

MON
595.797-115
V331 d
TES/NGM

Soraya Matos de Vasconcelos

DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE
POPULAÇÕES DE *Melipona rufiventris*
(HYMENOPTERA, APIDAE,
MELIPONINAE)

DIRBI/UFU



1000183779

UBERLÂNDIA - MG
Maio 1998

DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES DE
Melipona rufiventris
(HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINAE)

Soraya Matos de Vasconcelos

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

UBERLÂNDIA - MG
Maio 1998

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr
Orientador

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho
Co-Orientador

Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares

Membros Suplentes

Profa. Dra. Cecília Lomônaco de Paula

Prof. Dr. Malcom Antônio M. Brandemburgo

UBERLÂNDIA - MG
Maio 1998

À DEUS

Por me guiar por todos os caminhos.

Os que já caminhei

e os que ainda caminharei.

AGRADEÇO.

À MINHA FAMÍLIA,

meu porto seguro e

fonte das minhas maiores alegrias.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e benções todos os dias concedidas.

Ao **Prof. Warwick Estevam Kerr**, pela oportunidade de realização deste trabalho e pela valiosa orientação. Pelo exemplo de entusiasmo e dedicação à vida, ao ser humano e à ciência.

Ao **Prof. Luíz Ricardo Goulart Filho**, pela orientação na parte molecular e pelo interesse e disponibilidade para colaborar durante todo o trabalho e ainda, pelo incentivo constante.

Aos Professores Warwick Estevam Kerr, Luíz Ricardo Goulart Filho, Ademilson Espencer Egea Soares, Cecília Lomônaco e Malcom Antônio M. Brandemburgo, pela participação na Banca Examinadora para defesa de Tese e pelas sugestões apresentadas.

A todos os Prof. do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica pelos ensinamentos ministrados.

A todos os amigos dos Laboratórios de Genética, que me proporcionaram grandes e pequenas alegrias diárias. Pelo nosso convívio, pelo carinho e por todos os ensinamentos científicos ou não, o meu sincero obrigada.

À amiga, Rosana C. Oliveira, pelo companheirismo, pela amizade. pelo apoio em todos os momentos.

As companheiras de república Wânia e Juliana que me apoiaram e me fizeram sorrir tantas vezes com sua alegria contagiante e imenso bom humor.

Aos amigos Rosana Oliveira e Mauricio Bezerra pela colaboração neste trabalho com as amostras de Mirador-MA e Grupiara-MG.

Ao Grupo do **CEFAS** (Centro Educacional São Francisco de Assis): pela colaboração na coleta do material biológico utilizado neste trabalho, pela amizade, carinho e exemplo de vida dedicada ao população carente da região de Floriano-Pi. Especialmente agradeço ao Eng. Agrônomo **Francisco das Chagas Filho** por toda ajuda e atenção.

À família de **Wilson Melo** pelo carinho com que me receberam em sua casa e pela valiosa ajuda na coleta de material biológico em Barra do Corda-MA.

Ao Eng. Agrônomo e Meliponicultor **Ivan Costa e Souza** pelos ensinamentos sobre o manejo em *Melipona rufiventris*, pela atenção e valioso auxílio na coleta de material biológico na região de Gandu-BA

À Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade oferecida, ao CNPq pela bolsa de estudos concedida, a FAPEMIG pelo apoio ao projeto.

SUMÁRIO

ABREVIACES.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
1. INTRODUO.....	1
1.1. A espécie <i>Melipona rufiventris</i>	2
1.2. Marcadores Moleculares.....	4
1.2.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	5
1.2.2. RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA).....	6
1.3. O DNA mitocondrial e o gene da sub-unidade maior do RNA ribossomal mitocondrial (16S rRNA).....	7
1.4. SSCP(Single Strand Conformation Polimorfism).....	8
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Material Biolgico.....	11
3.2. Análise Molecular.....	14
3.2.1 Extrao de DNA.....	14
3.2.2 Quantificao do DNA em espectroftmetro.....	14
3.2.3. Amplificao ao Acaso de DNA Polimrfico-RAPD.....	15
3.2.4 Visualizao dos produtos amplificados.....	16
3.2.5 Análise dos dados.....	17
3.2.6 Caracterizao de polimorfismo do gene RNAr 16S do DNA mitocondrial por SSCP.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSO.....	19
4.1 Análise Molecular por marcadores RAPD.....	19
4.2 Análise Molecular do gene 16S rRNA do DNA mitocondrial por SSCP (Single strand conformation polymorphism).....	30
5. CONCLUSES.....	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	35

ABREVIACOES

ABS	absorbância
dATP	5' desoxiadenosina trifosfato
dCTP	5' desoxicitosina trifosfato
dGTP	5' desoxiguanosina trifosfato
DNA	cido desoxiribonucléico
dTTP	5' desoxitimidina trifosfato
EDTA	cido etilenodiaminotetra acético sal dissódico
g	grama (s)
h	hora (s)
HCl	cido clorídrico
KCl	cloreto de potássio
M	molar
MA	miliampere (s)
mg	miligrama (s)
MgCl ₂	cloreto de magnésio
min.	minuto (s)
ml	mililitro (s)
mM	milimolar
mtDNA	DNA mitocondrial
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanograma (s)
nm	nanmetro
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	pares de base
tris	tris (hidróxido metil amino metano)
UV	ultravioleta
V	volts
μ g	micrograma (s)
μ l	microlitro (s)

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Vista interna de ninho de <i>Melipona rufiventris</i>	11
2	Localização geográfica das populações utilizadas para análise de divergência genética.....	13
3	Padrão de amplificação de fragmentos de DNA (RAPDs) obtido com o <i>primer</i> OPC 06 para 22 genótipos analisados por eletroforese em gel de agarose (1,5 %). M-marcador de peso molecular de DNA, <i>Melipona rufiventris</i> 1-Grupiara-MG, 2 e 3-Ituiutaba-MG, 4-Campina Verde-MG, 5-Domingos Martins, 6-Blumenau-SC, 7 a 11-Gandu-BA, 12,13 e 15 - Esperantina-PI, 14 e 16-Campo Maior-PI, 17 a 19 e 21-Barra do Corda-MA, 20-Mirador-MA, 22- <i>Apis mellifera</i>	21
4	Padrão de amplificação de fragmentos de DNA (RAPDs) obtido com o <i>primer</i> Gou 8 para 22 genótipos analisados por eletroforese em gel de agarose (1,5 %). M-marcador de peso molecular de DNA, <i>Melipona rufiventris</i> 1-Grupiara-MG, 2 e 3-Ituiutaba-MG, 4-Campina Verde-MG, 5-Domingos Martins, 6-Blumenau-SC, 7 a 11-Gandu-BA, 12,13 e 15 - Esperantina-PI, 14 e 16-Campo Maior-PI, 17 a 19 e 21-Barra do Corda-MA, 20-Mirador-MA, 22- <i>Apis mellifera</i>	22

- 5 Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e método UPGMA entre 22 genótipos de 21 de *Melipona rufiventris* e 1 de *Apis mellifera*. Baseado em 84 marcadores RAPD obtidos por *primers* curtos..... 23
- 6 Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e método UPGMA entre 22 genótipos de 21 de *Melipona rufiventris* e 1 de *Apis mellifera*. Baseado em 84 marcadores RAPD obtidos por *primers* longos..... 24
- 7 Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e método UPGMA entre 22 genótipos de 21 de *Melipona rufiventris* e 1 de *Apis mellifera*. Baseado em 84 marcadores RAPD obtidos por *primers* longos e curtos..... 25
- 8 Padrão de variabilidade gerado por *primer* correspondente a região de 534 pb do gene mitocondrial 16S rRNA. 1-*Apis mellifera*, 2-Santa Catarina, 3-Espírito Santo, 4-Minas Gerais, 5-Bahia, 6-PiauÍ, 7-Maranhão..... 31

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Localização dos pontos de coleta de amostras de <i>Melipona rufiventris</i>	12
2	Lista dos <i>primers</i> curtos utilizados para amplificar o DNA dos 22 genótipos e suas respectivas seqüências de nucleotídeos.....	15
3	Lista de <i>primers</i> longos utilizados para amplificar o DNA dos 22 genótipos e suas respectivas seqüências.....	16
4	Relação do número total de bandas amplificadas e polimórficas por <i>primer</i> curto testado.....	21
5	Relação do número total de bandas amplificadas e polimórficas por <i>primer</i> longo testado.....	22

RESUMO

A abelha sem ferrão da espécie *Melipona rufiventris*, Lepelletier 1836, existente desde o norte do Brasil estendendo-se até Santa Catarina, assim como outros Meliponíneos têm tido seu número grandemente reduzido pelos desmatamentos e queimadas das nossas florestas, e pela ação indiscriminada dos meleiros .

A enorme ocupação territorial de *Melipona rufiventris* tem ocasionado o fracionamento de suas populações e concomitantemente, o seu isolamento geográfico.

Por meio de métodos moleculares estimou-se as relações evolucionárias envolvidas no processo de especiação em suas populações. Análises moleculares permitiram comparações de seqüências de DNA nuclear e do gene rRNA 16S mitocondrial produzindo dados que convertidos possibilitaram estimar seqüências divergentes entre as populações analisadas.

A análise de 84 marcadores RAPD permitiu a separação de três grupos distintos com 27% de distância genética. O grupo 1 representado pela população de Minas Gerais, como o geneticamente mais distante dos demais. O grupo 2 representado pela população de Santa Catarina como o segundo mais divergente e o terceiro grupo representado pelas populações do Espírito Santo, Bahia, Piauí e Maranhão. Houve grande similaridade intra populacional para todas as populações amostradas. Pequena similaridade foi encontrada entre populações com exceção das mais próximas geograficamente como as do Piauí e Maranhão e entre as do Espírito Santo e Bahia.

A análise de mutações do fragmento do gene mitocondrial 16S rRNA pela técnica de SSCP revelou três haplótipos entre as populações analisadas. O primeiro reuniu as populações do Maranhão, Piauí e Bahia. O segundo grupo foi formado pelas populações de Santa Catarina e Espírito Santo e o terceiro pela população de Minas Gerais. Houve concordância entre as taxas de divergência do DNA nuclear e mitocondrial (para o gene analisado). Houve variação entre os resultados obtidos pelas metodologias empregadas para a população do Espírito Santo. O mesmo haplótipo foi obtido para as populações de Santa Catarina e Espírito Santo, sendo que tais populações por marcadores RAPD encontram-se em grupos distintos. Estes resultados revelam uma possível zona de contato entre dois grupos com taxas diferenciadas de evolução para o DNA nuclear e mitocondrial.

1.INTRODUÇÃO

As abelhas sem ferrão pertencem à família Apidae e subfamília Meliponinae. Essa subfamília se divide em dois grandes grupos: tribo Meliponini, que inclui um único gênero, *Melipona*, que possui 40 espécies e a tribo Trigonini, compreendendo 54 gêneros e cerca de 300 espécies. A maior diversidade de Meliponinae é encontrada na região neotropical, com 30 gêneros e cerca de 300 espécies descritas. Já na região Indomalásia têm-se 14 taxa supra específicos e 60 espécies descritas. Na África há 10 gêneros com 50 espécies. Em Madagascar é conhecido apenas 1 único gênero com 4 espécies. Na Nova Guiné foram descritos 4 gêneros e 5 espécies e na Austrália ocorrem 2 gêneros com aproximadamente 10 espécies (CAMARGO & PEDRO, 1992).

