de fragmentos de menor peso molecular e vice-versa. Avaliaram a manipulação mecânica do DNA (por sonicação) antes da montagem da reação e verificaram uma correlação positiva no grau de degradação do DNA e redução de produtos amplificados. Testaram também digestões do DNA genômico antes das reações e observaram que DNAs digeridos apresentam mais fragmentos amplificados que DNAs não digeridos.

A respeito do DNA, WILLIAMS *et al.* (1993) citam que devido à diferentes métodos de extração oferecerem DNA de pureza e integridade diferentes, torna-se necessário otimizar a quantidade de DNA usada nas reações RAPD para se alcançar uma boa repetibilidade e um forte sinal de amplificação.

Embora o protocolo RAPD seja relativamente simples e rápido, sua aplicação prática para estudos genéticos de populações heterogêneas é ainda limitada nos casos em que grandes números de indivíduos precisam ser examinados. Uma pesquisa que veio minimizar essa limitação foi o uso de *bulks* de amostras de DNA genômico.

Vários autores usaram a metodologia de *bulk ou pools* (conjunto de indivíduos incluídos na mesma amostra) como um método para identificar rapidamente marcadores ligados à qualquer gene específico ou região genômica. MICHELMORE *et al.* (1991) descreveram esse método chamado BSA (*Bulk Segregant Analysis*) como um método rápido de identificar marcadores ligados à qualquer gene específico ou região genômica. Em uma população segregante para uma característica de interesse, indivíduos são

agrupados, baseado na expressão da característica. Em cada *bulk* os indivíduos são idênticos para uma característica particular ou região genômica, mas segregam aleatoriamente para todos os outros genes. Amostras de DNA de cada grupo, são agrupadas separadamente, e os dois *pools* de DNA submetem-se à varredura para polimorfismos RAPD ou RFPL. Marcadores polimórficos entre os dois *bulks* são geneticamente ligados ao *loci* que determina a característica usada para construir os *bulks*.

GIOVANNONI *et al.* (1991) demonstraram a utilidade de se criar *bulks* de DNAs em indivíduos homocigotos, baseado no conhecimento de marcadores RFLPs prévios, usados no mapeamento das populações analisadas.

REITER *et al.* (1992) usou esta estratégia para identificar 100 marcadores RAPD específicos do cromossomo 1 de *Arabidopsis thaliana*. A saturação de mapas genéticos utilizando o *pooling* (agrupamento na mesma amostra de indivíduos semelhantes à uma determinada característica) permitiu focar mais eficientemente regiões específicas do genoma.

KHANDKA *et al.* (1997) testaram a viabilidade do uso de métodos de *bulks* de DNA com marcadores RAPD. Amplificaram DNAs obtidos de um *bulk* de 10 indivíduos e DNAs individuais de machos e fêmeas de *Mercurialis annua*, usando 131 *primers*. Foram encontrados 18 fragmentos polimórficos entre machos e fêmeas, sendo que 16 foram marcadores "falsos positivos". Tais marcadores foram polimórficos entre plantas individuais de ambos os sexos ou estiveram presentes ou ausentes em todos indivíduos. Contudo, foi possível detectar 2 fragmentos polimórficos verdadeiros nesse caso.

A técnica RAPD tem sido utilizada em uma ampla variedade de estudos genéticos. Marcadores RAPD têm sido aplicados em mapeamentos de genes, genética de populações (fluxo gênico, discriminação de espécies e diversidade genética em coleções de germoplasmas) sistemática e taxonomia molecular e marcadores associados à seleção de acasalamentos de plantas e animais (TINGEY *et al.*, 1992; WILLIAMS *et al.*, 1993).

No reino animal o RAPD vem sendo cada vez mais aplicado, principalmente em genética de populações. NAGARAJA & NAGARAJU (1995) diferenciaram genótipos do bicho-da-seda, *Bombyx mori*, com e sem diapausa por meio de marcadores

RAPD que geraram 216 produtos amplificados usando 40 *primers*, baseados na comparação de pareamento dos produtos amplificados, coeficiente de similaridade genética e análise de *cluster* hierárquico.

KRAUS & HUNT (1995) avaliaram espécimes do ácaro, *Varroa jacobsoni*, coletados em colônias de *Apis mellifera* da Califórnia, Texas e Alemanha e espécimes coletados em colônias de *Apis cerana* da Malásia. Encontraram uma porcentagem de bandas monomórficas que indicaram uma baixa variabilidade genética dentro das populações. Contudo, encontraram marcadores específicos entre populações de ácaros coletados em colônias de diferentes espécies de abelhas e entre diferentes estados.

ABADI *et al.* (1996) estimaram a variabilidade genética entre isolados do fungo *Exserohilum turcicum*, patógeno do milho e sorgo, por meio de 20 *primers* RAPD. A maioria dos *primers* detectaram polimorfismos hospedeiro-específico, mas não raça-específicos do fungo.

1.3.2. RAPD em Populações de Insetos

CHAPCO *et al.* (1992) analisaram a similaridade genética entre 7 espécies de gafanhotos de 2 subfamílias (Melanophinae e Oedipodinae) dos Acrididae. Encontraram uma similaridade entre indivíduos da mesma espécie de 51,2%, enquanto que para espécies ou gêneros diferentes encontraram 35%, avaliando o RAPD como satisfatório em análises sobre Sistemática Molecular.

Estudos filogenéticos em populações de insetos por marcadores RAPD têm sido amplamente desenvolvidos devido às facilidades da técnica. KAMBHAMPATI *et al.* (1992) analisaram geneticamente espécies e populações do mosquito *Aedes*, identificando espécies desconhecidas e reconstruindo a filogenia por meio de 2 *primers* aleatórios.

Com a finalidade de caracterizar biotipos de microhimenópteros dos gêneros *Anaphes* e *Trichogramma*, parasitas usados no controle biológico de Lepidópteros, que são pragas de diversas espécies de plantas comerciais, LANDRY *et al.* (1993) selecionaram 13 *primers*, que geraram 57 *loci* polimórficos informativos. Esses *loci* foram usados em análises filogenéticas, em que 3 puderam diferenciar 2 biotipos de *Anaphes sordidatus* e vários outros *loci* identificaram uma nova espécie, *Anaphes* sp.

nov.. Foi encontrado um maior nível de heterozigosidade na nova espécie, sendo justificado por diferentes padrões de comportamento reprodutivo e de oviposição. Nos *Trichogramma* encontraram maiores diferenças no padrão de amplificação, onde a heterogeneidade foi maior dentro e entre espécies indicando que um sistema de marcação mais eficiente é requerido para monitorar a integridade genética dos biotipos comerciais.

HAYMER & McINNIS (1994) identificaram marcadores genéticos RAPD caracterizando populações da mosca da fruta mediterrânea *Ceratitis capitata*. Com os diferentes *primers* analisados, foi possível detectar diferentes níveis de polimorfismos de diferentes populações. Foram detectados marcadores genéticos que puderam distinguir entre populações cultivadas em laboratório de populações selvagens, bem como subpopulações de moscas de localidades geográficas distintas.

Para constatar a possibilidade de que a divisão de trabalho nas vespas, *Polybia aequatorialis* tinha um componente genético, O'DONNELL (1996) avaliou operárias forrageadoras de diferentes fontes (resina, néctar, água e insetos pilhadores). Por marcadores RAPD, estimou a similaridade genotípica baseada no compartilhamento de bandas variáveis. Padrões de associação de marcadores RAPD segundo as especializações de forrageamento foram constantes em 2 das 3 colônias analisadas, sugerindo seleção à nível de colônia, como fator favorecendo a manutenção da alta variabilidade genética neste e em outros grupos de insetos.

DIMOPOULOS *et al.* (1996) demonstraram como marcadores RAPD têm sido integrados em mapas genéticos e citogenéticos do mosquito vetor da malária, *Anopheles gambiae*. Foram mapeados 15 marcadores por recombinação, relativos à microssatélites que tinham sido mapeados previamente. Foram purificadas do gel, clonadas e sequenciadas 34 bandas RAPD, gerando 31 sítios de seqüências etiquetadas (STSs) que podem ser usados como pontos dentro do genoma, enriquecendo o mapa genômico do mosquito.

CARTER *et al.* (1996) estimaram alta divergência genética por análise de *cluster* e isoenzimas em populações do besouro *Tomicus piniperda* nos Estados Unidos. Contrariando dados obtidos por proteínas, que sugerem baixos níveis de variabilidade genética para himenópteros.

LU & RANK (1996) estimaram uma diversidade genética 10 vezes superior à encontrada por dados de isoenzimas, para machos (n) de 5 populações geograficamente isoladas de uma abelha polinizadora de alfafa (*Megachile rotundata*). Foram testados 16 *primers* (130 bandas polimórficas) e os resultados foram obtidos por cálculo da heterozigosidade, divergência de nucleotídeos e distância genética.

TABERNER *et al.* (1997) caracterizaram a população de um coleóptero que ataca plantações de beterraba destinada à produção de açúcar no sul da Espanha. A distância genética entre as populações foi estimada, podendo-se inferir a evolução desta peste nas plantações vizinhas. Os resultados obtidos foram compatíveis com um único evento de colonização, seguido pela dispersão para áreas vizinhas.

Poucos trabalhos utilizando marcadores RAPD foram feitos até o momento para os Apídeos. O primeiro trabalho em *Apis mellifera* foi feito por HUNT & PAGE (1992a), onde foi demonstrado, pela primeira vez, que marcadores RAPD não são herdados somente de maneira dominante. Por meio da segregação dos marcadores RAPD em rainhas (2n) e zangões (n) por inseminação instrumental, foram encontrados 4 tipos de polimorfismos em zangões e rainhas virgens F1. Os polimorfismos para presença/ausência e intensidade de bandas foram herdados de maneira dominante. Os polimorfismos por tamanho de fragmento que segregaram em 1:1 na progênie de zangões, seriam marcadores alélicos para os mesmos, ou estariam compactamente ligados em trans. O último tipo de polimorfismo observado, caracterizou-se como uma banda diplóide-específica de zangões (2n) obtidos por retrocruzamento. Observou-se que quando os produtos amplificados por PCR de dois zangões haplóides diferentes eram misturados, uma banda diplóide-específica se restabelecia, sendo portanto resultado da formação de um heteroduplex no DNA de alelos alternados no heterozigoto.

O *locus* da determinação de sexo (*xo*) em *Apis mellifera* foi mapeado pela segregação de marcadores RAPD em cruzamentos por inseminação instrumental (HUNT & PAGE, 1992b). Foi obtido um marcador polimórfico para zangões diplóides. Este foi clonado e parcialmente seqüenciado. *Primers* foram construídos para este *locus* *STS* (*Sequence-Tagged Site*) e a progênie foi testada. Observou-se que os marcadores RAPD e STS foram codominantes (devido à ocorrência de alelos por tamanho de fragmento). Quatro zangões diplóides da progênie foram homozigotos para esses

marcadores e somente 3 operárias, das 181, foram homozigotas recombinantes. Portanto, a distância entre o *locus xo* e o *locus sts* foi estimada em 1,6 cM.

HUNT & PAGE (1995) construíram o mapa de ligação de *Apis mellifera* com base em 365 marcadores RAPD polimórficos. Os testes foram feitos em machos (F1) originados de cruzamento artificial, com outros dois marcadores segregantes: a cor preta do corpo e o *locus* da malato desidrogenase. O mapa de marcadores cobriu 3110 cM em 26 grupos de ligação, sendo o tamanho total do genoma estimado em 3450 cM. Foi observado, pelo tamanho do mapa, que existe uma alta taxa de recombinação nesta espécie.

SUAZO *et al.* (1998) detectaram marcadores RAPD que distinguiram abelhas melíferas Africanas e Européias. Foram selecionados 5 *primers*, dentre os 700 testados. Eles identificaram um marcador RAPD população-específico, altamente informativo, que gerou resultados consistentes com marcadores RFLP populações-específicos prévios, que sugeriram um grau de hibridação entre tais populações.

LAURENT *et al.* (1998) construíram 3 mapas de ligações compostos do genoma da vespa parasitóide, *Trichogramma brassicae*, baseado na análise da segregação de marcadores RAPD em 3 populações F2. Essas populações foram constituídas de progênies de machos (n) de várias rainhas virgens F1, as quais vieram de cruzamentos de 4 linhagens parentais, que foram fixadas para diferentes marcadores RAPD polimórficos e que foram polimórficos para caracteres como longevidade e fertilidade. Foram organizados 84 marcadores dentro de 5 grupos de ligação. O intervalo entre os 2 marcadores foi de 17,7cM, e o mapa composto mediu 1330cM.

LOU *et al.* (1998) descreveram a estrutura populacional e variabilidade RAPD entre e dentro de populações naturais de *Cephus cinctus* Nortan (Hymenoptera: Cephidae), um inseto praga de trigo. Foram selecionados 31 dentre os 62 *primers* testados. Vinte *primers* geraram 60 fragmentos usados para análises da homogeneidade entre as populações, sugerindo 77% de divergência genética.

OLIVEIRA (1998) determinou a distância genética por marcadores RAPD entre populações de *Tetragonisca angustula* provenientes de 26 localidades (3 países da América Latina), duas amostras de *Tetragonisca buchwaldi*, e usando *Apis mellifera* como *outgroup*. Foram analisados 18 *primers*, sendo 7 longos e 11 curtos, que produziram 218 bandas com uma média de 3,8 polimorfismos por *primer*. Foi

encontrado que *primers* longos foram mais eficientes na distinção de grupos mais distantes, enquanto que *primers* curtos distinguiram melhor genótipos mais próximos. Outro resultado interessante foi que o grau de distância genética entre *T. angustula* e *T. buchwaldi*, que pertencem ao mesmo gênero, foi maior do que entre *T. angustula* e *A. mellifera*.

Analisando 21 genótipos diferentes de *Melipona rufiventris*, VASCONCELOS (1998) determinou a distância genética entre populações alopátricas, provenientes de 6 localidades, utilizando a técnica de marcadores RAPD. Foram identificados 84 marcadores, que permitiram separar os genótipos em 3 grupos distintos, à nível de 27% de distância genética.

WALDSCHMIDT *et al.* (1998), calcularam a variabilidade genética intracolônia por marcadores RAPD, em colônias de *M. quadrifasciata*. Cálculos realizados utilizando o coeficiente de Jaccard, demonstraram que a variabilidade genética intracolônia nesta espécie é bastante reduzida, o que pode ser explicado pelo acasalamento de rainha com um único macho.

TAVARES *et al.* (1999), analisaram a frequência de polimorfismos e o padrão de herança de marcadores RAPD em machos haplóides de uma população de *Melipona quadrifasciata*. Foram detectados 3 tipos de polimorfismos: presença/ausência da banda, intensidade da banda e comprimento do fragmento. Estes tipos de polimorfismos ocorreram 96, 12 e 20 vezes, respectivamente. Todos estes marcadores segregaram na proporção de 1:1 entre os machos haplóides filhos da mesma rainha, de acordo com a expectativa Mendeliana. A maioria dos polimorfismos detectados foram como presença/ausência do produto amplificado.

Seguindo seus estudos, TAVARES *et al.* (1999) utilizando marcadores RAPD, construíram um mapa de ligação genética para *M. quadrifasciata* com 77 *primers*. Os marcadores que segregaram na proporção de 1:1 entre os machos haplóides, foram analisados utilizando o programa Mapmarker. As análises revelaram 22 grupos de ligação, variando em tamanho de 11 a 211 cM, e 39 marcadores não ligados. Estes 22 grupos de ligação incluíram 89 marcadores RAPD e cobriram uma distância genética de 1416 cM.

1.4. Objetivo e Justificativas

Este trabalho tem como objetivo analisar a divergência genética entre uma população de *Melipona scutellaris* isolada geograficamente há 12 anos (Uberlândia, Minas Gerais) de sua população original (Lençóis e Catu, Bahia) por meio de marcadores RAPD.

Estudos da variabilidade genética de populações de abelhas podem fornecer dados importantes para o estabelecimento de estratégias que visem a preservação das mesmas. Portanto, esse trabalho irá elucidar aspectos genéticos sobre a consequência da instalação do Meliponário, bem como a variabilidade genética da população que foi introduzida há 12 anos em Uberlândia, em relação à população original da Bahia. E com vista nos poucos trabalhos moleculares existentes para Meliponíneos, torna-se necessário uma maior caracterização genética dessa fauna de tão grande importância ambiental.

Uma das estratégias a ser usada na preservação da biodiversidade, é preservar grupos de organismos que são importantes para a manutenção da diversidade em outros grupos. As abelhas, dada sua importância como polinizadoras, são sobremaneira importantes para a manutenção da diversidade de plantas que, por sua vez, têm papel fundamental na manutenção de comunidades animais. No mais, 30% da alimentação humana depende de plantas polinizadas por abelhas (ABSY *et al.*, 1984).

Estas justificativas são de extrema importância, considerando que a enorme biodiversidade dos Meliponíneos está sendo ameaçada pela acelerada devastação das florestas nativas e a degradativa ação antrópica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética e Bioquímica (DEGEB) da Universidade Federal de Uberlândia.

2.1. Material Biológico

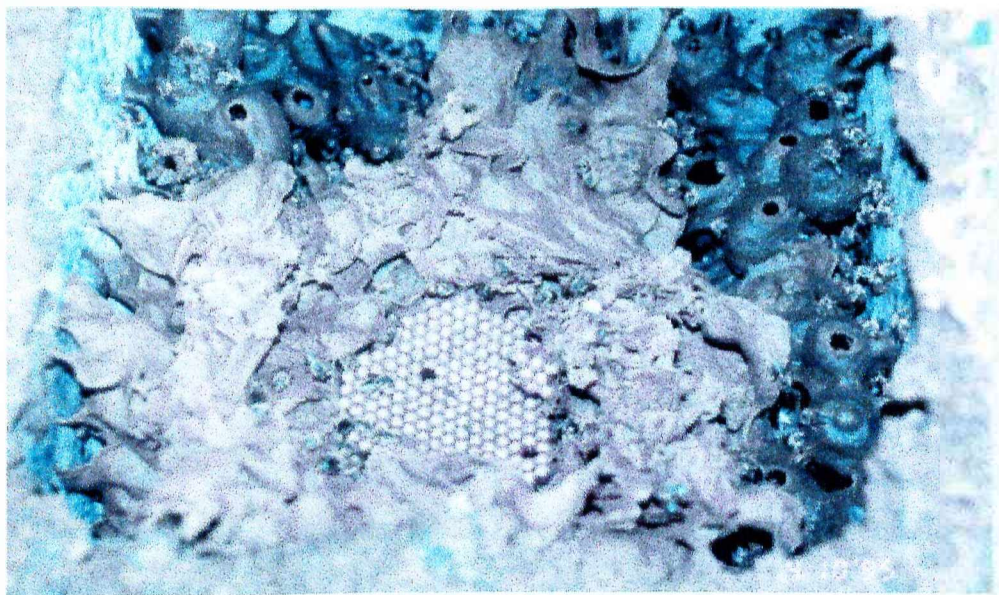


Figura 1: Vista interna do ninho de *Melipona scutellaris*

O material biológico utilizado nesse experimento foram abelhas indígenas sem ferrão, da espécie *Melipona scutellaris* (Figura 1) conhecida como "uruçu do Nordeste" por se distribuir desde a Bahia até o Estado de Rio Grande do Norte.

O Meliponário Uberlândia foi criado com 14 colônias trazidas em março de 1987, da cidade de Lençóis-BA (região da Chapada Diamantina). Posteriormente, em novembro de 1990, foram trazidas mais 8 colônias e a partir dessas 22 colônias originais foram feitas diversas divisões, formando assim a população de Uberlândia. A escolha da Chapada Diamantina deveu-se devido à sua altitude e temperaturas mais baixas, o que facilitaria a adaptação das colônias ao clima de Uberlândia-MG (CARVALHO, 1996).

Na implantação do Meliponário Uberlândia, vários aspectos foram observados, mas principalmente se as características climáticas e florísticas eram semelhantes à da região de origem. Também tomou-se cuidado quanto ao tipo de colméia (caixa) a ser adotada, bem como a localização das mesmas (distância entre as caixas, exposição à chuva e ao sol e acesso de inimigos naturais).

Com a estrutura do meliponário já formada, foram sendo introduzidas mais colônias e rainhas de outras localidades, e também outras espécies. A primeira introdução de rainhas ocorreu em maio de 1992, com 13 rainhas fisogástricas de Lençóis-BA. Em julho de 1993, foram introduzidas 3 rainhas fisogástricas de Catu-BA. Em maio de 1994, ocorreu a introdução de 11 rainhas de Lençóis-BA, as quais foram introduzidas em colônias recém-formadas. Em março de 1995, foram trazidas 3 colônias resultantes de divisões feitas em Lençóis (CARVALHO, 1996). Todas as introduções foram da espécie *Melipona scutellaris*.

Em novembro de 1995, foram trazidas 5 colônias de *Melipona capixaba*, provenientes da região de Domingo Martins-ES. Na época, havia no Meliponário Uberlândia, 52 colônias de *M. scutellaris*, 3 de *M. quadrifasciata*, 2 de *M. bicolor* e algumas outras de *Trigona spinipes*, *Tetragonisca angustula* e *Frieseomelitta varia* (NASCIMENTO, 1996).

A coleta das amostras provenientes do Meliponário Uberlândia, deu-se diretamente do interior das colméias racionais. As abelhas foram colocadas em conjuntos de 5 indivíduos por frasco, o qual continha álcool comercial (99,5%) e, em seguida, foram estocadas em freezer a -80°C até o momento da extração do DNA.