As abelhas se integram nos ecossistemas em que vivem, de onde obtêm recursos alimentares. ABSY *et al.* (1984) mostrou que 8% das árvores do médio Amazonas são polinizadas por diversas espécies de abelhas e que 14% são polinizadas por apenas uma espécie de abelha. Nas matas de terra firme as abelhas brasileiras constituem-se nos polinizadores principais de 90% das árvores brasileiras (KERR *et al.*, 1994).

VASIL & HERRERA-ESTRELA (1994) alertaram para a necessidade de se tentar manter a diversidade vegetal de nossos ecossistemas e de se preservarem as espécies vegetais sivistres ameaçadas de extinção pela crescente destruição das florestas naturais.

Nos trópicos onde existe abundância de espécies vegetais e elevado número de meliponíneos, observa-se uma grande variação no tamanho de indivíduos entre as espécies o que proporciona grande eficiência destes importantes

agentes polinizadores no ciclo reprodutivo dos vegetais tropicais (ROUBIK, 1989).

1.1 A espécie *Melipona rufiventris*

A abelha sem ferrão, *Melipona rufiventris* LEPELLETIER 1836, foi descrita por MOURE & KERR (1950) que apresentaram, além de dados sobre os caracteres morfológicos fundamentais da espécie, uma divisão em 5 subgrupos: *Melipona rufiventris rufiventris*, *Melipona rufiventris flavolineata*, *Melipona rufiventris paraensis*, *Melipona rufiventris brachychaeta* e *Melipona rufiventris dubia* com suas respectivas distribuições geográficas. Ocorre desde o norte do Brasil (Amazonas, Pará, Amapá, Maranhão) até o Centro-sul do Brasil (Goiás, Minas Gerais, sul da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo Paraná e Santa Catarina). Tal grupo não sofreu revisão até o momento e não se conhece bem as variações que tais populações possam ter sofrido com as modificações de seus habitats, após terem sido descritas.

Melipona rufiventris assim como outros Meliponíneos tem tido seu número grandemente reduzido pelos desmatamentos e queimadas das nossas florestas, e pela ação indiscriminada dos meleiros. A redução de suas populações poderá ter como consequência a perda de variabilidade e a produção de machos diplóides, como anteriormente verificado em *Melipona quinquefasciata* (KERR & TARELHO 1973 *apud* KERR 1996), *Trigona quadrangula*, (TARELHO 1973 *apud* KERR 1996), *Melipona quadrifasciata*, (CAMARGO, 1974 *apud* KERR, 1996).

Tentativas consideradas promissoras de endocruzamentos para obter híbridos em *Apis* foram abandonados por apresentarem problemas como a perda rápida de variabilidade e vigor de rainhas e zangões. Populações fechadas com 35 a 50 colônias podem manter aceitável variabilidade durante o tempo de 20 a 40 anos segundo (PAGE *et al.*, 1985).

Machos diplóides de meliponíneos são resultantes de cruzamentos entre uma

rainha e um zangão com o mesmo alelo xo, a produção de machos com dois erros ou falhas iguais, em ambos os alelos, originaria machos diplóides (KERR, 1974).

Populações de melíponas podem sofrer o efeito da diminuição de alelos sexuais xo chegando a números inferiores a 6 (WOYKE, 1980). Em áreas com menos de 44 colônias a eliminação da população pode ser total KERR & VENCOSKY (1992). Isto vem acontecendo em vários lugares, inclusive em Uberlândia onde *Melipona marginata*, *M. bicolor* e *M. quadrifasciata* já foram extintas, e *Melipona rufiventris* está próxima da extinção.

CARVALHO *et al.* (1995) ressaltam que a perda gradual de alelos e a extinção de espécies com populações muito pequenas são fatores relevantes a serem considerados na conservação dos Meliponíneos. ARAUJO *et al.* (1997) demonstraram por simulação computacional que a extinção, após uma redução drástica no tamanho da população, está de acordo com dados empíricos relacionados à redução dos alelos sexuais, em termos de número de gerações, para pequenas populações de *Melipona*.

A causa primária de reduções na diversidade biológica não tem sido a exploração direta destes insetos, mas a destruição de seus habitats (EHRlich, 1988). A enorme ocupação territorial de *Melipona rufiventris* e o crescente desmatamento têm ocasionado o fracionamento de suas populações e o seu isolamento geográfico. Geralmente, quanto mais distanciadas geograficamente estão as populações, mais diferentes elas são em frequências alélicas e nas características fenotípicas de bases genéticas (FUTUYMA, 1992).

As formas geograficamente diferenciadas de um biótipo ou raça podem ser parapátricas, encontrando-se ao longo de uma margem estreita onde se inter cruzam, ou totalmente alópatricas (separadas). É difícil dizer se formas alopátricas se inter cruzariam se tivessem oportunidade por isso, às vezes, torna-se arbitrário considerá-las espécies diferentes ou não (FUTUYMA, 1992).

A divergência genética e a especiação podem ocorrer após isolamento entre

populações por barreiras geográficas, com conseqüente redução de fluxo gênico e gradual acúmulo de diferenças genéticas resultantes da adaptação local AVISE (1986), da deriva genética aleatória ou do efeito do fundador (NEI, 1975 *apud* SCARPASSA, 1996).

O estudo das variações genéticas entre populações pode contribuir para a compreensão de sua influência no processo de especiação (TEMPLETON, 1981).

1.2 Marcadores Moleculares

Estudos moleculares têm sido uma ferramenta poderosa para inferir *status* em espécies e estimar as relações evolucionárias entre elas, testando hipóteses sobre o processo de especiação (TEMPLETON, 1994). A análise de polimorfismos no DNA tem se mostrado particularmente útil para caracterização genética de fontes biológicas, pois estes polimorfismos são fenotipicamente neutros e não sujeitos aos efeitos do ambiente (FAIRBANKS *et al.*, 1993).

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 menos que marcadores mais sensíveis como os provenientes de análises do DNA sejam utilizados (HOY, 1994).

Análises moleculares permitem comparações de seqüências de DNA e produzem dados que podem ser convertidos para estimar seqüências divergentes. A utilização de marcadores moleculares tem várias vantagens sobre marcadores morfológicos convencionais: os marcadores moleculares exibem neutralidade fenotípica sem influência ambiental, raramente exibem interações epistáticas ou pleiotrópicas, podendo ser detectados tanto em indivíduos jovens como adultos (TANKSLEY *et al.*, 1989). Estas características permitem teoricamente um número infinito de marcadores a serem analisados em uma população. Existem dois métodos básicos de caracterização molecular: RFLP e RAPD, ambos detectam polimorfismos em seqüências específicas do DNA, empregando técnicas diferenciadas, a partir das variações existentes entre

indivíduos geradas por meio de mutações e/ou recombinações.

1.2.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

O número e o tamanho de fragmentos de DNA produzidos quando este é digerido com nucleases de restrição por *restriction fragment length polymorphisms analysis* (RFLPs) providenciam seqüências informativas sobre variações intra e entre populações (DOWLING *et al.*, 1990).

Fragmentos gerados por RFLP ocorrem no DNA quando segmentos equivalentes maternos e paternos têm posições diferentes nos sítios de restrição enzimática. Os RFLPs resultam de mudanças de pares de bases dentro de um sítio de reconhecimento de uma endonuclease, de deleções ou inserções dentro de um fragmento de restrição ou mesmo de modificações cromossômicas.

Uma vez isolados por uma enzima de restrição, os RFLPs funcionam como marcadores genéticos, os quais são abundantes, estáveis e herdados codominantemente. Algumas das principais aplicações dos marcadores de RFLP são: facilitar o retrocruzamento de genes recessivos no melhoramento, determinar ligações à locos que condicionam características quantitativas, gerar mapas genéticos, clonagem e transferência de genes.

RFLP é uma das mais versáteis técnicas para detectar variações no DNA nuclear e mitocondrial. Dependendo de quais enzimas forem usadas e das seqüências alvo estudadas, extensivas variações podem ser identificadas, embora, tais análises requeiram quantidades relativamente grandes de DNA (que não pode ser obtido a partir de um único indivíduo em pequenas espécies de insetos (HOY, 1994).

Análises de RFLP usando oligonucleotídeos repetitivos no genoma como sondas, podem gerar um *fingerprint* do DNA podendo ser usado para determinar o parentesco entre indivíduos em colônias (BLANCHETOT, 1991; MORITZ *et al.*, 1991). Os RFLPs foram também usados para gerar marcadores que documentaram a introgressão entre abelhas africanizadas e raças Europeias na América do Sul (HALL, 1990; SHEPPARD *et al.*, 1991). Esta técnica tem mostrado grande potencial para estudos filogenéticos e evolutivos especialmente quando

utilizada com mtDNA. A variação interregional nas taxas evolucionárias do mtDNA é particularmente útil pois facilita a escolha de genes apropriados para estudos de biogeografia, AVISE *et al.* (1987) ou filogenéticos (CROZIER, 1992).

1.2.2.RAPD (Random amplification of polymorphic DNA).

A tecnologia de *primers* arbitrários em PCR (AP-PCR), também chamada de amplificação ao acaso de DNA polimórfico (RAPD), utiliza um único *primer* específico WELSH & MCCLELAND (1990); WILLIAMS *et al.* (1990) ou dois *primers* diferentes para produzir uma impressão digital do DNA genômico via PCR. Nesta reação, os *primers* se associam à 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 2-3 Kb, o produto de DNA é produzido por meio de uma amplificação termocíclica. A grande vantagem desta técnica é não precisar de informação sobre a seqüência de DNA a ser amplificada. Além de possibilitar uma busca por todo o genoma, permitindo a análise de regiões codificadoras, não codificadoras, de seqüências repetitivas ou de cópia única (RAFALSKI & TINGEY 1993; SCHIERWATER, 1995).

Os requerimentos para a reação do PCR são: deoxinucleotídeos, DNA polimerase, *primers*, o DNA molde e a solução tampão contendo magnésio.

Polimorfismos podem ocorrer entre regiões amplificadas ou nas mudanças de base que alteram a ligação do *primer*. O processo é rápido e requer somente pequena quantidade de DNA (5 a 25 ng) e como vantagem adicional não requer radioatividade para sua detecção.

Polimorfismos podem ser detectados em fragmentos contendo seqüências altamente repetitivas, fornecendo desta forma marcadores em regiões do genoma previamente inacessíveis para análise. Um atributo atrativo desse método é que uma simples população pode se usada para atingir uma região discreta desejada do genoma (KLEIN-LANKHORST *et al.*, 1991).

Marcadores RAPD podem ser especialmente úteis para análises ecológicas de populações. HADRYIS *et al.* (1992) descrevem esta técnica como uma das mais versáteis para análise de populações porque pode ser usada para identificar

espécies, para reconhecer parentescos, analisar paternidade, podendo ainda ser usada para monitorar colonizações. Entretanto esta técnica apresenta limitações pois a natureza de seus marcadores é dominante, não sendo capaz de distinguir um *loci* heterozigoto, exceto por análise de segregação dos marcadores em progênes. A falta de repetibilidade é uma outra importante limitação, pois a amplificação de DNA em PCR é afetada pela temperatura, concentrações de $MgCl_2$, *primers* e DNA molde. MEUNIER & GRIMONT (1993) verificaram variações nos padrões RAPD observados entre termocicladores e polimerases diferentes, mostrando que a reprodutibilidade foi excelente quando usados o mesmo termociclador e a mesma *Taq* polimerase. SCHIERWARTER & ENDER (1993) verificaram que um rígido controle das condições da reação estabelece a repetibilidade permitindo diagnósticos com RAPD por diferentes laboratórios.

1.3 O DNA Mitocondrial e o gene da sub-unidade maior do RNA ribossomal mitocondrial (16S rRNA)

Na década passada, análises do DNA mitocondrial (mtDNA) estabeleceram-se como uma ferramenta poderosa para estudos evolucionários em animais (MORITZ *et al.*, 1987). Esses estudos têm sido usados para evidenciar informações sobre estrutura de populações, fluxo gênico, hibridação, biogeografia e relações filogenéticas (AVISE, 1986; WILSON *et al.*, 1985).

O mtDNA reúne características ideais para análises filogenéticas pois é uma molécula distinta e bem distribuída permitindo comparações entre uma grande variedade de organismos. Possui uma estrutura genética simples sem modelos complexos de DNA repetitivo, elementos de transposição, pseudogenes e introns exibindo um modo de transmissão genética direta, sem recombinações ou rearranjos.

Inicialmente, mtDNA animal foi considerado como sendo não somente um "exemplo de extrema economia genética" ATTARDI (1985), mas um paradigma de estabilidade estrutural. Essa percepção foi baseada na descoberta de grande similaridade entre o mtDNA de quatro vertebrados (humanos, ratos, bovinos e *Xenopus laevis*) tanto no tamanho (16.5 a 17.6 Kb) como na ordem invariante dos

genes. Uma pequena variação existe entre vertebrados, restrita a região *D-Loop* (CLAYTON, 1984). Mais recentemente, essa visão de uniformidade estrutural tem sido desafiada por estudos de mtDNA em animais adicionais especialmente invertebrados.

A molécula de mtDNA em primatas apresenta como característica uma taxa de evolução ao nível da seqüência de nucleotídeos cerca de dez vezes mais rápida que a observada em uma cópia única de um gene nuclear BROW *et al.* (1979, 1982), descoberta subsequente estendida a outros mamíferos (MIYATA *et al.* *apud* 1982 MORITZ *et al.*, 1987).

A exposição do DNA a danos oxidativos, a pequena fidelidade do sistema de reparo ou até mesmo sua deficiência ou ausência, a perda relativa do mecanismo de recombinação, que podem eliminar mutações deletérias e altas taxas de *turnover* do mtDNA são algumas possíveis explicações para sua alta taxa evolutiva (GRAY, 1989).

Existem taxas de divergência diferentes para porções funcionais do mtDNA na ordem decrescente; região *D-loop*, genes codificantes de proteínas, genes rRNA e tRNAs (BROWN, 1985 *apud* MORITZ *et al.*, 1987).

Por exemplo, regiões de DNA que são evolucionariamente conservadas, como as seqüências de rRNA, GERBI (1985) são úteis para resolver histórias filogenéticas antigas FIELD *et al.* (1988); LAKE (1988), MINDELL & HONEYCUTT (1990), enquanto que regiões menos conservadas o seriam para escalas de tempo intermediárias LARSON (1991); CAMERON (1991) ou recentes (GREENBERG *et al.*, 1983 *apud* CAMERON *et al.*, 1992).

1.4 A TÉCNICA DE SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

A técnica single strand conformation polymorphism (SSCP) foi desenvolvida por ORITA *et al.* (1989) como uma forma de detectar uma seqüência que tenha sofrido mutação. Este método é baseado no fato de que a mobilidade eletroforética de uma fita única de ácido nucléico em gel de poliacrilamida não denaturante depende não somente do tamanho, mas também da sua seqüência. A desnaturação pelo calor na presença de formamida é uma forma usual de gerar

fitas simples de DNA. Esse procedimento tem sido usado por, HOSHINO *et al.* (1992) e BANNAI *et al.* (1994) para tipificar alelos. A formamida age como agente desnaturante tornando instáveis as pontes de hidrogênio entre timina e adenina.

Procedimento diferente de formação de fita única de DNA foi desenvolvido por MARUYA *et al.* (1996) usando uma solução LIS (10% de sacarose, 001% de azul de bomofenol e 0,01% de xileno cianol). A formação de fita simples de DNA por este método foi mais estável até mesmo à temperatura ambiente.

Essa técnica pela sua alta sensibilidade permite detectar até mesmo mutações de ponto em fragmentos analisados. A utilização do fragmento de um gene mitocondrial altamente conservado permite acesso a uma parte da história evolucionária da espécie e ainda compara as taxas de divergência nuclear e mitocondrial.

2.OBJETIVOS

Determinar a distância genética entre populações alopátricas de *Melipona rufiventris* provenientes de seis localidades, utilizando a técnica de marcadores RAPD. Identificar *primers* polimórficos que permitam uma rápida distinção dos indivíduos de tais populações.

Determinar divergência entre as mesmas populações por análise do fragmento (534 pb) do gene mitocondrial rRNA 16S por SSCP.

Obter um panorama geral da similaridade inter populacional.

3.MATERIAL E MÉTODOS

Esse experimento foi desenvolvido no laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética e Bioquímica (DEGEB) da Universidade Federal de Uberlândia.

3.1. Material Biológico

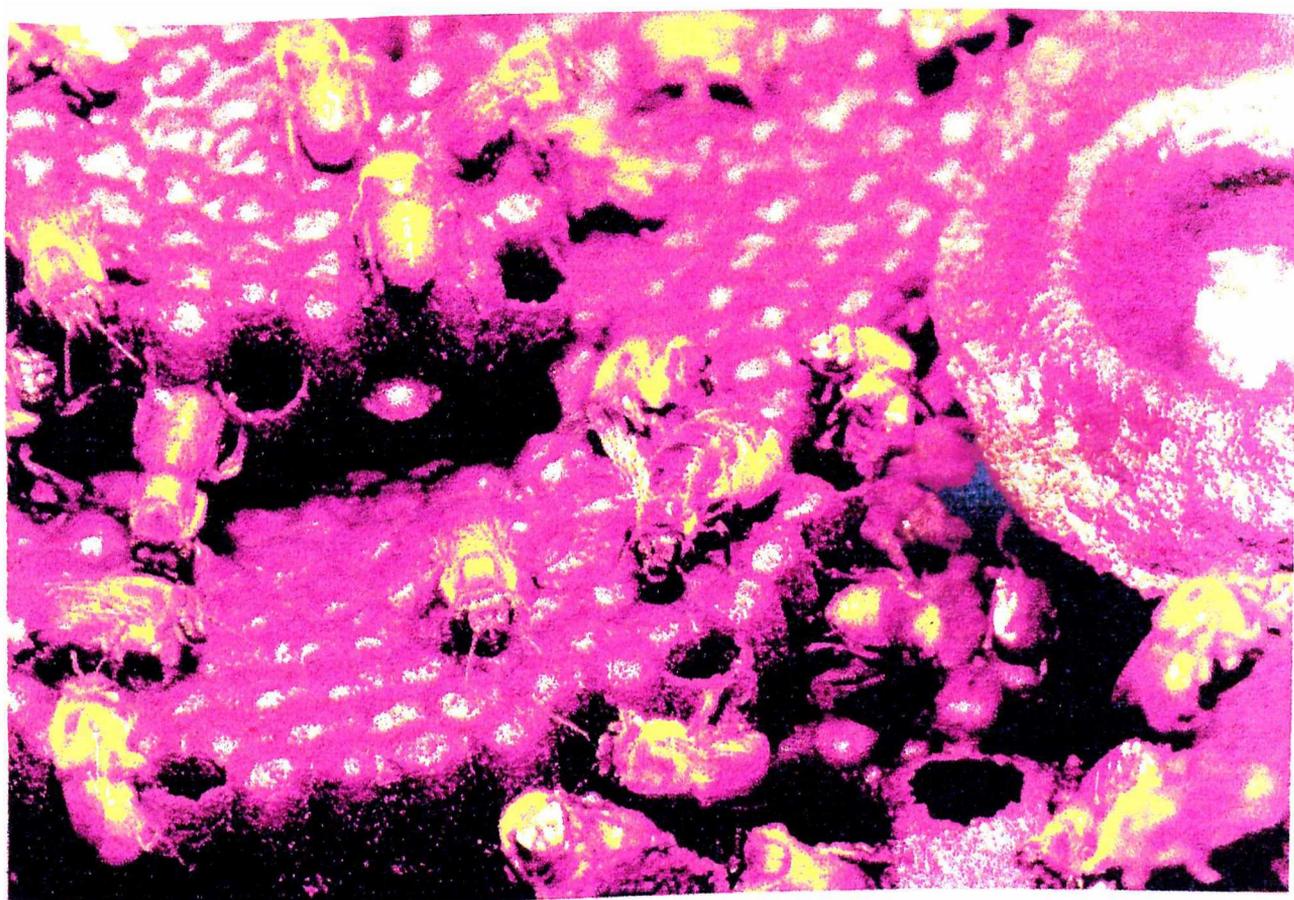


Figura 1- Vista interna de ninho de *M. rufiventris*.

O material biológico utilizado durante o desenvolvimento dos experimentos foi a abelha jandaira, tuiuva ou uruçú-amarela. A coleta e análise do material biológico constou de 05 amostras de colônias de *Melipona rufiventris flavolineata* em Barra do Corda (MA), 04 de *Melipona rufiventris rufiventris* no Triângulo Mineiro (MG), 05 *Melipona rufiventris rufiventris* em Gandu (BA), 05 na região de Floriano (PI) de *Melipona rufiventris flavolineata*, 01 de *Melipona rufiventris rufiventris* na região de Domingos Martins (ES) e 01 em Blumenau (SC) de *Melipona rufiventris rufiventris*. Uma amostra de *Apis mellifera* L. foi utilizada como *outgroup* que segundo LI & GRAUR (1991) é definido como espécie ancestral ou ainda espécie não relacionada com as outras analisadas. As amostras foram mantidas em álcool absoluto após coletadas no campo com puçás na entrada das colméias, nos respectivos locais de origem. Assim que chegaram ao laboratório foram mantidas em freezer a -80 °C.

Tabela1 Localização geográfica dos pontos de coleta de amostras de *Melipona rufiventris*.