As amostras provenientes do estado da Bahia foram fornecidas por criadores da região.

Tabela 1: Número, Origem e Posições Geográficas das amostras de *Melipona scutellaris*

| Amostra | Origem da amostra | Posição geográfica |
|---------|-----------------------------|-----------------------|
| MG322 | Meliponário Uberlândia – MG | S 18° 55' / W 48° 17' |
| MG335 | Meliponário Uberlândia – MG | S 18° 55' / W 48° 17' |
| MG441 | Meliponário Uberlândia – MG | S 18° 55' / W 48° 17' |
| MG445 | Meliponário Uberlândia – MG | S 18° 55' / W 48° 17' |
| MG480 | Meliponário Uberlândia – MG | S 18° 55' / W 48° 17' |
| MG519 | Meliponário Uberlândia – MG | S 18° 55' / W 48° 17' |
| MG533 | Meliponário Uberlândia – MG | S 18° 55' / W 48° 17' |
| BA32 | Lençóis – BA | S 12° 33' / W 41° 23' |
| BA33 | Lençóis – BA | S 12° 33' / W 41° 23' |
| BA34 | Lençóis – BA | S 12° 33' / W 41° 23' |
| BA35 | Lençóis – BA | S 12° 33' / W 41° 23' |
| BA36 | Lençóis – BA | S 12° 33' / W 41° 23' |
| BA38 | Catu – BA | S 12° 21' / W 38° 23' |
| BA39 | Catu – BA | S 12° 21' / W 38° 23' |

MG: Minas Gerais; BA: Bahia; os números representam o número da colônia amostrada; S: latitude e W: longitude.

2.2. Análise Molecular

2.2.1. Extração do DNA genômico

Um *bulk* de 5 indivíduos de uma mesma colônia foi usado na extração do DNA genômico, representando cada colônia amostrada, com a finalidade de assegurar a representatividade genotípica da população do Meliponário Uberlândia.

Nos Meliponíneos há tendência à baixa variabilidade genética dentro de uma colônia, devido ao seu sistema de cruzamento. Ao contrário das rainhas de *Apis*, que chegam a cruzar-se com mais de 19 zangões, as rainhas dos Meliponíneos cruzam-se apenas com um macho ou, ocasionalmente, com até 5 machos (PAXTON *et al.*, 1999). Este fato tende a diminuir a variabilidade genética dentro de uma mesma colônia, tornando-a mais homogênea, uma vez que todas as operárias descendentes desse

cruzamento compartilham os mesmos alelos paternos. Para minimizar essa baixa representatividade genética das colônias amostradas e o aparecimento dos “falsos positivos”, teve-se o cuidado de coletar operárias de uma mesma geração. KHANDKA *et al.* (1997) mostraram que o uso de material genético mais homogêneo na formação de *pools* de DNA, reduz a probabilidade de se obter fragmentos polimórficos falsos.

Inicialmente, os indivíduos de cada colônia amostrada foram re-hidratados em tampão de lavagem (TrisCl 0,01M, pH 8,0; NaCl 0,1M e MgCl₂ 0,001M) em três banhos sucessivos de 15 minutos e, em seguida, secos em papel de filtro.

Foram utilizados na extração apenas os tecidos do tórax. Foram retirados os apêndices e abdômen de cada indivíduo, com uma lâmina de bisturi estéril para evitar possível contaminação com bactérias simbióticas (CAMPOS, 1997).

O protocolo utilizado para extração do DNA genômico foi o descrito por PAXTON *et al.* (1996) com as seguintes modificações. Os tórax de 5 abelhas foram macerados em cadinho, com nitrogênio líquido e transferidos para um microtubo (estéril) de 2 ml. Foi adicionado 1ml de tampão de extração SET (NaCl 0,15M, Tris-HCl 0,02M, EDTA 1mM, pH 8,0), 36µl de proteinase K (10mg/ml) e 44µl de SDS 25%. A suspensão foi incubada a 55°C por 2 horas, invertendo os tubos ocasionalmente. Após a incubação, seguiu-se a precipitação dos ácidos nucleicos com a adição de 660µl de NaCl 6M e 330µl de Tris-HCl 0,01M pH 8,0, misturando a solução em vórtex e centrifugando-a por 10 minutos a 13.000 rpm. Em seguida, completou-se o volume final de 2ml com etanol 100% gelado e a solução foi deixada a -20°C *overnight*. No dia seguinte, os microtubos foram centrifugados por 30 minutos a 13.000 rpm. Lavou-se o *pellet* de DNA que se encontrava aderido ao fundo do microtubo com etanol 70%, deixando-o secar em estufa por aproximadamente 1 hora. Ressuspendeu-se o *pellet* seco em 200µl de tampão TE (Tris-HCl 10mM e EDTA 1mM pH 8,0) e adicionou-se 2,5µl RNase (100 mg/ml) com a finalidade de degradar o RNA presente, incubando a solução por 1 hora a 37°C. Logo após, inativou-se a RNase com a elevação da temperatura para 95°C, por 15 minutos. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

2.2.2. Quantificação do DNA genômico

O DNA de cada amostra foi quantificado por leitura de absorbância a 260nm em espectrofotômetro Hitachi U-2000. Sua qualidade foi avaliada pela razão ABS260/A280 nm e por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Alíquotas de 10µl foram diluídas 10 vezes em água ultrapura e submetidas à leitura em espectrofotômetro. Após a quantificação, as amostras foram aliquotadas: uma solução de trabalho à 5ng/µl e outra solução estoque contendo o restante da extração, com concentração de aproximadamente 1.000ng/µl. A solução estoque foi mantida a -80°C para melhor manutenção da integridade do DNA, enquanto que a solução de trabalho foi mantida a 4°C.

2.2.3. Amplificação com *primers* aleatórios

As reações de RAPD foram realizadas segundo WILLIAMS *et al.* (1993) com algumas modificações para otimizar o melhor sinal de amplificação dos fragmentos. Variou-se principalmente a concentração de DNA (5, 10, 12,5, 15, 20 e 25ng) sendo que com o restante dos reagentes, não houve variações nas concentrações inicialmente usadas.

As condições previamente otimizadas apresentaram volume final de 15µl, com os seguintes reagentes: 5ng de DNA genômico, 1,5 unidades da enzima *Taq* DNA polimerase (GibcoBRL®), Tampão da *Taq* 1X (GibcoBRL®), 100µM de cada dNTP (Pharmacia Biotech), 2mM de MgCl₂ (GibcoBRL®), 10pmoles de *primer* (OPERON Technologies INC.), 1,4µl de BSA (Bovine Serum Albumin) e o volume completado com água ultrapura. Cada reação foi coberta com 10µl de óleo mineral para evitar evaporação dos reagentes.

Cada bateria de reações continha um controle negativo, com todos os componentes da reação, exceto o DNA. Esse procedimento foi adotado para confirmar se os produtos amplificados nas reações representavam DNA genômico amplificado, ou contaminações e artefatos dos *primers*.

As reações foram amplificadas em termociclador PCR Express-Hybaid. Os passos consistiram de 2 ciclos iniciais de 94°C/1min., 35°C/1min. e 72°C/2min., seguidos por 40 ciclos de 92°C/1min., 35°C/1min. e 72°C/2min., com um passo final de 72°C/5min. e 4°C/24h. (WILLIAMS *et al.* 1990; HUNT & PAGE, 1992a).

Os *primers* decâmeros (10 bases) aleatórios foram adquiridos da OPERON Technologies INC., EUA. Cada *primer* foi testado de 2 a 3 vezes para garantir a repetibilidade das bandas a serem analisadas.

Tabela 2: Lista dos *primers* utilizados para amplificar o DNA das 14 amostras de *Melipona scutellaris* e suas respectivas seqüências de nucleotídeos.

| Primer | Seqüência |
|--------|----------------|
| OPA 20 | 5'GTTGCGATCC3' |
| OPC 07 | 5'GTCCCGACGA3' |
| OPC 11 | 5'AAAGCTGCGG3' |
| OPC 15 | 5'GACGGATCAG3' |
| OPC 16 | 5'CACTCCAG3' |
| OPF 02 | 5'GAGGATCCCT3' |
| OPF 03 | 5'CCTGATCACC3' |
| OPF 16 | 5'GGAGTACTGG3' |
| OPG 04 | 5'AGCGTGTCTG3' |
| OPG 08 | 5'TCACGTCCAC3' |
| OPG09 | 5'CTGACGTCAC3' |
| OPG10 | 5'AGGGCCGTCT3' |
| OPG14 | 5'GGATGAGACC3' |
| OPI 01 | 5'ACCTGGACAC3' |
| OPI 02 | 5'GGAGGAGAGG3' |
| OPI 03 | 5'CAGAAGCCCA3' |
| OPM 07 | 5'CCGTGACTCA3' |
| OPM 09 | 5'GTCTTGCGGA3' |
| OPM 12 | 5'GGGACGTTGG3' |
| OPM 14 | 5'AGGGTCGTT3' |
| OPM 15 | 5'GACCTACCAC3' |
| OPM 18 | 5'CACCATCCGT3' |
| OPO 02 | 5'ACGTAGCGTC3' |
| OPO 06 | 5'CCACGGGAGG3' |
| OPV 07 | 5'GAAGCCAGCC3' |
| OPV 10 | 5'GGACCTGCTG3' |
| OPV 15 | 5'CAGTGCCGGT3' |
| OPV 18 | 5'TGGTGGCGTT3' |
| OPZ 07 | 5'CCAGGAGGAC3' |
| OPZ 11 | 5'CTCAGTCGCA3' |
| OPZ15 | 5'CAGGGCTTTC3' |
| OPZ18 | 5'AGGGTCTGTG3' |

2.2.4. Separação e Visualização dos produtos amplificados

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1,2% a 150V por 2 horas, nas dimensões de 20cm x 24,5cm x 0,6cm, em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X, conforme SAMBROOK *et al.* (1989). O corante usado foi brometo de etídio na concentração final de 0,5µg/ml de gel. A cada amostra de amplificação de 15µl foi adicionado 3µl de tampão de carregamento (azul de bromofenol 3,61M, xileno cianol 4,64M, sacarose 1,17M e EDTA 0,1M, pH8,0).

Os géis foram visualizados em transluminador UV e fotografados em VDS Image System-Pharmacia, usando filtro laranja, com tempos de exposição variando entre 2,17 a 2,86 seg., contraste entre 6 e 8 e fator de correção da câmara 0,45.

2.2.5. Análise dos dados

Uma matriz binária foi montada com dados referentes a presença (1) e ausência (0) de bandas, utilizando sempre aquelas mais intensas e definidas, que apresentaram boa repetibilidade. A matriz gerada foi analisada pelo programa STATISTICA 4.5 A (1993) para o cálculo das distâncias genéticas e análise de *cluster*. As distâncias genéticas foram calculadas pelo método de porcentagem de desacordo:

$$N_{AB}^2 / N_T \text{ (PUTERKA } et al. 1993: \textit{apud} \text{ CABRAL, 1997)}$$

onde, N_{AB}^2 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 mais distantes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a finalidade de facilitar a descrição dos resultados, os genótipos das populações de *Melipona scutellaris* foram discriminados pelo Estado de origem e número da colônia amostrada.