Pontos de Coleta	Nº de amostras	Longitude	Latitude
1-Grupiara-MG	01	48° 05' O	18° 44' S'
2-Ituiutaba-MG	02	49° 28' O	19° 04' S
3-Campina Verde-MG	01	49° 31' O	41° 02' S
4-Domingos Martins-ES	01	41° 02' O	20° 25' S
5-Blumenau-SC	01	49° 13' O	27° 22' S
6-Esperantina-PI	03	42° 16' O	04° 17' S
7-Campo Maior-PI	02	42° 05' O	05° 12' S
8-Barra do Corda-MA	04	45° 12' O	05° 31' S
9-Mirador-MA	01	44° 24' O	06° 15' S
10-Gandu-BA	05	39° 30' O'	14° 12' S

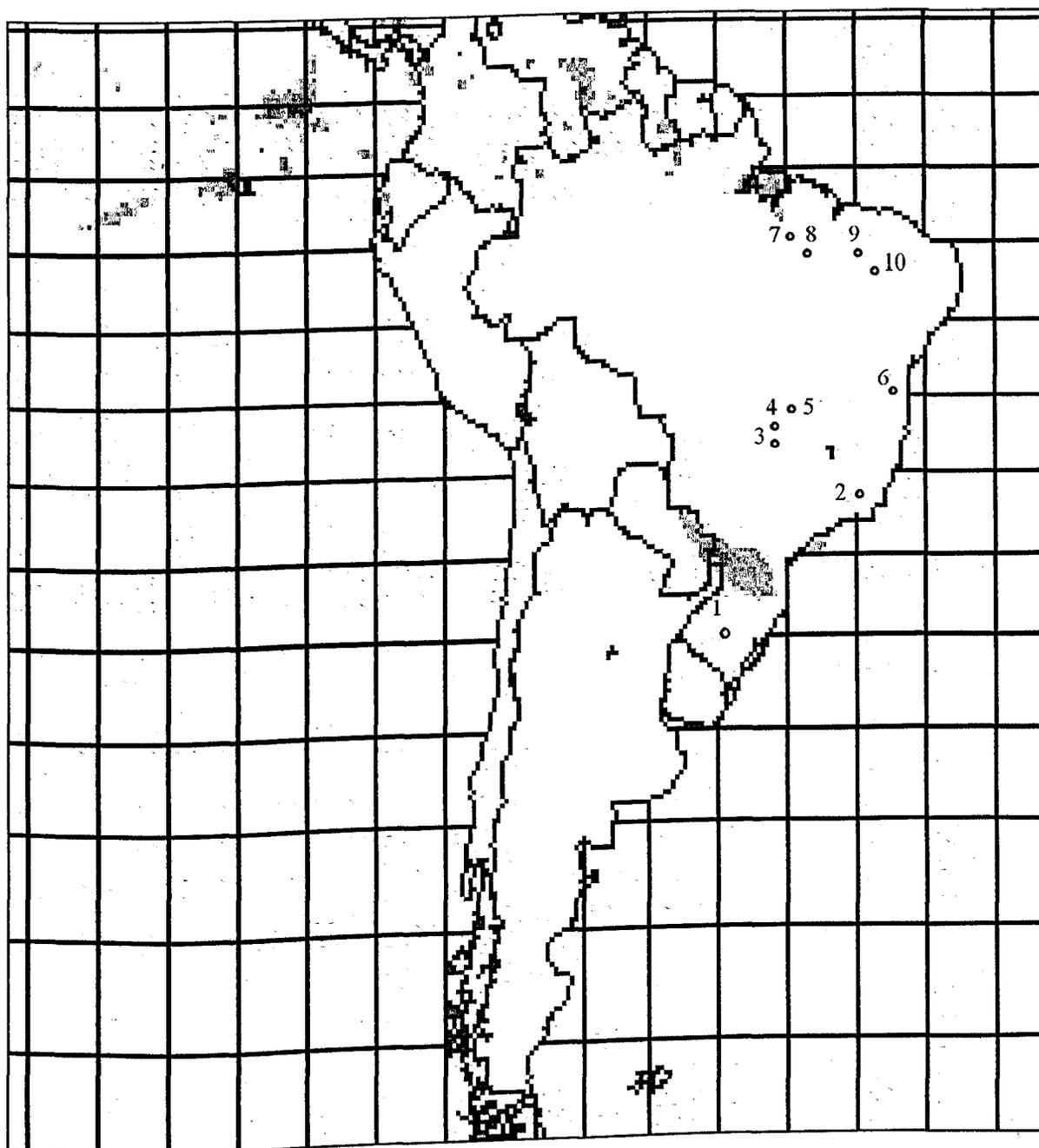


Figura 2: Localização geográfica dos locais representantes das populações utilizadas para análise de divergência genética. 1-Blumenau-SC 2-Domingos Martins-ES 3-Campina Verde-MG 4-Ituiutaba-MG 5-Grupiara-MG 6-Gandu-BA 7-Barra do Corda-MA 8-Mirador-MA 9-Esperantina-PI 10-Campo Maior-PI.

3.2 Análise Molecular

3.2.1 Extração de DNA

Inicialmente cada indivíduo foi retirado do álcool lavado em tampão (Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0; NaCl 0,1 M e MgCl₂ 0,001 M) em três imersões sucessivas de 15 min e em seguida foram secos em papel de filtro.

O DNA total foi extraído do tórax de uma única abelha/colônia segundo método desenvolvido por AZEREDO-ESPIN *et al.* (1991), modificado. A amostra foi triturada em N líquido adicionou-se em seguida 600 ul de Sol *grinding* de acordo com o tamanho da amostra. Em seguida, a mesma quantidade de tampão de *lise*, permanecendo em gelo por 15 min. Adicionou-se 10 a 20 ul de proteinase K (10 mg/ml), incubando-a por 45 min a 45° C. Acrescentou-se 20 ul de RNase incubando a 37 °C por 1 h e 30 min. O volume foi dobrado com fenol e centrifugando a 10.000 rpm por 5 min. Retirou-se a fase superior para um novo tubo e novamente dobrou-se o volume com fenol: clorofórmio: álcool isoamil (25:24:1) centrifugando a 10.000 rpm por 5 min. Realizou-se uma terceira extração somente com clorofórmio semelhante às duas anteriores. Adicionou-se à fase superior dois volumes de etanol gelado. As amostras foram mantidas a -20 °C por 2h ou *overnight*. O DNA foi precipitado por centrifugação a 13000 rpm por 15 min e a fase aquosa (álcool) foi descartada. Procedeu-se a lavagem do *pellet* com 500 ul de etanol 70%. Pipetou-se para fora todo o etanol do tubo. Após o *pellet* se encontrar completamente seco este foi ressuspendido em 70 ul de H₂O dd. As amostras estoque foram armazenadas à -80°C.

3.2.2 Quantificação do DNA em espectrofotômetro

O DNA foi quantificado por leitura de absorbância a 260 nm e por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Alíquotas de 10 ul diluídas 10 vezes em água ultra pura foram submetidas a leitura em espectrofotômetro e após a

quantificação foram diluídas para um concentração final de 10 ng/ μ l. As amostras de trabalho já diluídas foram armazenadas a - 20°C.

3.2.3 Amplificação

3.2.3.1 Amplificação ao Acaso de DNA Polimórfico - RAPD

A PCR (reação em cadeia da polimerase) foi utilizada para amplificação de fragmentos polimórficos. A metodologia empregada foi descrita por WILLIAMS *et al.* (1991). Os *primers* (oligonucleotídeos) foram adquiridos da OPERON TECHNOLOGIES INC, EUA e da Universidade de Brasília (UNB).

As condições previamente otimizadas e estabelecidas para a reação em termociclador PTC-100 MJ.Research consistiram de um volume de 20 μ l, com os seguintes componentes: 15 ng de DNA genômico, 1,5 U de Taq polimerase, 2 mM de MgCl₂, 0,05 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada *primer*, 10 μ g de BSA (bovinum serum albumin) e o volume foi completado com água ultrapura.

Dos *primers* curtos avaliados, 9 foram utilizados para amplificar os DNAs dos 22 genótipos, seguindo as mesmas condições acima descritas (Tabela 2). Todas as reações foram repetidas para garantir uma análise real sem artefatos.

Tabela 2 Lista dos *primers* curtos utilizados para amplificar o DNA dos 22 genótipos. e suas respectivas seqüências de nucleotídeos:

"Primer"	Seqüência
OPF 13	5' GGCTGCAGAA 3'
OPA 10	5'GTGATCGCAG 3'
OPI 06	5' AAGGCGGCAG 3'
OPC 05	5' GATGACCGCC 3'
OPC 06	5' GAACGGACTC 3'
OPV07	5' GAAGCCAGCC 3'
OPV 18	5' TGGTGGCGTT 3'
OPC 16	5' CACTCCAG 3'
411	5'CAGCACCCAC3'

Foram avaliados 16 *primers* longos do laboratório de Genética Molecular da Universidade de Uberlândia, destes, 8 foram utilizados para amplificar os genótipos analisados (Tabela 3). As condições da reação de amplificação foram as mesmas descritas para a amplificação com *primers* curtos.

Tabela 3 Lista de *primers* longos utilizados para amplificar o DNA dos 22 genótipos de *M. rufiventris* e *Apis mellifera L* e suas respectivas seqüências

"Primers"	Seqüência
A2	5'GTTCCCTGTGTGTGTGCAATTG3'
B1	5'GTTCCCTGTGTGTGTGCAATGGTG3'
MAU 102	5'TTAGACTGCAGTTGAAGTAAC3'
MAU 302	5'CTGACAAAAGGTGGCGATTTCA3'
MAU 402	5'AATGTCACACTTGAATCGCATC3'
MAU 601	5'TGTGGCTGGACACCGACT3'
MAU 902	5'CGAAAGTCTTAGTAACATAT3'
GOU 8	5'CGAAAGTCTTAGTAACATAT3'

3.2.4 Visualização dos produtos amplificados

Os fragmentos gerados pelas amplificações foram separados em gel de agarose 1,5 % a 150V por 3 h nas dimensões de 20 cm x 24,5 cm x 6 mm em tampão Tris-Borato EDTA (TBE 0,5 x) conforme SAMBROOK *et al.*(1989). O corante usado foi brometo de etídio na concentração final de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de gel. Das amostras com volume final de 20 μl foram aplicados 15 μl em gel mais 3 μl de tampão de carregamento (azul de bromofenol 3,61M, xileno cianol 4,64 M, sacarose 1,17M e EDTA 0,1M pH 8) na proporção de 5:1, respectivamente. Os géis foram visualizados em transiluminador UV e fotografados por VDS Image System-Pharmacia, usando filtro laranja, com tempos de exposição variando entre 1,37 e 2,17s, contraste entre 0 e 6 e fator de correção da câmara 0,45.

3.2.5 Análise dos dados

Foi montada uma matriz binária com dados referentes a ausência (0) e presença de bandas (1), utilizando sempre as bandas mais intensas e definidas que apresentaram repetibilidade .

O programa STATISTICA 4.5^A (1993) foi utilizado para o cálculo das distâncias genéticas e análise de *cluster*. As distâncias genéticas foram calculadas por porcentagem de desacordo:

$$N'_{AB} / N_T \quad (\text{PUTERKA } et \text{ al.}, 1993 \text{ apud CABRAL}, 1997)$$

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

3.2.6 Caracterização de polimorfismo do gene RNAr 16S do DNA mitocondrial por SSCP

Amplificação e purificação do gene 16S rRNA do mtDNA

A amplificação foi feita utilizando-se 60 ng de DNA, 400uM de dNTPs, 3 mM de $MgCl_2$ e 1,5U de Taq polimerase. O programa usado constou de 30 ciclos com o *primer* da região 16S rRNA do genoma mitocondrial desenvolvido a partir de seqüências de *A. mellifera* descrito por CAMERON *et al.* (1992).