3.1. Otimização das reações utilizadas

A concentração de DNA que apresentou o melhor resultado na repetibilidade do padrão de amplificação foi com 5ng de DNA para um volume final de 15µl por reação. O excesso de DNA na reação inibiu a amplificação de alguns fragmentos. Tem sido demonstrado, que essa inibição ocorre principalmente pela competição dos *primers* por um grande número de sítios de anelamento (SAIKI *et al.* 1988; MEUNIER & GRIMONT, 1993; WILKIE *et al.* 1993; KHANDKA *et al.* 1997).

Existe uma correlação na proporção DNA:enzima apropriada para garantir um bom padrão de amplificação. KHANDKA *et al.* (1997) testaram o efeito das diversas concentrações de DNA e enzima *Taq* DNA polimerase. O número de produtos amplificados avaliados para diversas concentrações de DNA e enzima mostraram que a alta proporção de enzima em relação ao DNA, amplifica mais fragmentos, enquanto que altas proporções de DNA em relação à enzima reduz o número de fragmentos amplificados.

Durante a otimização, para melhorar a qualidade e uniformidade das amplificações, foi adicionado BSA (10mg/ml). O BSA é comumente utilizado como um estabilizador das atividades enzimáticas, contra a desnaturação durante o armazenamento, em diluição ou reações enzimáticas *in vitro*, tais como clivagens de DNA, síntese de cDNA ou ligações. O BSA, no ensaio RAPD, estabiliza a atividade da *Taq* DNA polimerase, protegendo-a de impurezas agregadas ao DNA genômico, bem como de íons presentes na parede de alguns tipos de plásticos utilizados na fabricação dos microtubos usados no laboratório (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). A adição do BSA resultou em amplificações mais intensas, facilitando a leitura dos perfis RAPD.

3.2. Análise dos padrões de amplificação com *primers* aleatórios

Foram selecionados 32 *primers* para a análise da diversidade genética entre os genótipos de *M. scutellaris*. Estes apresentaram alta repetibilidade nos padrões de amplificação. Apenas as bandas mais intensas e bem definidas foram consideradas na análise da matriz das distâncias genéticas, para evitar erros advindos da consideração incorreta dos produtos amplificados. Foram desconsiderados 6 *primers* por apresentarem um padrão de bandas muito compacto ou por não apresentarem repetibilidade para as condições estabelecidas nas reações.

Dos 32 *primers* selecionados, 21 geraram padrão de bandas monomórficas e 11 geraram polimorfismos. As amplificações resultaram em 136 posições de bandas amplificadas, com tamanhos variando entre 300 e 2600 pb. O número de posições de bandas polimórficas detectadas variaram em média de 1 a 3. Os 11 *primers* polimórficos, apresentaram em média 1,7 posições de bandas, representando 16,2% do total de posições de bandas obtidas (Tabela 3).

Tabela 3: Relação do número de posições de bandas monomórficas e polimórficas por *primer* selecionado para amplificação do genoma de *Melipona scutellaris*.

| Primers | Posições de bandas monomórficas | Posições de bandas polimórficas |
|----------------|--|--|
| OPA 20 | 04 | 00 |
| OPC 07 | 04 | 00 |
| OPC 11 | 04 | 00 |
| OPC 15 | 02 | 00 |
| OPC 16 | 04 | 02 |
| OPF 02 | 04 | 01 |
| OPF 03 | 04 | 03 |
| OPF 16 | 02 | 02 |
| OPG 04 | 02 | 00 |
| OPG 08 | 03 | 00 |
| OPG 09 | 03 | 00 |
| OPG 10 | 05 | 00 |
| OPG 14 | 06 | 00 |
| OPI 01 | 01 | 00 |
| OPI 02 | 05 | 00 |
| OPI 03 | 06 | 01 |
| OPM 07 | 03 | 01 |
| OPM 09 | 01 | 00 |
| OPM 12 | 05 | 00 |
| OPM 14 | 03 | 00 |
| OPM 15 | 03 | 01 |
| OPM 18 | 03 | 00 |
| OPO 02 | 04 | 02 |
| OPO06 | 05 | 00 |
| OPV 07 | 05 | 00 |
| OPV 10 | 05 | 00 |
| OPV 15 | 09 | 00 |
| OPV 18 | 03 | 00 |
| OPZ 07 | 00 | 03 |
| OPZ 11 | 02 | 02 |
| OPZ 15 | 03 | 01 |
| OPZ 18 | 04 | 00 |
| TOTAL | 117 | 19 (16.2 %) |

A matriz das distâncias genéticas (Tabela 4) entre os genótipos foi construída com base na presença e ausência de bandas e analisada pelo método de Porcentagem de Desacordo. A dissimilaridade genética máxima entre as 2 populações de *M. scutellaris* foi de 6,7 %. Os dados da matriz foram utilizados para a análise de *cluster* e o dendrograma resultante desta análise é mostrado na Figura 2.

Tabela 4: Matriz das distâncias genéticas expressa em Porcentagem de Desacordo, obtida para os 14 genótipos de *Melipona scutellaris* por meio de 136 posições de bandas RAPD.

| Variáveis | MG 322 | MG 335 | MG 441 | MG 445 | MG 480 | MG 519 | MG 533 | BA 32 | BA 33 | BA 34 | BA 35 | BA 36 | BA 38 | BA 39 |
|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| MG322 | .00 | | | | | | | | | | | | | |
| MG335 | .04 | .00 | | | | | | | | | | | | |
| MG441 | .04 | .02 | .00 | | | | | | | | | | | |
| MG445 | .04 | .04 | .02 | .00 | | | | | | | | | | |
| MG480 | .05 | .03 | .02 | .01 | .00 | | | | | | | | | |
| MG519 | .06 | .05 | .03 | .04 | .04 | .00 | | | | | | | | |
| MG533 | .04 | .04 | .03 | .05 | .05 | .03 | .00 | | | | | | | |
| BA32 | .07 | .08 | .06 | .05 | .07 | .06 | .07 | .00 | | | | | | |
| BA33 | .06 | .05 | .04 | .04 | .05 | .04 | .04 | .04 | .00 | | | | | |
| BA34 | .07 | .07 | .06 | .05 | .05 | .04 | .06 | .03 | .04 | .00 | | | | |
| BA35 | .04 | .07 | .04 | .02 | .04 | .04 | .06 | .03 | .04 | .04 | .00 | | | |
| BA36 | .03 | .05 | .04 | .04 | .05 | .06 | .04 | .04 | .03 | .06 | .03 | .00 | | |
| BA38 | .08 | .10 | .09 | .09 | .10 | .09 | .09 | .09 | .07 | .09 | .09 | .07 | .00 | |
| BA39 | .07 | .08 | .07 | .05 | .07 | .06 | .07 | .07 | .03 | .07 | .06 | .04 | .04 | .00 |

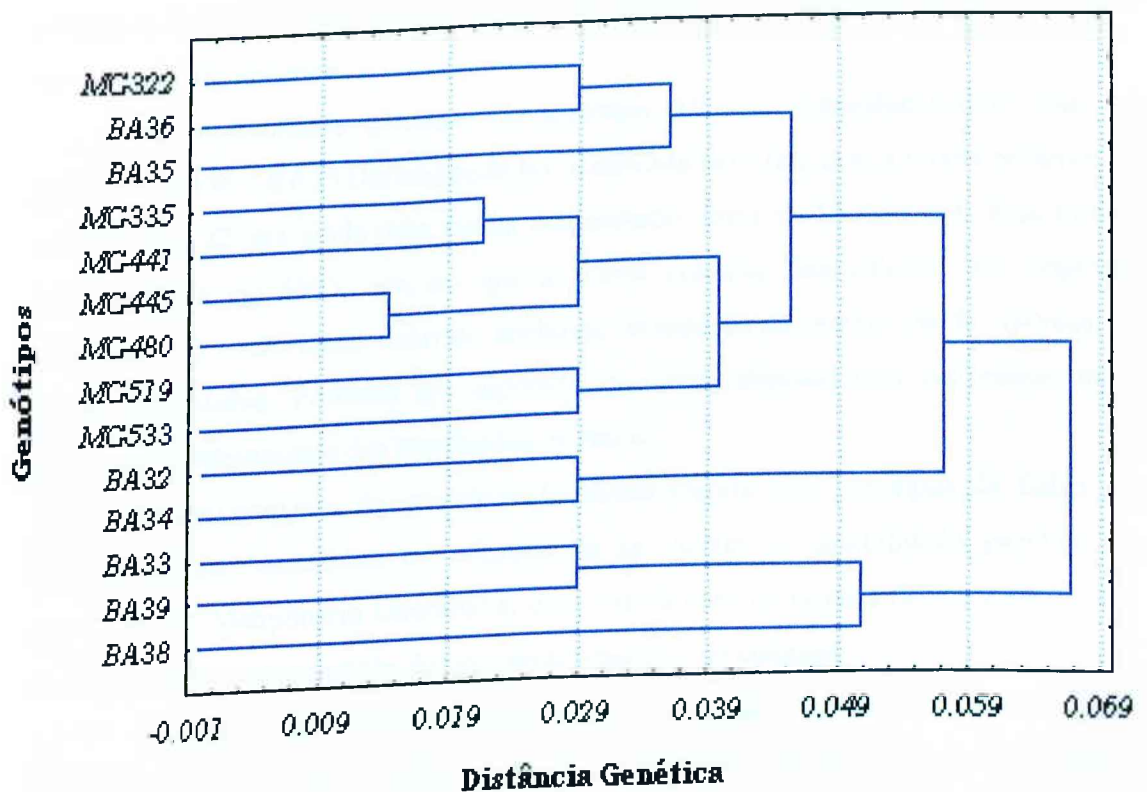
Os maiores valores de distâncias genéticas encontradas foram entre o genótipo BA38 e todos os genótipos de Minas Gerais, e ainda com os genótipos BA32, BA34 e BA35 com dissimilaridade genética média de 0,09. O genótipo BA32 em relação à MG335, apresentou 0,08 de dissimilaridade genética (Tabela 4).

Os menores valores, por sua vez, estão entre MG441 e MG335 com 0,02, MG441 e MG445 e MG480 com 0,02; BA35 e MG445 com 0,02 e MG480 e MG445 com 0,01 de divergência genética. Pode-se observar que os menores valores mostraram-

se, em sua maioria, entre as colônias de Minas Gerais. Na amostragem das colônias do Meliponário Uberlândia, teve-se o cuidado de não incluir entre as amostras, colônias mães e filhas. Contudo, não foi possível determinar se os machos de uma mesma colônia fecundaram mais de uma rainha das colônias analisadas. Além disso, o alto nível de endogamia na população de Uberlândia deve ser considerada, sendo que, quanto maior o índice de endocruzamentos em uma população, menor sua variabilidade genética.