Após a amplificação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 3 %. A banda de interesse foi recortada do gel e purificada por centrifugações sucessivas a 5000 rpm com 100 ul de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0) em aparato montado com *ependorf* de 0,5 ml perfurado com agulha fina em sua base, preenchido com algodão de vidro até metade do seu volume e encaixado

dentro de um *ependorf* de 1,5 ml. Tal eluído foi utilizado para realizar a detecção de mutações pela metodologia de SSCP (*single strand conformation polymorphism*).

SSCP(*single strand conformation polymorphism*)

Foram adicionados 2 a 8 μ l do produto da purificação a 25 μ l de solução de LIS (sacarose 10%, azul de bromofenol 0,01%, xileno cianol 0,01%). Tal mistura foi incubada a 97°C por 10 minutos e 15 μ l desta aplicados em PAGE 12% (Acrilamida-bisacrilamida- 49:1), com espaçadores 0,5 mm. A eletroforese foi realizada à 15 mA por um período de 17h.

5.RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Análise Molecular por marcadores RAPD

Para facilitar a descrição dos resultados os genótipos das populações de *Melipona rufiventris* foram discriminados pelos locais de origem das amostras.

Um único indivíduo foi usado como representante da colônia amostrada no local de origem. A representatividade de amostras individuais em métodos de análise de variabilidade populacional foi considerada adequada (AYALA, 1993). Cinco indivíduos representaram as populações do Maranhão (Barra do Corda e Mirador), Piauí (Campo Maior e Esperantina), Bahia (Gandu), quatro indivíduos representaram a população de Minas Gerais (Grupiara, Ituiutaba e Campina Verde) e um indivíduo foi representante das populações do Espírito Santo (Domingos Martins) e Santa Catarina (Blumenau). O número de indivíduos por população não pode ser o mesmo para todas as regiões amostradas pela imensa dificuldade de encontrar colônias de *Melipona rufiventris* especialmente nas regiões Sul e Sudeste do país.

Durante a etapa de otimização das reações foi importante para melhorar a qualidade e uniformidade das amplificações a adição de BSA. O BSA (soro albumina bovina) é comumente utilizado como um estabilizador de atividades enzimáticas contra a desnaturação durante o armazenamento, diluições ou reações enzimáticas *in vitro* tais como clivagem de DNA, síntese de cDNA ou ligações. Aparentemente o BSA no ensaio RAPD estabiliza a Taq polimerase protegendo-a de impurezas agregadas ao DNA genômico bem como de íons presentes na superfície de alguns tipos de plásticos utilizados na fabricação de microtubos ou de placas flexíveis de PVC utilizadas nos ensaios. A adição de BSA resulta em amplificações mais intensas, em uma maior homogeneidade entre amostras e principalmente na eliminação de reações falhas ou de amplificação marginal onde a leitura dos perfis RAPD se torna difícil ou mesmo impossível (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

Testaram-se 30 *primers* da Operon Technologies, da Universidade de Brasília (UNB) e *primers* longos desenhados na Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em quatro genótipos, Grupiara-MG, Gandu-BA, Campo Maior-PI, Barra do Corda-MA. Destes, 17 geraram padrões de bandas adequados à análise da diversidade entre populações, outros 13 *primers* curtos e longos não foram utilizados por apresentarem desuniformidade nas ampliações para as condições de reação estabelecidas pela otimização inicial e para o programa utilizado pelo termociclador ou ainda por não serem informativos ou por apresentarem um padrão de bandas empacotado e difícil de ser analisado.

Todos os *primers* selecionados e utilizados para análise apresentaram alta repetibilidade dos padrões de amplificação apresentados. Apenas bandas intensas e bem definidas foram incluídas na análise para evitar erros de considerações incorretas de bandas fracamente amplificadas.

A agarose na concentração de 1,5 % foi utilizada para eletroforese sendo que para dois *primers* longos Gou 8 e Mau 102 utilizou-se a concentração de 2% onde bandas próximas obtiveram maior definição.

As reações de amplificação para análise de RAPD envolvendo 17 *primers* de seqüência arbitrária resultaram em 84 bandas amplificadas com tamanhos entre 2000 e 300 pb. O número de bandas polimórficas detectadas variaram de 2 a 7, dependendo do *primer* testado, o que representa uma média de 4.9 bandas por *primer*, com 84,9 % de bandas polimórficas.

Primers curtos apresentaram 47 bandas, 5,2 por *primer*, destas 41 apresentaram polimorfismos da ordem de 87,23% (Tabela 4) e (Figura 3). *Primers* longos apresentaram 37 bandas das quais 32 foram polimórficas. Apresentando uma média de 4,6 bandas por *primer* com 86,48% de bandas polimórficas (Tabela 5) e (Figura 4). Estas distâncias variam de 0% a 29% para a análise incluindo todos os *primers* para as populações amostradas, sendo a distância entre os genótipos das populações analisadas e o *outgroup* (*Apis mellifera*) de 51% (Figura 07).

A análise de agrupamentos baseada nas porcentagens de desacordo utilizando o método UPGMA ao nível de 3% diferenciou o grupo de genótipos Bahia do indivíduo (Domingos Martins) representante da população do Espírito Santo.

Tabela 4 Relação do número total de bandas amplificadas e polimórficas por primer curto testado.

Primers Curtos	Bandas Totais	Bandas Polimórficas	Tamanho Pb
OPV 07	4	3	300-1500
OPV 18	4	2	500-800
OPI 06	3	3	400-800
OPF 13	4	4	500-1600
OPA 10	8	7	500-1200
OPC 05	7	7	200-1600
OPC 06	5	5	200-2000
OPC 16	4	3	400-2000
411	8	7	700-1800



Figura 03 Padrão de amplificação de fragmentos de DNA (RAPDs) obtido com o primer OPC 06 para 22 genótipos analisados por eletroforese em gel de agarose (1,5 %). M-marcação de peso molecular de DNA, *Melipona rufiventris* 1-Grupiara-MG, 2 a 3-Ituiutaba-MG, 4-Campina Verde-MG, 5-Domingos Martins, 6-Blumenau-SC, 7 a 11-Gandu-BA, 12,13 e 15 -Esperantina-PI, 14 e 16-Campo Maior-PI, 17 a 19 e 21-Barra do Corda-MA, 20-Mirador-MA, 22-*Apis mellifera*. As setas indicam bandas polimórficas informativas.

Tabela 5 Relação do número total de bandas amplificadas e polimórficas por *primer* longo testado.

Primers Longos	Bandas Totais	Bandas Polimórficas	Tamanho Pb
A2	5	5	300-800
B1	4	4	300-1500
MAU102	4	3	600-1800
MAU 302	4	4	400-1000
MAU 402	3	2	500-1500
MAU 601	6	5	200-800
MAU 902	3	2	300-600
GOU 8	8	7	200-900

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

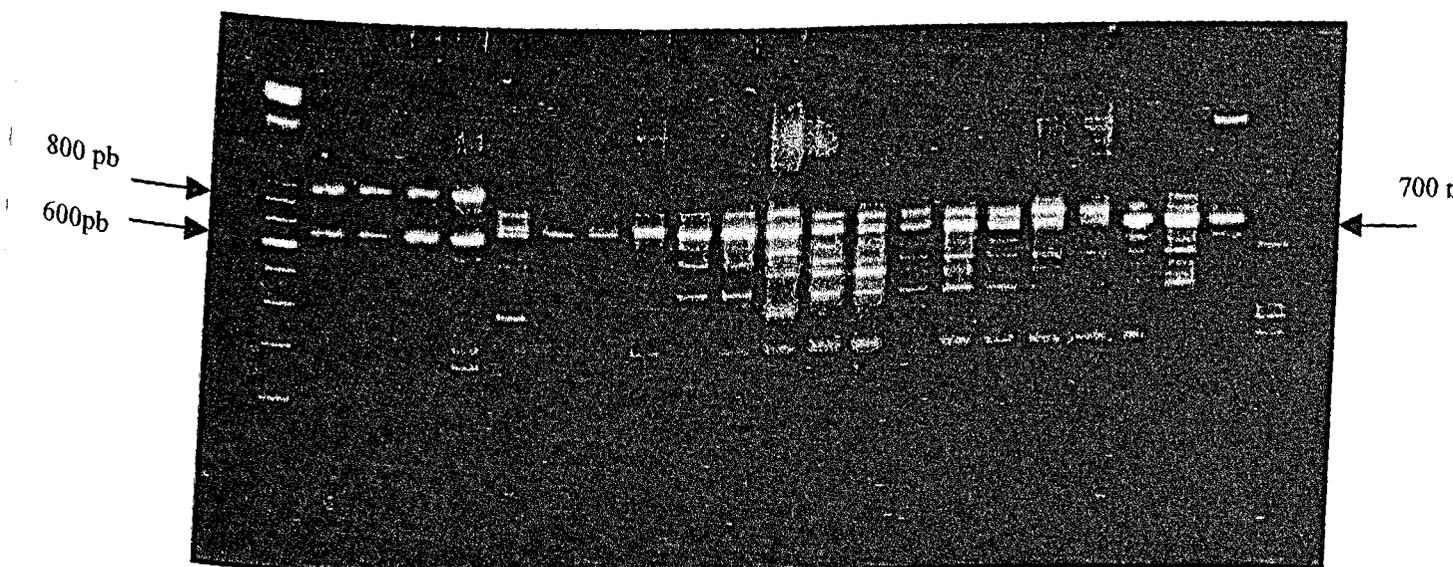


Figura 04 Padrão de amplificação de fragmentos de DNA (RAPDs) obtido com o *primer* Gou 08 para 22 genótipos analisados por eletroforese em gel de agarose (1,5 %). M- marcador de peso molecular de DNA, *Melipona rufiventris* 1-Grupiara-MG, 2 a 3-Ituiutaba-MG, 4-Campina Verde-MG, 5-Domingos Martins, 6-Blumenau-SC, 7 a 11-Gandu-BA, 12,13 e 15 -Esperantina-PI, 14 e 16-Campo Maior-PI, 17 a 19 e 21-Barra do Corda-MA, 20-Mirador-MA, 22-*Apis mellifera*. * As setas mostram as bandas mais informativas.

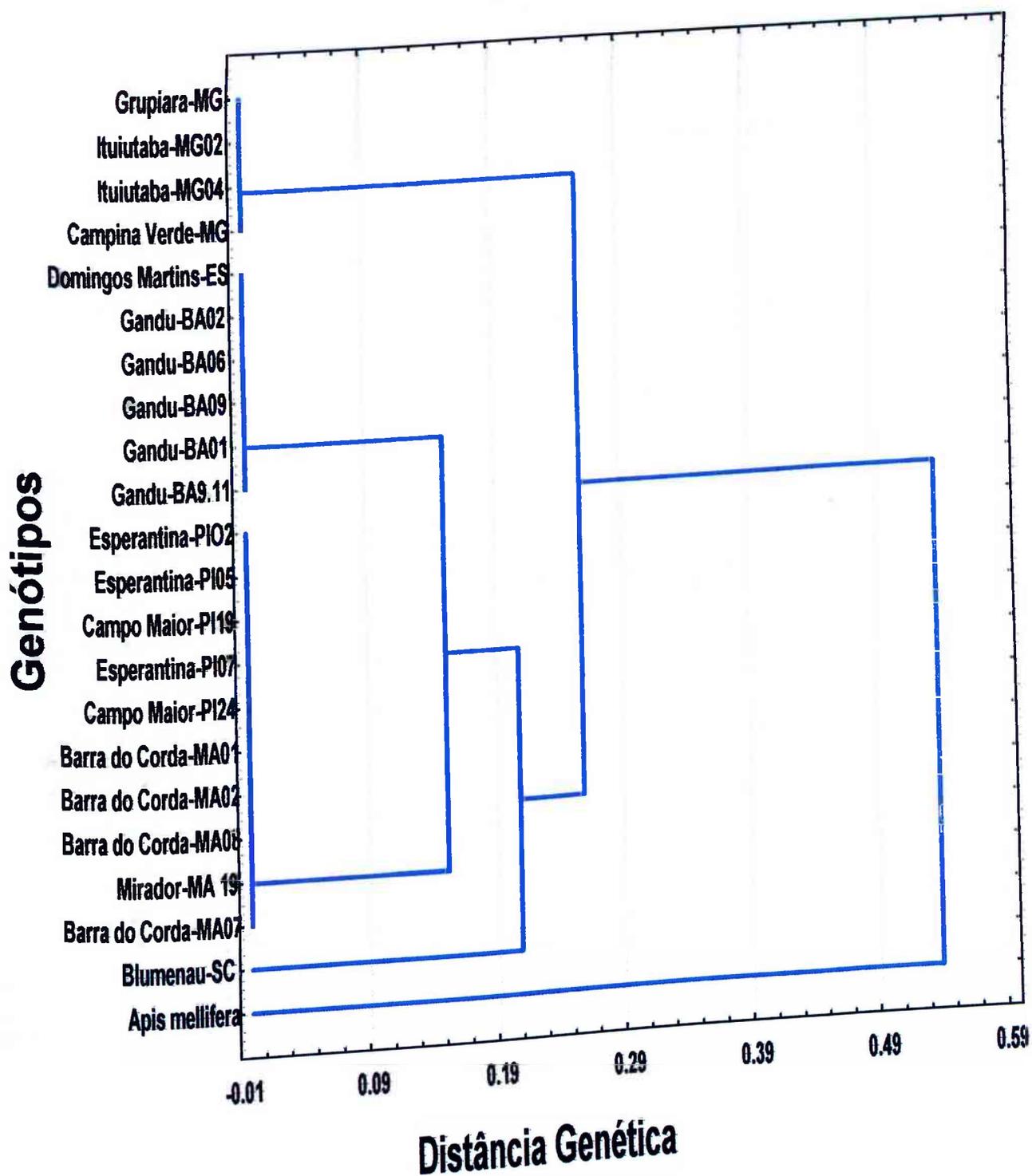
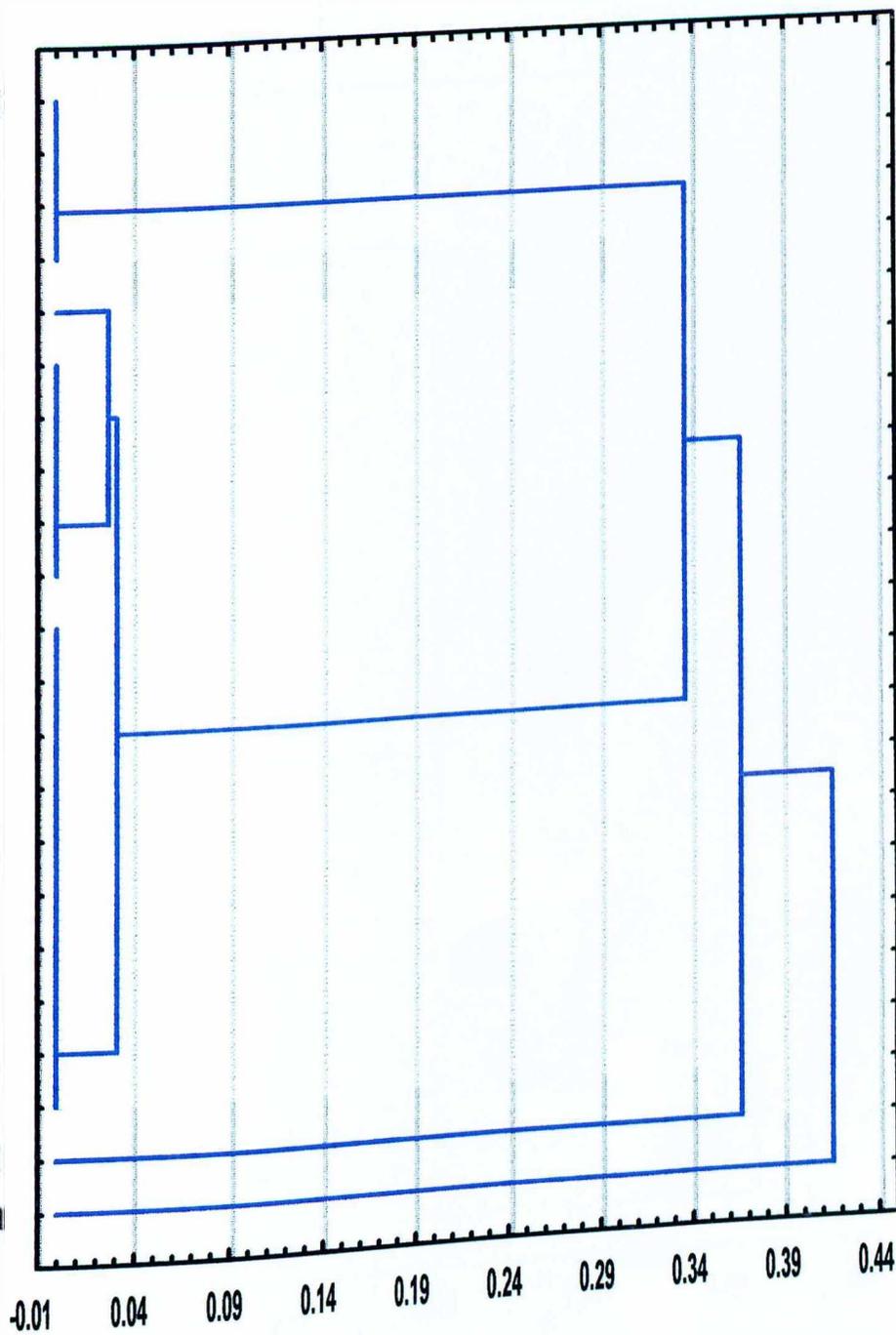


Figura 05 Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e método UPGMA entre 22 genótipos de 21 de *Melipona rufiventris* e 1 de *Apis mellifera*. Baseado em 47 marcadores RAPD obtidos por *primers* curtos.

Genótipos

- Grupiara-MG
- Ituiutaba-MG02
- Ituiutaba-MG04
- Campina Verde-MG
- Domingos Martins-ES
- Gandu-BA02
- Gandu-BA06
- Gandu-BA09
- Gandu-BA01
- Gandu-BA9.11
- Esperantina-PI02
- Esperantina-PI05
- Campo Maior-PI19
- Esperantina-PI07
- Campo Maior-PI24
- Barra do Corda-MA01
- Barra do Corda-MA02
- Barra do Corda-MA08
- Mirador-MA19
- Barra do Corda-MA07
- Blumenau-SC
- Apis mellifera



Distância Genética

Figura 06 Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e método UPGMA entre 21 genótipos de *Melipona rufiventris* e 1 de *Apis mellifera*. Baseado em 37 marcadores RAPD obtidos por *primers longos*.

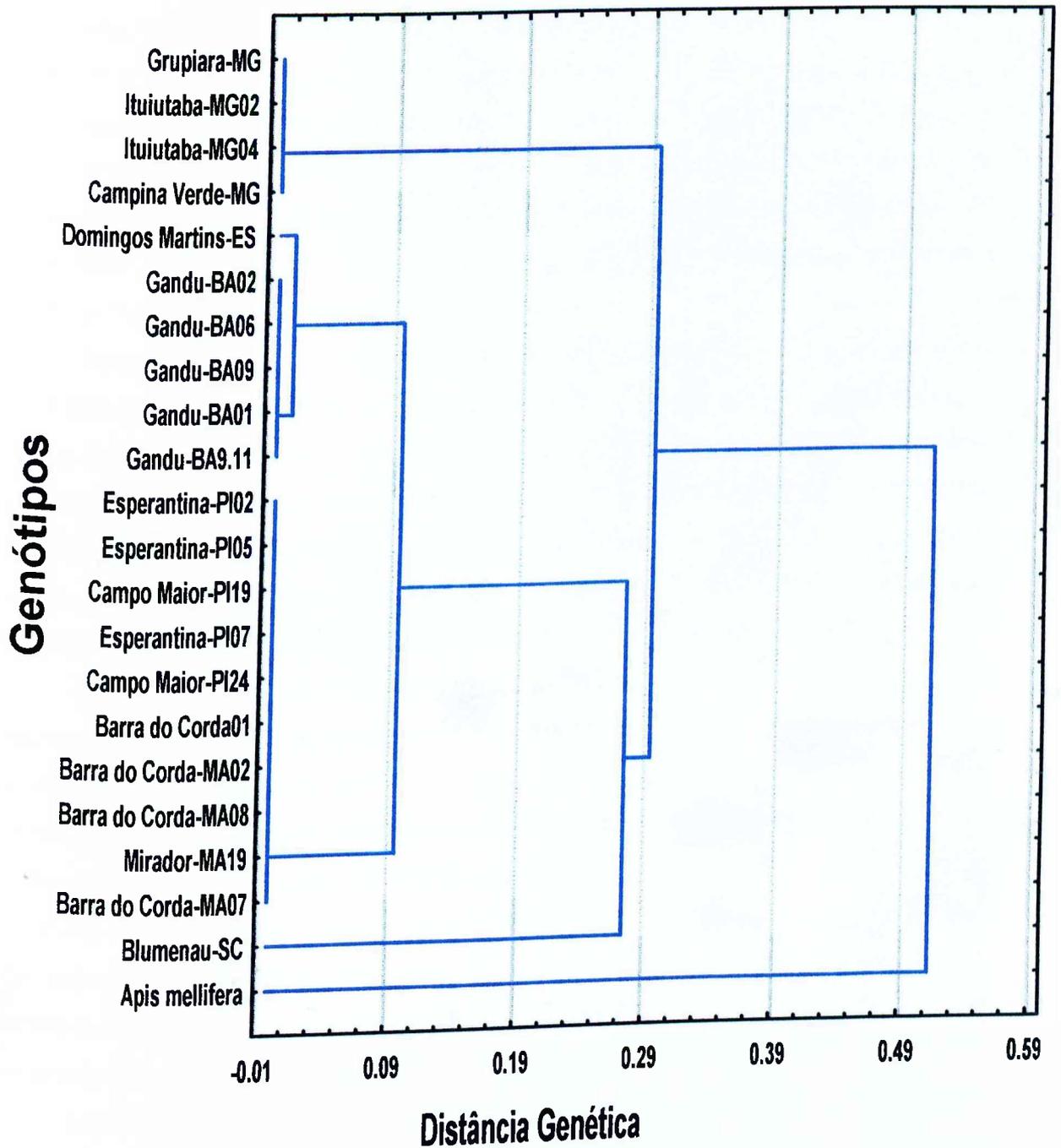


Figura 07 Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e método UPGMA entre 21 genótipos de *Melipona rufiventris* e 1 de *Apis mellifera*. Baseado em 84 marcadores RAPD obtidos por *primers* longos e curtos.