A diminuição da divergência genética dos alelos sexuais *xo* na população de Uberlândia tem sido também detectada pela sua contagem na população desde 1991 (CARVALHO, 1996).

Figura 2: Dendrograma representativo das distâncias genéticas por porcentagem de desacordo e agrupamento pelo método de UPGMA, entre os 14 genótipos de *Melipona scutellaris*, por meio de 136 posições de bandas produzidas por 32 *primers* RAPD.



A análise do dendrograma baseada em 32 *primers* (Figura 2) permitiu a separação dos genótipos de *M. scutellaris* em 2 grupos, com uma distância genética limite de 0,067. O primeiro grupo inclui 11 genótipos: MG322, BA36, BA35, MG335, MG441, MG445, MG480, MG519, MG533 BA32 e BA34. O segundo grupo abrangeu os 3 genótipos restantes: BA33, BA39 e BA38.

Com dissimilaridade genética de 0,057, o grupo 1 foi dividido em 2 subgrupos. O primeiro subgrupo apresentou dois grupos irmãos com 0,045 de similaridade genética. No primeiro grupo irmão estão os genótipos MG322, BA36 e BA35 que apresentam entre si similaridade de 0,037. Neste agrupamento, obteve-se ainda similaridade de 0,029 entre MG322 e BA36. O outro grupo irmão também dividiu-se em 2 agrupamentos (0,040). O primeiro incluindo MG335, MG441, MG445 e MG480 (0,029) e o segundo incluindo MG519 e MG533 (0,029). Nestes agrupamentos os pares genotípicos MG335 e MG441, MG445 e MG480, apresentaram, respectivamente, similaridades equivalentes a 0,021 e 0,014. O segundo subgrupo do grupo 1 incluiu os genótipos BA32 e BA34 à nível de 0,029.

O grupo 2 dividiu-se em 2 subgrupos irmãos. O primeiro contendo os genótipos BA33 e BA39 (0,029) e ambos agrupados com o genótipo BA38 com 0,051 de similaridade genética.

A proximidade genética do genótipo MG322 (Uberlândia-MG) com os genótipos BA36 e BA35 (Bahia) pode ser justificada pelo fato que, a rainha presente na colônia MG322, era ainda uma rainha descendente direta de Lençóis-BA. Essa rainha foi fecundada em 1993, ano em que só havia colônias descendentes das originais (Lençóis-BA) e não havia ocorrido nenhuma introdução de rainhas ou de colônias de outras localidades. Portanto era esperado que seus descendentes estivessem mais próximos geneticamente das populações originais.

O agrupamento de genótipos de Minas Gerais com genótipos da Bahia no primeiro grupo, demonstra os esforços de se manter a variabilidade genética da população do Meliponário Uberlândia, com introduções de rainhas (27 de Lençóis e 3 de Catu) e com a manutenção de um elevado número de colônias.

A proximidade entre genótipos de uma população “isolada” em Minas Gerais com os de sua população original nativa (BA), evidencia que tal população introduzida

não foi depauperada geneticamente. A variabilidade genética original pode ter sido mantida em consequência das introduções de rainhas fisogástricas.

Analisando a matriz de distâncias genéticas, observa-se que há uma tendência dos genótipos de Minas Gerais estarem mais próximos geneticamente. Embora o dendrograma demonstre que tais genótipos agrupam-se com genótipos da Bahia, a proximidade genética entre as duas populações pode ser justificada pela recente separação entre elas (± 12 anos). Durante esse período houve apenas cerca de 2 a 6 gerações por colônia, o que parece não ter sido suficiente para distanciar geneticamente a população original da amostra fundadora da população de Uberlândia.

A maior proximidade entre o genótipo BA39 (Catu) com BA33 (Lençóis) do que com BA38 (Catu). Coloca-se sob suspeita a autenticidade da origem das colônias fornecidas pelos meliponicultores. As amostras BA38 e BA39 encontravam-se em colméias racionais que, segundo o criador, foram obtidas na região de Catu. Contudo, não temos como verificar se houve intercâmbio de colônias ou rainhas entre os seus criadores nos meliponários daquela região.

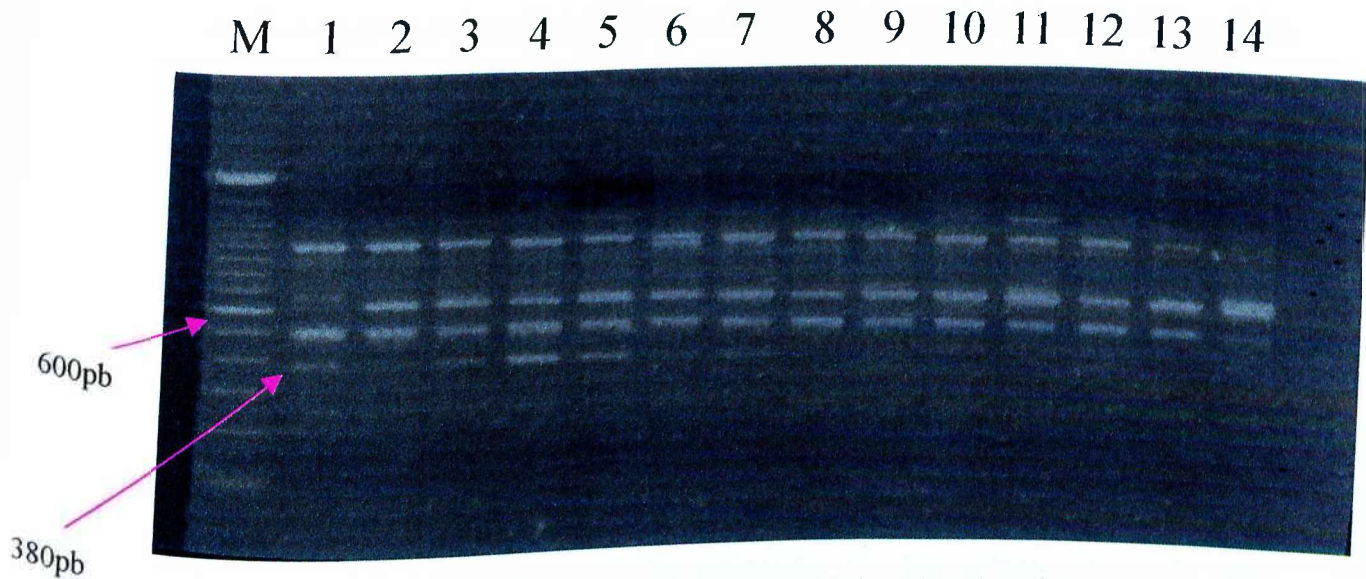


Figura 3: Padrão de amplificação de fragmentos de DNA (RAPDs) obtidos com o *primer* OPM15, para os 14 genótipos de *Melipona scutellaris*, analisados por eletroforese em gel de agarose 1.2%. M-Marcador de peso molecular de DNA, 1-MG322, 2-MG335, 3-MG441, 4-MG445, 5-MG480, 6-MG519, 7-MG533, 8-BA32, 9-BA33, 10-BA34, 11-BA35, 12-BA36, 13-BA38 E 14-BA39. A seta indica o marcador OPM15.38Kb para a população de Uberlândia-MG.

Na busca de marcadores genéticos população-específico, encontrou-se o *primer* OPM15 (Figura 3) que gerou um marcador de aproximadamente 380 pb, intitulado OPM15.38Kb. Esse marcador esteve presente em todos os genótipos de Minas Gerais e não foi observado em nenhum genótipo da Bahia, em todas as repetições realizadas. Baseado nesse *primer* foi possível separar as populações em 2 grupos distintos: um correspondente à população de Minas Gerais e outro à da Bahia.

Esses dados sugerem que esta espécie, na população de Uberlândia, pode ter sofrido alguma alteração genética após sua fundação. A primeira suposição é que a banda população-específica represente um alelo que já estava presente na população original, porém numa baixa proporção. Uma vez que a população de Uberlândia foi submetida à uma pequena área reprodutiva, a proporção desse alelo na população aumentou.

Uma hipótese para justificar a presença deste marcador, seria a ação do Efeito de Fundador. MAYR (1954) utilizou esta expressão para descrever a alteração inicial por deriva genética nas frequências alélicas, que promovem uma cadeia de mudanças genéticas em outros locos. A evolução numa população de ampla distribuição é lenta, porque o conjunto gênico co-adaptado resiste à mudanças, enquanto que em colônias recém-formadas, provavelmente é mais rápida e pode favorecer alterações de grande magnitude. As pressões seletivas atuantes sobre a nova colônia são, provavelmente, diferentes porque o ambiente de uma área pequena é mais homogêneo em relação à uma grande área.

Assim, sugere-se que durante sua fundação, a população de *M. scutellaris* de Uberlândia apresentava-se geneticamente menos variável, porque os poucos colonizadores possuíam apenas uma fração da variabilidade genética da população de origem. Deste modo, a eliminação acidental de genes ou ainda, a seleção, pode ter alterado as frequências alélicas em alguns locos, propiciando uma mudança genética (FUTUYMA, 1992). Essa mudança pode ainda ter sido agravada pelo alto índice de endogamia a que essa população foi submetida. O alelo selecionado pode estar relacionado à alguma característica importante para a maior adaptação da espécie à região de Cerrado, como por exemplo a aclimação fisiológica, gerando um maior fitness para manutenção da temperatura da colônia, num clima mais frio.

Outra suposição para tais alterações, são possíveis introduções de alelos diferentes, provenientes de outra espécie, uma vez que estão instaladas fora de sua área reprodutiva e em constante contato com esta espécie congênica, *M. capixaba*, introduzida na região a partir de 1995.

A hibridação das espécies *M. scutellaris* e *M. capixaba* e a verificação da formação de um híbrido fértil já foi constatada (NASCIMENTO, 1996). Observações morfológicas como coloração de pêlo e padrão de listras do abdômem são indicadores da ocorrência de tal hibridação. Assim, possivelmente, descendentes de uma rainha de *M. scutellaris* com um macho de *M. capixaba*, podem ter sido coletadas para as análises, embora o número de colônias de *M. capixaba* represente menos de 5% de todas as colônias do meliponário. No entanto, essa hibridação não aumentou a variabilidade genética da população de Uberlândia, em relação à população da Bahia, considerando todos os *primers* em conjunto. Para elucidar essa hipótese, seria necessário introduzir amostras de *M. capixaba* e do híbrido na análise do *primer* OPM15.

A detecção do marcador OPM15.38Kb foi de grande importância nesse estudo e incentiva estudos posteriores sobre ambas populações para elucidar a natureza do mesmo. Apesar da pouca sensibilidade da técnica RAPD em diferenciar indivíduos de populações separadas por tão pouco tempo (12 anos), encontrou-se esse marcador, gerado por apenas 1 único *primer* dentre os 32 selecionados.

Mesmo que marcadores populacionais específicos não forneçam informações diretas a respeito do *status* ou variabilidade de tais populações, a habilidade para determinar movimentos de genes pode ser importante para o entendimento de padrões de migração, necessidade de novos habitats, padrões de dispersão, estrutura de megapopulações e pesquisas regulatórias, tal como contrabando ilegal (HAIG, 1998).

Um grande número de *primers* apresentaram apenas posições de bandas monomórficas. Esse baixo índice de polimorfismos, ainda pode estar relacionado com a técnica escolhida para detectar divergências. Unida ao caráter dominante dos marcadores RAPD, a análise por eletroforese em gel de agarose, reduz a quantidade de informações obtidas (TINGEY *et al.*, 1992; HUNT & PAGE, 1992a; WILLIAMS *et al.*, 1993).

Em outros trabalhos, marcadores RAPD gerados por poucos *primers*, tem sido de grande aplicabilidade em taxonomia molecular. HU & QUIROS (1991) utilizando marcadores gerados por meio de 4 *primers*, foram capazes de discriminar 14 cultivares de brocolo (*Brassica oleracea* var. *italica*) e 12 cultivares de couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). KAMBHAMPATI *et al.* (1992) analisaram espécies e populações do mosquito *Aedes*, identificando fragmentos RAPD espécies-específicos por meio de 2 *primers* RAPD. HOWELL *et al.* (1994) utilizaram a técnica RAPD para identificar 116 produtos de amplificação em germoplasmas de *Musa*, utilizando 9 *primers*. Identificaram marcadores RAPD que foram específicos para cada um dos 9 genótipos de *Musa*, podendo classificá-los em diferentes classes genômicas. STEWART & PORTER (1995) reconheceram indivíduos clonais em uma espécie de Malvaceae, *Hiamna corei*, considerada em extinção nos Estados Unidos, com somente 2 *primers* RAPD, dentre os testados. Além disso, esclareceram relações taxonômicas entre esta espécie e *H. remota*, as quais já foram classificadas como uma só espécie.

Uma nova abordagem para analisar tais populações seria estudar apenas os machos (indivíduos haplóides) minimizando assim a limitação da técnica RAPD em detectar os heterozigotos. Em indivíduos diplóides a dominância dos marcadores RAPD resulta na superestimativa da frequência de alelos representados por posições de bandas na população. O uso de apenas machos (haplóides) iria prevenir tal tendência e evitaria a formação de bandas compactas e heterodúplex que são observadas com grande frequência nos sistemas diplóides. Além disso, alelos em genomas haplóides estão sujeitos à altos níveis de seleção, o que similarmente ocorre com alelos ligados ao cromossomo X nos diplóides (HUNT & PAGE, 1992a; LU & RANK, 1996).

Outra abordagem seria a análise de regiões hipervariáveis. Recente isolamento de *loci* de DNA hipervariável, tal como mini e microssatélite, tem revolucionado a habilidade para identificar a estrutura de populações. Como exemplo, DNA *fingerprintings* podem ser indicadores úteis de mudanças na diversidade genética de populações em um curto período de tempo (HAIG, 1998).

A versatilidade e rapidez da técnica RAPD em monitorar populações, a grande quantidade de *loci* que podem ser analisados e a pequena quantidade de DNA do material biológico requerida, fazem com que os marcadores RAPD sejam de extrema

aplicabilidade em estudos de populações (KAMBHAMPATI, *et al.*, 1992; CHAPCO *et al.*, 1992; LU & HANK, 1996).

A detecção da diversidade dentro e entre populações é uma das maiores contribuições que os geneticistas conservacionistas podem dar para a avaliação da variabilidade genética. Conseqüências do fluxo ou perda de genes, em populações depauperadas geneticamente, mais fragmentada, e mais próxima ou distantes de outras podem ser estimadas previamente. Isto implica na identificação de populações que necessitem de novos indivíduos, ou que necessitem de futuras considerações demográficas ou ambientais (HAIG, 1998).

Informações genéticas referentes à população de Uberlândia são de extrema importância para a manutenção e conseqüente preservação das mesmas. Uma vez fora de sua área reprodutiva natural, estas colônias devem ser monitoradas continuamente, principalmente devido à sua sensibilidade à endogamia e perda da variabilidade dos alelos *xo*.

Os resultados apresentados neste estudo têm muita aplicabilidade em relação à população de Uberlândia. Mesmo com tentativas de aumentar a variabilidade genética na população, esforços maiores precisam ser feitos, com constantes introduções de novos indivíduos.

4. CONCLUSÕES

- A análise de 136 marcadores RAPD permitiu a separação das populações de *Melipona scutellaris*, com dissimilaridade genética máxima de 6.7%.
- As populações foram separadas em dois grupos. O primeiro grupo incluiu 11 genótipos: MG322, BA36, BA35, MG335, MG441, MG445, MG480, MG519, MG533, BA32 e BA34. E o segundo grupo abrangeu os 3 genótipos restantes: BA33, BA39 e BA38.
- Ocorreu o agrupamento de genótipos de Minas Gerais com genótipos da Bahia, demonstrando a proximidade genética entre as duas populações. Esse agrupamento indica que a população do Meliponário Uberlândia, isolada geograficamente, ainda não se apresenta geneticamente distante de sua população original nativa.
- Os genótipos da Bahia, apresentaram os maiores valores de distância genética intrapopulacional, confirmando sua maior variabilidade. Os representantes da população analisada estão em permanente contato com populações nativas, inseridos dentro de uma grande área reprodutiva.
- Os genótipos de Minas Gerais apresentaram-se geneticamente próximos, e em baixa variabilidade genética, o que pode ser decorrente do fato de estarem fora da área reprodutiva natural da espécie. Os esforços realizados para manter a variabilidade genética desta população devem ser contínuos e intensificados.
- A maioria dos *primers* não demonstrou divergência genética entre as duas populações. Esse baixo índice de polimorfismo, pode estar relacionado ao pouco tempo de separação entre elas (± 12 anos), considerados insuficientes para distanciar geneticamente duas populações.

• Foi detectado um marcador polimórfico, gerado pelo *primer* OPM15, que permitiu a separação das populações em dois grupos distintos: um correspondente aos genótipos de Uberlândia e o outro aos genótipos de Lençóis e Catu-BA. A presença deste marcador na população de Uberlândia, sugere que esta possa ter sofrido alterações genéticas. Tais alterações podem ter ocorrido devido à ação do Efeito de Fundador agravado pela endogamia, onde os poucos genes presentes nos indivíduos colonizadores foram selecionados, alterando as frequências alélicas em relação à população original, ou ainda, devido à hibridação da espécie com *Melipona capixaba*.

• A técnica RAPD mostrou-se como uma poderosa ferramenta para identificar a diversidade genética entre duas populações próximas, detectando o nível de variabilidade genética entre elas.

RESUMO

A criação racional das abelhas sem ferrão (Meliponíneos) pode ser uma alternativa para preservar muitas espécies que estão sendo seriamente ameaçadas de extinção, em consequência das alterações de seus habitats, além de facilitar as pesquisas científicas com as mesmas. Com esse intuito, foi criado o Meliponário Uberlândia-MG com colônias de *Melipona scutellaris* (Uruçu) trazidas da região de Lençóis e Catu-BA. Com a finalidade de analisar geneticamente a população de Uberlândia em relação às populações naturais originais, esse trabalho avaliou a divergência genética, por marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) entre tais populações. Foram testados 32 *primers* arbitrários que revelaram 136 marcadores RAPD, permitindo a separação das populações de *Melipona scutellaris* com dissimilaridade genética máxima de 6,7%. Dentre os *primers* testados, 11 demonstraram divergência entre as duas populações, gerando 16,2% de bandas polimórficas. Contudo, as amostras do Meliponário Uberlândia mostraram menor divergência genética, o que pode ser justificado pelo fato de estarem isoladas reprodutivamente há 12 anos de suas populações originais. O contrário foi observado nas amostras da Bahia, que estão em permanente contato com populações nativas, possuindo assim uma grande área reprodutiva. O *primer* OPM 15 revelou um marcador polimórfico, de aproximadamente 380 pb, entre as duas populações, separando-as em 2 grupos distintos (um correspondente à população de Uberlândia e outro à da Bahia). Esses dados sugerem que esta espécie, na população de Uberlândia, pode ter sofrido alguma alteração genética após sua fundação. A primeira suposição é que a banda população-específica represente um alelo que já estava presente na população original, porém numa baixa proporção. Uma vez que a população de Uberlândia foi submetida à uma pequena área reprodutiva, a proporção desse alelo na população aumentou. A segunda, é que possa ter ocorrido a introdução de diferentes alelos nesta população devido à hibridação com *Melipona capixaba*. Os resultados apresentados neste estudo têm muita aplicabilidade em relação à população de Uberlândia e mesmo com tentativas de aumentar a variabilidade genética na população, esforços maiores precisam ser feitos com constantes introduções de novos indivíduos e colônias da área de origem. A técnica RAPD se mostrou como uma poderosa ferramenta para identificar a diversidade genética entre duas populações próximas, detectando o nível de variabilidade entre elas.