Considerando o limite de 9.8% de dissimilaridade genética dois grupos se distinguiram. O primeiro formado por representantes das populações do Piauí e Maranhão e o segundo por populações da Bahia e Espírito Santo. No limite de 27% o indivíduo (Blumenau) representante da população de Santa Catarina se distinguiu do grupo Maranhão, Piauí, Bahia, Espírito Santo. No limite de 29% dois grupos mais amplos se distinguiram sendo formados um pela população amostrada de Minas Gerais e outro pelas populações do Maranhão, Piauí, Bahia, Espírito Santo e Blumenau conjuntamente. O *outgroup* (*Apis mellifera*) apresentou divergência genética de 51% das populações analisadas.

Para *primers* curtos a porcentagem de dissimilaridade foi maior (53 %) entre o *outgroup* e as populações analisadas quando comparada aos *primers* longos (36%). A maior facilidade de encontrar regiões propícias ao seu anelamento pode justificar a maior divergência genética de análises por *primers* curtos. Também apresentaram maior porcentagem de dissimilaridade (15%) entre outros dois grupos, o primeiro formado por populações da Bahia e Espírito Santo e o segundo por populações do Maranhão e Piauí, em que *primers* longos divergiram 13 %.

Os dois grupos mais externos formados entre as populações de *M. rufiventris* quando analisados por *primers* curtos apresentaram taxa de divergência menor (25%) quando comparados com o resultado da análise por *primers* longos (33%). Também o grupo Bahia-Espírito Santo não apresentou dissimilaridades quando analisado por *primers* curtos, já *primers* longos evidenciaram 2,7% de divergência genética. Tais resultados podem ser consequência de uma maior especificidade dos *primers* longos selecionados ao acaso por regiões mais polimórficas nos genótipos analisados. Podendo ainda os *primers* curtos analisados não serem complementares a regiões específicas de polimorfismos entre tais populações.

Analisando os dendrogramas obtidos, nos genótipos de uma mesma população não ocorreram dissimilaridades, tanto para *primers* curtos, longos ou ambos e ainda as populações do Maranhão e Piauí não se distinguiram pelas mesmas análises. Considerando tal resultado obtido podemos relacioná-lo com uma provável homogeneidade genética em tais populações.

Tal similaridade entre indivíduos pode ainda ter relação direta com as distâncias geográficas em que se encontram, com a continuidade ou não de faixas

de vegetação nativa unindo as mesmas, com o período de tempo decorrido a partir de seu isolamento, e ainda com o tamanho de suas populações.

Entre os indivíduos representantes da população de Minas Gerais as amostras foram coletadas nos municípios de Grupiara, Ituiutaba e Campina Verde que distam entre si em média 75 Km, estes municípios não apresentam faixa contínua de vegetação natural, já ocupadas por pastagens e por cultivos agrícolas. A representatividade da espécie nessa região é mínima e colônias naturais são raramente encontradas. Das quatro amostras obtidas, duas foram coletadas no campo. Uma em Grupiara, numa área de corte de madeira para carvão onde uma única colônia foi coletada, outra em Campina Verde, nas proximidades de uma área pertencente a COPASA. As outras duas amostras foram cedidas por um apicultor que só possuía duas colônias de *Melipona rufiventris*.

Já as amostras representantes das populações do Maranhão, Barra do Corda e Mirador que se encontram a 150 Km de distância, foram coletadas no campo e a vegetação nativa ainda apresentava pontos de contato entre o cerrado e campo cerrado, segundo RADAM-Brasil (1973). Os municípios de Esperantina e Campo Maior, onde as amostras foram coletadas em campo, distanciavam-se em 96 Km e Campo Maior se encontra a 366 Km de Barra do Corda. Ainda assim não houve evidência de divergência entre estas localidades. Um maior equilíbrio na distribuição da espécie foi encontrado nessa região onde houve relativa facilidade de se encontrar colônias no campo e ainda outras espécies de Meliponíneos como *Melipona quinquefasciata* e *Melipona subnitida* e *Melipona compressipes*. Tal população amostrada abrange uma área de aproximadamente 690 km² com isolamento geográfico imposto por descontinuidade da vegetação original até a próxima população em Gandu-BA, localizada a 1740 Km da mesma. De acordo com observações feitas a campo há uma tendência de concentração de colônias mantidas por meliponicultores que raramente possuem 44 colônias (o número médio de colônias por meliponários encontrados não excederam 20), necessárias a manutenção de variabilidade mínima de seus alelos sexuais. Como os ecossistemas nessa região ainda não se encontravam devastados, como nas regiões Sul e Sudeste tal problema é minimizado pela existência de enxames nativos próximos aos meliponários.

Em Gandu-BA, as amostras foram coletadas em meliponário, entretanto este se encontrava na região de reprodução da espécie o que permitia cruzamentos com colônias do campo além das existentes no local. Ainda assim, como não podemos controlar ou avaliar tais cruzamentos a amostra pode ser considerada única como as provenientes de Blumenau-SC e Domingos Martins-ES. Podendo justificar tal similaridade genética

Já Domingos Martins-ES, onde a amostra foi cedida também por meliponicultor, este possuía uma única colônia da espécie, que segundo seus relatos é dificilmente encontrada na região. Apesar de localizar-se a 744 Km de Gandu-BA pertenceu ao mesmo grupo irmão quando analisada por *primers* curtos, só apresentando variabilidade no limite de 2,7 % com analisada somente por *primers* longos e de 1,3% quando analisada com ambos os *primers*.

A amostra de Blumenau representante da população de Santa Catarina se encontra a 1116 Km de Domingos Martins-ES e a 1860 Km de Gandu-BA e ainda a 3138 km de Barra do Corda e a porcentagem de dissimilaridade entre as populações de Blumenau e tais localidades foi de 27% em relação à população de Minas Gerais da qual dista apenas 576 Km, a porcentagem de dissimilaridade foi de 29%.

O baixo índice de polimorfismo detectado entre indivíduos da mesma população pode ainda estar relacionado com a técnica escolhida para detectar divergências. ANTOLIN *et al.* (1996) construindo um mapa de ligação por marcadores RAPD na vespa *Bracon hebetor* e no mosquito *Aedes aegypti* relatam que tais marcadores, quando analisados por eletroforese em gel de agarose, reduzem a quantidade de informações obtidas, pois seus marcadores segregam como alelos dominantes.

JIANG *et al.* (1997), relatam ainda em mapas de ligação por marcadores RAPD em *Asparagus officinalis* que sua eficiência é proporcional ao nível de heterozigosidade genética na espécie sob estudo, que pode ser função do sistema de cruzamentos e da sua diversidade genética. Nos Meliponini o número de indivíduos geneticamente ativos por área reprodutiva é de aproximadamente um indivíduo por 10.000 m² (KERR, 1950).

Os dendrogramas indicam que a população de Minas Gerais apresentou

maior similaridade com a de Blumenau e ambas mantiveram maiores índices de divergência quando comparadas às outras amostras, para todos os *primers* analisados. Estas foram as populações amostradas que apresentaram maior dificuldade na localização da espécie em seu habitat natural, evidenciando o pequeno tamanho da população como fator de pequena diversidade interna e grande divergência entre grupos isolados.

A população formada por Maranhão e Piauí foi a maior, ressaltando que não só o tamanho da população pode justificar a similaridade interna desses grupos. Fatores biológicos como o sistema de acasalamento com um único macho e o sistema haplo-diplóide, ou ainda a sensibilidade da técnica de marcadores RAPD, essencialmente dominantes, em agarose, onde há menor sensibilidade detecção de bandas têm influencia no baixo nível de variabilidade intra-populacional encontrado.

Considerando as variações de divergência inter-populacionais, os grupos representados pela subespécie *Melipona rufiventris rufiventris* apresentaram maior divergência entre suas populações do que da subespécie *Melipona rufiventris flavolineata*. Tal divergência colocou o grupo formado pelas populações Bahia-Espírito Santo mais próximo de uma população formada por outra subespécie do que da sua própria, revelando variações genéticas maiores dentro da subespécie *M. rufiventris rufiventris*. A distribuição original descrita por MOURE & KERR (1950) mostra que *Melipona rufiventris rufiventris* distribuía-se em uma grande área; Bahia, sul de Goiás, Mato Grosso estreitando-se para o sul até Santa Catarina e *Melipona rufiventris flavolineata* ocupando uma área menor: Pará, bacias do Xingú e baixo Tocantins até o Guarupy. Indivíduos de pequenos grupos isolados, são comumente menos divergentes que outros pertencentes a populações maiores. Uma pequena população vivendo em uma área confinada torna-se mais adaptada a um tipo ambiental restrito, enquanto que se há uma grande área de distribuição a seleção operará sob condições de maior variabilidade o que provavelmente corresponderá a uma maior variação de tipos com maior sucesso (WALLACE, 1969).

O número de espécies e a quantidade de informação genética em um organismo representativo constituem apenas uma parte da diversidade biológica sobre a Terra. Cada espécie é constituída de muitos organismos. As espécies com grande amplitude consistem de populações de procriações múltiplas, que

demonstram padrões complexos de variação geográfica no polimorfismo genético. Assim mesmo que uma espécie em perigo seja salva da extinção, ela provavelmente terá perdido muito de sua diversidade interna. A perda de populações geneticamente distintas dentro de espécies é, no momento, pelo menos tão importante quanto o problema da perda de toda a espécie. Uma vez que a espécie seja reduzida a um resto, e sua extinção total, em um futuro próximo, torna-se muito mais provável (EHRLICH, 1988).

MYERS (1997) alertou para o grave problema de perda de populações, mesmo considerando espécies não ameaçadas de extinção, pelo impacto causado pela redução da variabilidade genética, ressaltando a necessidade de conservação de populações assim como da espécie em geral.

4.2 Análise Molecular do gene 16S rRNA do DNA mitocondrial por SSCP (Single strand conformation polymorphism)

Comparações entre o padrão de bandas por análise da migração dos fragmentos revelou três haplótipos entre as populações analisadas (Figura 8). O primeiro agrupou as populações do Maranhão, Piauí e Bahia o segundo Santa Catarina e Espírito Santo e o terceiro a população de Minas Gerais.

É importante enfatizar que nem sempre pequenas mutações vêm acompanhadas de poucas mudanças conformacionais, isto é, uma única base modificada pode compactar completamente a molécula de DNA, pois favorece a formação de estruturas secundárias, que migram mais rapidamente na eletroforese.

O resultado apresentou concordância entre as taxas de divergência de DNA nuclear e mitocondrial (para o gene analisado). As populações do Maranhão, Pauí e Bahia permaneceram em um mesmo agrupamento para ambas as análises. A população de Minas Gerais permaneceu como grupo isolado. Apresentando como variante entre as duas metodologias o mesmo haplótipo para Blumenau e Espírito Santo, que por análise de marcadores RAPD se encontram em grupos distintos, e Espírito Santo agrupado com a população da Bahia.