SUMMARY

The stingless beekeeper (*Meliponineos*) can be an alternative to preserve a lot of species in risk of extinction, as consequence of the alterations of their habitats, besides facilitating the scientific researches with this species. Uberlândia's Meliponary was created in order to keep colonies of *Melipona scutellaris* (Uruçu) for beekeeper programs and biology's researches. The colonies came from Lençóis and Catu, both cities from the Brazilian State of Bahia. Our work analyzed the genetic divergence among the population of Uberlândia in relation to the original natural populations, using molecular techniques called RAPD markers (Random Amplified Polymorphic DNA). Thirty-two arbitrary primers were tested and they revealed 136 markers RAPD, allowing the separation of the populations of *Melipona scutellaris* with the maximum genetic dissimilarity of 6,7%. Concerning the tested primers, 11 demonstrated divergence between the two populations, generating 16,2% of polymorphic bands. However, the Uberlândia's Meliponary samples showed smaller genetic divergence, what can be justified by the fact of 12 years of reproductive isolation among the original populations. The opposite was observed in the samples from Bahia, that are in permanent contact with native populations, possessing like this a great reproductive area. The primer OPM 15 revealed a polymorphic marker, of ~ 380 pb, among the two populations, separating them in 2 different groups (one of them corresponding to the population of Uberlândia and the other one, to the population of Bahia). Those data suggest that this species, in the population of Uberlândia, can have been suffering some genetic alterations after its foundation. The first supposition is that the population-specific band represents an allele that was already present in the original population, even so in a low rate. Once the population of Uberlândia was submitted to a small reproductive area, the proportion of this allele in the population increased. Second, it can be happened the introduction of different alleles in this population due to the hybridization with *Melipona capixaba*. The results presented in this study have a lot of applications in relation to the population of Uberlândia and even with attempts of increasing the genetic variability in the population, larger efforts are necessary with constant introductions of new individuals and colonies of the original area. Technical RAPD was shown as a powerful tool to identify the genetic diversity among close two populations, detecting the variability level among them.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADI, R.; PERL-TREVES, R. & LEVY, Y. 1996. Molecular variability among *Exserohilum turcicum* isolates using RAPD (random amplified polymorphic DNA). **Can. Jour. Plant Path.** 18: 29-34.
- ABSY, M.L.; CAMARGO, J.M.F.; KERR, W.E. & MIRANDA, I.P.A., 1984. Espécies de plantas visitadas por Meliponinae (Hymenoptera; Apoidea) para coleta de pólen na região do médio Amazonas. **Rev. Brasi. Biol.**, (Rio de Janeiro, RJ) 44(2): 227-237.
- ADIS, J. 1990. Thirty million arthropod species - too many or too few ? **Journal of Tropical Ecology** 6: 115-118.
- AIDAR, D.S. 1996. A mandaçaia: **Biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Série Monografias 4, 103p.
- AIDAR, D.S. 1997. Meliponicultura e Ecossistema: Preservação, Formação de Colônias, Manejo e Alimentação de Meliponíneos (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). In: **Ann. Simpósio Paranaense de Apicultura (12)**: 48-55. Guarapuava, PR, Brasil.
- AIDAR, D.S. 1999. **Variabilidade genética entre populações de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier e *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Tese de Doutorado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Ribeirão Preto, SP, 67p.
- CABRAL, T.A.T. 1997. **Divergência genética entre genótipos de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) estimada por análise de marcadores RAPD**. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 54p.
- CAMARGO, J.M.F. 1989. Comentários sobre a sistemática de Meliponinae (Hymenoptera: Apidae). In: **An. XIV Simp. Anual da ACIESP**. 68 (suppl.): 41-61.
- CAMARGO, J.M.F. & PEDRO, S.R.M. 1992. Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. **Apidologie** 23: 509-522.

- CAMPOS, A.P.S. 1997. **Co-amplificação da sequência 16S do RNA ribossomal mitocondrial de *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponinae) por bactérias simbióticas.** Monografia, Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia, MG, 25p.
- CARTER, M.C.A.; ROBERTSON, J.L.; HAOACK, R.A.; LAWRENCE, R.K. & HAYES, J.L. 1996. Genetic relatedness of North American populations of *Tomicus piniperda* (Coleoptera: Scolytidae). *Jour. of Econ. Entomol.* **89(6)**: 1345-1353.
- CARVALHO, G.A. 1996. **Monitoramento dos alelos sexuais XO em uma população finita de *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini).** Tese de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 51p.
- CHAPCO, W.; ASHTON, N.W.; MARTEL, R.K.B.; ANTONISHYN, N. & CROSBY, W.L. 1992. A feasibility study of the use of RAPD in the populations genetics and systematics of grasshoppers. *Genome* **35**: 569-574.
- CONTEL, E.P.B. & MESTRINER, M.A. 1974. Esterase polymorphisms at two loci in the social bee. *Jour. Hered.* **65**: 349-352.
- CONTEL, E.P.B. & MESTRINER, M.A. 1975. Developmental protein pattern in two species of stingless bees: *Melipona quadrifasciata anthidioides* and *Melipona subnitida*. *Ciência e Cultura* **27**: 1221-1224
- COSTA, M.A. 1998. **Sistemática Molecular de Meliponini S. L. (Hymenoptera, Apidae, Apinae) inferida com base em seqüências do gene ribossomal mitocondrial 16S e Estudo das Relações Filogenéticas entre espécies do gênero *Plebeia* por meio da Análise de Caracteres Isoenzimáticos e Citogenéticos.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, SP, 90p.
- CRUZ, C.C. 1960. **Contribuição ao Estudo da Evolução das Abelhas (Hymenoptera, Apidae).** Tese apresentada ao Colégio Estadual de São Paulo, para o cargo de professor catedrático da Cadeira de História Natural, Rio Claro, São Paulo, 75p.
- CURSINO, J.R. & CONTEL, E.P.B. 1991. Estimativa da variabilidade genética em gêneros de Meliponídeos, abelhas sem ferrão. *Rev. Bras. Genet.* **14(3)**: 113.
- DEL LAMA, M.A. & MESTRINER, M.A. 1984. Starch gel electrophoresis patterns of exopeptidase phenotypes in 14 different species of bees. *Rev. Bras. Genet.* **7**: 09-20.

- DIMOPOULOS, G.; ZHENG, L.; KUMAR, V.; TORRE, A.; KAFATOS, F.C. & LOUIS, C. 1996. Integrated genetic map of *Anopheles gambiae*: Use of RAPD polymorphisms for genetic, cytogenetic and STS landmarks. **Genetics** **143**: 953-960.
- DZIERZON, J. 1845. On the development of bees. **Eichstadt Bienenzeitung** **1**:113. (Tradução para o inglês).
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1996. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2^a. Ed., EMBRAPA-CENARGEM, Brasília, DF, pp.16-23.
- FUTUYMA, D.J. 1992. **Biologia Evolutiva**. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética. pp. 253-254.
- GIOVANNONI, J. J.; WING, R. A.; GANAL, M. W. & TANKSLEY, S. D. 1991. Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping population. **Nucleic Acids Res.** **19**: 6553-6558.
- HAIQ, S.M. 1998. Molecular contributions to conservation. **Ecology** **79**(2): 413-425.
- 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 identification and classifying *Musa* germoplasm. **Genome** **37**: 328-332.
- HOY, M.A. 1994. **Insect Molecular Genetics: An introduction to principles and applications**. Academic Press, San Diego. Chapters 13, 14, 546p.
- HU, J. & QUIROS, C.F. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. **Plant Cell Rep.** **10**: 505-511.
- HUNT, J.G. & PAGE, R.E. Jr. 1992a. Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. **Theor. Appl. Genet.** **85**: 15-20.
- HUNT, J.G. & PAGE, R.E. Jr. 1992b. Linkage analysis of sex determination in the honey bee (*Apis mellifera*). **Mol. Gen. Genet.** **244**: 512-518.
- HUNT, J.G. & PAGE, R.E. Jr. 1995. Linkage Map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on markers RAPD. **Genetics** **139**: 1371-1382.

- KAMBHAMPATI, S.; BLACK IV, W.C. & KARAMJIT, S. R. 1992. Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): Techniques, Statistical Analysis and Applications. **Journal of Medical Entomology** 29(6): 939-945.
- KHANDKA, D.K.; TUNA, M.; TAL, M.; NEJIDAF, A. & GOLAN-GOLDHIRSH, A. 1997. Variability in the pattern of random amplified polymorphic DNA. **Electrophoresis** 18: 2852-2856.
- KERR, W.E. & MAULE, V. 1964. Geographic distribution of stingless bees and its implications (Hymenoptera, Apidae). **J. New York Ent. Soc.** 57: 2-17.
- KERR, W.E. 1975. Genética da determinação do sexo em abelhas. X. Programação de atividade dos genes determinadores de sexo e casta. **Anais do 3º Congresso Brasileiro de Apicultura**. Piracicaba, SP. pp 179-187.
- KERR, W.E.; CUNHA, R. & PISANI, J.F. 1978. Genética de determinação do sexo XII. Aplicação de métodos numéricos para agrupar sexos e castas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Apidae). **Ver. Brasil. Biol.** 38(2): 319-394.
- KERR, W.E. & VENCOVSKY, R. 1982. Melhoramento genético em abelhas. I. Efeito do número de colônias sobre o melhoramento. **Brazilian Journal of Genetics** 5: 279-285.
- KERR, W.E.; CARVALHO, G.A. & NASCIMENTO, V.A. 1996. **Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação**. Ed. Fundação Acangaú, 143p.
- KHANDKA, D.K.; TUNA, M.; TAL, M.; NEJIDAF, A. & GOLAN-GOLDHIRSH, A. 1997. Variability in the pattern of random amplified polymorphic DNA. **Electrophoresis** 18: 2852-2856.
- KRAUS, B. & HUNT, G. 1995. Differentiation of *Varroa jacobsoni* Oud populations by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Apidologie** 26: 283-290.
- 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.

- LAURENT, V.; WAJNBERG, E.; MANGIN, B.; SCHIEX, T.; GASPIN, C. & VANLERBERGHE-MASUTTI, F. 1998. A composite map of the parasitoid wasp *Trichogramma brassicae* based on RAPD markers. **Genetics** 150: 275-282.
- LIMA, L.M.K.S. & MESTRINER, M.A. 1985. Starch gel electrophoretic patterns of esterases and nonspecific proteins in 11 different species of Meliponine bees. **Rev. Brasil. Genet.** 8: 639-652.
- LOU, K.F.; WEISS, M.J.; BRUCKNER, P.L.; MORILL, W.L.; TALBERT, L.E. & MARTIN, J.M. 1998. RAPD variation within and among geographic populations of wheat steam sawfly (*Cephus cinctus* Norton). **The Journal of Heredity** 89(4): 329-335.
- LU, L. & 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.
- MACHADO, M.F.P.S.; CONTEL, E.P.B. & BARBOSA, C.A.A. 1992. MDH (EC 1.1.1.37) polymorphism in *Plebeia droryana* (Hymenoptera, Apidae). **Genetic (Life Sci. Adv.)** 11: 25-26.
- MARIANNO FILHO, J. 1911. **Ensaio sobre as Meliponidas do Brasil**. pp. 71-75. Tipografia Besnard Frères. Rio de Janeiro.
- MAYR, E. 1954. Change of genetics environment and evolution. In: FUTUYMA, D.J. 1992.
- MEUNIER, J.R. & GRIMONT, P.A.D. 1993. Factors affecting reproductibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Res. Microbiol.** 144: 373-379.
- MICHENER, C.D. 1990. Classification of the Apidae. **Sci. Bull. Univers. Kansas.** 54(4): 76-164.
- MILCHEMORE, R.W.; PAVAN, I. & KESSELI, R.V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88(21): 9828-9832.
- MOURE, J.M. 1961. A preliminary supra-specific classification of the old world Meliponinae bees (Hymenoptera, Apoidea). **Studia Entomol.** 4 (1-4): 181-242.

- MOURE, J.S. & CAMARGO, J.M.F. 1994. *Melipona (Michmelia) capixaba*, uma nova espécie de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) do Sudeste do Brasil. **Ver. Bras. Zool.** 11(2): 289-296.
- MURALIDHARAN, K. & WAKELAND, E.K. 1993. Concentration of primer and template qualitatively affects products in random amplified polymorphic DNA PCR. **BioTechniques** 14: 362-364.
- NAGARAJA, G.M. & NAGARAJU, J. 1995. Genome fingerprinting of the silkworm, *Bombyx mori*, using random arbitrary primers. **Electrophoresis** 16: 1633-1638.
- NASCIMENTO, V.A. 1996. **Aspectos Biológicos, Ecológicos e Genéticos da *Melipona (Michmelia) capixaba* – Moure e Camargo, 1994 (Hymenoptera, Apidae)**. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 73p.
- NASCIMENTO, V.A. & MATUSITA, S.H. 1996. Hybridization evidences in two species of *Melipona*. **Braz. Jour. Genetics (suppl.)** 19(3): 273.
- NASCIMENTO, V.A.; MATUSITA, S.H. & KERR, W.E. 1999. Evidence for hybridization between two species of *Melipona* bees. **Genetics and Molecular Biology** (in press).
- NOGUEIRA-NETO, P.N. 1997. **A vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo, Ed. Nogueirapis, 445p.
- O'DONNELL, S. 1996. RAPD markers suggest genotypic effects on forager specialization in a eusocial wasp. **Behav. Ecol. Sociobiol.** 38: 83-88.
- OLIVEIRA, R.C. 1998. **Divergência genética por marcadores RAPD em *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, MG, 50p.
- PARKER, P.G.; SNOW, A.A.; SCHUG, M.D.; BOOTON, G.C. & FUERST, P.A. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology** 79(2): 361-382.
- PAXTON, R.J.; THORÉN, P.A.; TENGO, F.; ESTOUP, A. & PAMILO, P. 1996. Mating structure and nestmate relatedness in a communal bee, *Adrena jacobii* (Hymenoptera: Adrenidae), using microsatellite. **Molecular Ecology** 5: 511-519.

- PAXTON, R.J.; WEIßSCHUH, N.; ENGELS, W.; HARTFELDER, K. AND QUEZADA-EUÁN, J.J.G. 1999. Not only single mating in stingless bees. *Mol. Ecol.* 7: 787.
- RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. 1993. Genetic diagnostic in plant breeding: RAPD, microsatellites and machines. *Trends in Genetics* 9(8): 275-280.
- REITER, R. S.; WILLIAMS, J.; FELDMANN, K. A.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. & SCOLNICK, P. A. 1992. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1477-1481.
- RESENDE, S.H.M. 1997. Padrão de esterases durante o desenvolvimento embrionário de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Meliponinae). Tese de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, MG, 51p.
- ROIG-ALSINA, A. & MICHENER, C.D. 1993. Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). *The University of Kansas Science Bulletin* 55(4): 123-162.
- ROUBIK, D.W. 1989. Ecology and natural history of tropical bees. Cambridge, Univerty Press, New York, 514p.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R. HORN, G.T.; MULLIS, K.B. & ERLICH, H.A. 1988. Primer-Directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- SAKAGAMI, S.F. 1982. Stingless bees. In HERMANN, H.R. *Social Insects* (New York, Academic Press) 3: 361-423.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 3:B.23,E.6.
- SANTOS, J.R.C. 1993. Estudo Comparativo dos Padrões Isoenzimáticos e de proteínas não catalíticas em espécies de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae). Tese de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, SP, 148p.
- SCHIERWATER, B. 1995. Arbitrarily amplified DNA in systematics and phylogenetics. *Electrophoresis* 16: 1643-1647.

- STEWART, C.N. & PORTER, D.M. 1995. RAPD profiling in biological conservation: an application to estimating clonal variation in rare and endangered *Hiamna* in Virginia. **Biol. Consevation** 74: 135-142.
- SUAZO, A.; MCTIERMAN, R. & HALL, H.G. 1998. Differences between African and European Honey Bees (*Apis mellifera* L.) in random amplified polimorphic DNA (RAPD). **Jour. Heredity** 89(1): 32-36.
- TABERNER, A.; DOPAZO, J. & CASTAÑERA, P. 1997. Genetic characterization of populations of a DE NOVO arisen sugar beet pest, *Aubeonymus mariaefranciscæ* (Coleoptera, Curculionidae), by RAPD anlysis. **Jour. Mol. Evol.**45(1): 24-31.
- TAVARES, M.G.; CAMPOS, L.A.O.; BARROS, E.G. and OLIVEIRA, M.T.V.A. 1999. Padrões de herança de marcadores RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) em *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Genetics and Molecular Biology** 22(3) suppl.: 315.
- TAVARES, M.G.; BARROS, E.G.; CAMPOS, L.A.O.; and OLIVEIRA, M.T.V.A. 1999. Mapa de ligação de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) baseado em marcadores RAPD. **Genetics and Molecular Biology** 22(3) suppl.: 315.
- TINGEY, S.V.; RAFALKI, J.A. & WILLIAMS, J.G.K. 1992. Genetic Analysis with RAPD Markers. **Proceedings of the Symposium (in) Applications of RAPD Technology to Plant Breeding**. p. 3-8.
- VASCONCELOS, S.M. 1998. **Divergência genética entre populações de *Melipona rufiventris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, MG, 49p.
- WALDSCHMIDT, A.M.; MARCO JR, P.; BARROS, E.G. SALOMÃO, M.F.; DIAS, L.A. AND CAMPOS, L.A.O. 1998. Uso de marcadores moleculares RAPD para estimar variabilidade genética intracolonial em *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Geneticas and Molecular Biology** 21(3) suppl.: 82.
- WEEDEN, N.F.; TIMMERMAN, G.M.; HEMMANT, M.; KNEEN, B.E. & LODHI, M.A. 1992. Inheritance and Reliability of RAPD markers. **Application of RAPD Technology to Plant Breeding**, Minneapolis, pp. 12-17.

- WELSH, J. & McCLELLAND, M. 1990. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. **Nucleic Acids Res.** **19**: 5275-5279.
- 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.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** **18(22)**: 6531-6535.
- WILLIAMS, J.G.K.; HANAFEY, M.K.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology** **218**: 704-741.
- WILLE, A. 1983. Biology of the stingless bees. **Ann. Rev. Entomol.** **28**: 41-64.

ÍNDICE REMISSIVO

- A**
- abelhas indígenas sem ferrão..... 1, 2, 19, 49
 - absorbância..... ix, 23
 - aclimatação fisiológica..... 36
 - AFLP..... 7
 - alelos paternos..... 22
 - alelos *xo* 4, 38
 - alteração genética 35, 41
 - amplificação 23
 - amplificação termocíclica 8
 - análise de *cluster* 11, 13, 26, 31
 - Animalia..... 1
 - Apidae..... 1, 2, 43, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51
 - Apini, Meliponini, Bombini e Euglossini..... 1
 - Apis cerana* 11
 - Apis mellifera* 11, 14, 15, 16, 46, 50
 - Apoidea..... 1, 43, 48, 50
 - AP-PCR..... 8
 - Arthropoda 1
- B**
- bactérias simbióticas..... 22, 44
 - banda população-específica..... 35, 41
 - Bovine Serum Albumin 24
 - brometo de etídio..... 26
 - bulk* 10, 11, 22
 - Bulk Segregant Analysis* 10
- C**
- coeficiente de Jaccard..... 16
 - concentração de DNA..... 24, 28
 - contaminações e artefatos..... 24
 - controle negativo 24
 - Cretáceo 1
- D**
- dendrograma 31, 33, 34
 - deriva genética 35
 - desnaturação, anelamento e extensão 7
 - determinação de castas 4
 - determinação de sexo..... 3, 14
 - dissimilaridade genética..... 30, 31, 33, 39, 41
 - distância genética limite..... 33
 - distâncias genéticas vii, 26, 29, 30, 31, 32, 34
 - DNA *fingerprintings*..... 38
 - DNA genômico vi, 8, 10, 22, 23, 24, 28
 - DNA hipervariável 38
 - DNA polimerase..... 7, 24, 28
 - DNA_{mt}..... 6
 - dNTPs..... 7
- E**
- Efeito de Fundador 35, 40
 - eletroforese..... viii, 6, 23, 35, 37
 - endogamia..... 32, 36, 38, 40
- F**
- fluxo ou perda de genes 38
- G**
- gel de agarose..... viii, 23, 26, 35, 37
 - genes aditivos 3
 - genes determinantes de casta..... 4
 - genes parcialmente não aditivos..... 3
- H**
- haplo-diploidia 3
 - hibridação 5, 7, 15, 36, 40, 41
 - híbrido fértil..... 36

| | |
|---|---|
| Hymenoptera | 1, 3, 5, 15, 43, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51 |
| I | |
| impressão digital | 8 |
| Insecta | 1 |
| isoenzimas | 6, 13 |
| isótopos radioativos | 8 |
| L | |
| <i>locus STS</i> | 14 |
| <i>locus xo</i> | 4, 15 |
| M | |
| <i>M. capixaba</i> | 4, 5, 36 |
| <i>M. quadrifasciata</i> | 6, 16, 20 |
| <i>M. rufiventris</i> | 3 |
| machos diplóides | 4 |
| magnésio | ix, 7 |
| mapa de ligação | 15, 16 |
| marcadores alélicos | 14 |
| marcadores genéticos dominantes | 9 |
| marcadores genéticos população-específico | 35 |
| marcadores moleculares | 5, 8, 45, 51 |
| marcadores morfológicos | 5 |
| marcadores RAPD9 | 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 37, 38, 39, 41, 43, 49, 51 |
| matriz binária | 26 |
| <i>Melipona scutellaris</i> | vi, vii, viii, 2, 4, 18, 19, 20, 21, 24, 28, 30, 31, 35, 39, 41, 44, 49 |
| <i>Melipona subnitida</i> | 6, 44 |
| Meliponário Uberlândia | 19, 20, 21, 22, 32, 33, 39, 41 |
| mini e microssatélites | 6 |
| P | |
| partenogênese arrenótoca | 3 |
| PCR | 6, 7, 8, 14, 24, 48, 51 |
| <i>pools</i> | 10, 22, 45 |
| porcentagem de desacordo | vii, viii, 26, 32 |
| pressões seletivas | 35 |
| <i>primers</i> | vi, vii, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 23, 24, 28, 29, 32, 33, 36, 37, 39, 41, 45, 48, 51, 52 |
| <i>primers</i> polimórficos | 29 |
| R | |
| rainhas fisogástricas | 20, 34 |
| RAPDvi | vii, viii, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 23, 28, 31, 32, 36, 37, 38, 40, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 49, 50, 51 |
| região Neotropical | 2 |
| RFLP | 5, 7, 15 |
| RNA <i>display</i> | 7 |
| S | |
| sistema | 4 |
| sistemas enzimáticos | 6 |
| T | |
| <i>Tetragonisca angustula</i> | 15, 20, 43, 49 |
| U | |
| UPGMA | viii, 26, 32 |
| uruçu | 2, 3, 19 |
| V | |
| VNTR | 7 |
| X | |
| Xylocopinae, Nomadinae e Apinae | 1 |
| Z | |
| Zona da Mata | 3 |