Em vertebrados, mtDNA apresenta uma taxa de evolução muito mais rápida que scnDNA (*single copy nuclear DNA*), MORITZ *et al.* (1987), em contraste com

invertebrados que exibem aproximadamente a mesma taxa de mudanças (substituições de nucleotídeos ou aminoácidos) para ambos os genomas (VAWTER & BROWN, 1986; POWELL *et al.*, 1986).

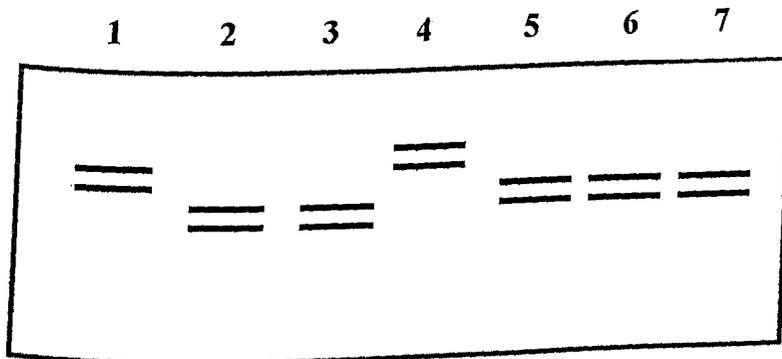


Figura 8 Padrão de variabilidade gerado por primer correspondente a região de 534 p do gene mitocondrial 16S rRNA. 1-*Apis mellifera*, 2 a 7-*M.rufiventris*, 2-(SC), 3-(ES), 4-(MG), 5-(BA), 6-(PI), 7-(MA).

VAWTER & BROWN (1986) relataram uma flutuação entre taxas de evolução entre mtDNA e scnDNA como evidência de que genomas de diferentes compartimentos subcelulares em um organismo estão sob diferentes controles e forças evolucionárias, que não são uniformes e evoluem diferentemente em diferentes taxa.

Como geograficamente a amostra de Domingos Martins representante da população do Espírito Santo se encontrava em uma posição geográfica intermediária entre as populações de Santa Catarina, com a qual esta guarda similaridade para um gene mitocondrial, e Bahia, considerada como população mais próxima por marcadores nucleares, existe a possibilidade de estarmos em uma região limite entre dois grupos distintos.

Algumas zonas híbridas apresentam clines concordantes para genes nucleares e mt DNAs, AVISE *et al* (1984); SZYMURA *et al* (1985); HARRISON *et al.* (1987), ou ainda possuem um mosaico genético com indivíduos apresentando

variantes de haplótipos mitocondriais. BROWN & CHAPMAN (1991) caracterizaram zonas de contato entre subespécies de *Fundulus heteroclitus*, considerando genes mitocondriais e nucleares. SHEPPARD *et al.* (1992) estabeleceram uma análise populacional em *Ceratites capitata* por comparação de variações no DNA mitocondrial, traçando um possível processo de colonização e distribuição geográfica.

Como um único indivíduo foi analisado nessa região, não podemos afirmar a existência de um padrão similar ao haplótipo da população da Bahia para colônias localizadas mais ao norte de Domingos Martins. Podemos ainda considerar uma taxa de evolução diferencial para mtDNA e scnDNA. A população do Espírito Santo isolada a um tempo maior da população de Blumenau, já estaria diferenciada da mesma pelo DNA nuclear mantendo um haplótipo similar a Santa Catarina por uma taxa de evolução mais lenta do gene 16S rRNA mitocondrial, que apresenta uma menor acumulo de mutações quando comparado a outros genes mitocondriais.

A estabilidade do mtDNA e a não evidência de mosaicismos foram demonstrados pela técnica de SSCP-PCR. Embora o seqüenciamento do DNA indique com precisão o tipo de mutação ocorrida, não se sabe qual evento, duplicação, deleção ou mutação de ponto, ocorreu primeiro. Portanto, o SSCP vem auxiliar de maneira eficiente os estudos de evolução e especiação.

5. CONCLUSÕES

- A análise de 84 marcadores RAPD permitiu a separação de três grupos distintos a nível de 27% de distância genética. O grupo 1 representado pela população de Minas Gerais, como o geneticamente mais distante dos demais. O grupo 2 representado pela população de Santa Catarina como o segundo mais divergente e o terceiro grupo representado pelas populações do Espírito Santo, Bahia, Piauí e Maranhão.
- Houve grande similaridade intra populacional tanto para populações amostradas de maior tamanho quanto para populações menores e variabilidade significativa entre populações, com exceção das mais próximas geograficamente como as do Piauí e Maranhão e entre as do Espírito Santo e Bahia.
- Os *primers* longos selecionados conseguiram evidenciar dissimilaridades não detectadas por *primers* curtos entre populações muito próximas como as da Bahia e do Espírito Santo.
- Comparações entre o padrão de bandas por análise da migração das fitas do fragmento 16S rRNA mitocondrial revelou três haplótipos entre as populações analisadas. O primeiro reúne as populações do Maranhão, Piauí e Bahia. Um segundo grupo abrange as populações de Santa Catarina e Espírito Santo e o terceiro é formado pela população de Minas Gerais.
- Houve concordância entre os resultados de divergência entre DNA nuclear e mitocondrial (para o gene analisado). Populações provenientes do Maranhão, Piauí e Bahia permaneceram em um mesmo agrupamento e a população de

Minas Gerais permaneceu como grupo isolado, para ambas as análises. Entretanto, o mesmo haplótipo mitocondrial foi encontrado para as populações de Blumenau e Espírito Santo. Análise de marcadores RAPD os colocou em grupos distintos.

- A população do Espírito Santo se encontra em uma posição geográfica intermediária entre as populações de Santa Catarina e Bahia, com a primeira guarda similaridade para um haplótipo mitocondrial, com a segunda maior proximidade por marcadores nucleares. Apresentando uma provável taxa de evolução diferencial para o DNA mitocondrial e nuclear.
- Para esclarecer a divergência entre marcadores nucleares e mitocondriais, na população do Espírito Santo, uma amostragem maior nos limites ao sul da Bahia e ao norte da população de Santa Catarina poderia definir os caminhos para a história evolucionária de tais populações.

7.BIBLIOGRAFIA

- ABSY, M.L.; CAMARGO, J.M.F.; KERR, W.E. & MIRANDA, I.P.A. 1984. Espécies de plantas visitadas por Meliponinae (Hym., Apidae) para coleta de pólen na região do médio Amazonas. **Rev. Brasil. Biol.** 44(2): 227-237.
- ANTOLIN, M.F.; BOSIO, C.F.; COTTON, J.; SWEENEY, W.; STRAND, M.R. & BLACK, W.C. 1996. Intensive linkage mapping in a wasp (*Bracon hebetor*) and a mosquito (*Aedes aegypti*) with Single-Strand Conformation polymorphism analysis of random amplified polymorphic DNA markers. **Genetics** 143: 1727-1738.
- ARAÚJO, E.D.; DINIZ-FILHO, J.A.F. & OLIVEIRA, F.A.A. 1997. Tempo de extinção populacional em *Melipona* (Hym., Apidae) em função da dinâmica de alelos no locus *xo*: Efeitos do tamanho populacional e produção de machos por operária. **Rev. Brasil. Genet.** 20: 3-Suplement p 306.
- ATTARDI, G. 1985. Animal mitochondrial DNA: An extreme example of genetic economy. **Int. Rev. Cytol.** 93: 93-145.
- AVISE, J.C. & SMITH, M.H. 1974. Biochemical genetics of sunfish. I. Geographic variation and subspecific intergradation in the bluegill, *Lepomis macrochirus*. **Evolution** 28: 42-56.

- AVISE, J.C.; BERMINGHAM, E.; KESSLER, L.G.; SAUNDERS, N.C. 1984. Characterization of mitochondrial DNA variability in a hybrid swarm between subspecies of blugill sunfish (*Lepomis macrochirus*). **Evolution** 38: 931-941.
- AVISE, J.C. 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. **Phil. Trans. R. Soc. London B** 312: 325-342.
- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. 1987. Intraespecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and sistematics. **Annu. Ver. Ecol. Syst**, 18: 489-522.
- AYALA, F.J. 1993. Genetic polimorphysm: from eletrophoresis to DNA sequences. **Experientia** 39: 813-823.
- AZEREDO-ESPIN, A.M.L.; SCHRODER, R.F.W.; HUETTEL, M.D. & SHEPPARD, W.S. 1991. Mitochondrial DNA variation in geographic populations of Colorado potato beethe, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera; Chrysomelidae). **Experientia** 47: 483-485.
- BANNAI, M.; TOKUNAGA, K.; LIN, L.; KUWATA, S.; MAZDA, T.; AMAKI, I.; FUJIKAWA, K. & JUJI, T. 1994. Discrimination of human HLA-DRB1 alleles by PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) method. **Eur. J. immunogenet.** 21: 1-9.
- BECKMANN, J.S. & SOLLER, M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: metodologies, mapping and costs. **Theor. Appl. Genet.** 67: 35-43.

- BLANCHETOT, A. 1991. Genetic relatedness in honeybees as established by DNA fingerprinting. **J. Hered.** **82**: 391-396
- BROWN, B.L. & CHAPMAN, R.W. 1991. Gene flow and mitochondrial DNA variation in the killifish, *Fundulus heteroclitus*. **Evolution** **45(5)**: 1147-1161.
- BROWN, W.M. & WILSON, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **76**: 1967-1971.
- BROWN, W.M.; PRAGER, E.M.; WANG, A. & WILSON, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. **J. Mol. Evol.** **18**: 225-239.
- 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, Uberlândia, 54p.
- CAMARGO, C.A. 1974. Produção de machos diplóides de *Melipona quadrifasciata* (Hym., Apidae) **Ciência e Cultura** **26** (Suplemento, Resumo da XXVI Reunião Anual da SBPC).
- CAMARGO, J.M.F. & PEDRO, S.R.M. 1992. Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hym., Apidae): a mini review. **Apidologie** **23**: 1-32.
- CAMERON, S.A.; DERR, J.N.; AUSTIN A.D.; WOOLLEY J.B. & WHARTON, R.A. 1992. The application of nucleotide sequence data to phylogeny of the Hymenoptera: A Review. **J. Hym. Res.** **1** : 63-79.

- CARVALHO, G.A.; KERR, W.E. & NASCIMENTO, V.A. 1995. Sex determination in bees. XXXIII. Decrease of xo heteroalleles in a finite population of *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). **Rev. Brasil. Genet.** **18 (1):** 13-16.
- CLAYTON, D.A. 1984. Transcription of the mammalian mitochondrial genome. **Ann. Rev. Biochem.** **53:** 573-594.
- CROZIER, R.H. 1990. From population genetics to phylogeny: uses and limits of mitochondrial DNA. **Aust. Syst. Bot.** **3:** 111-124.
- CROZIER, R.H. & CROZIER, Y.C. 1993. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: Complete sequence and genome organization. **Genetics** **133(1):** 97-117.
- DOWLING, T.E.; MORITZ, C. & PALMER, J.D. 1990. Nucleic acids II: Restriction site analysis. p 250-317. In: **Molecular Systematics**. D.M. Hillis and C.Moritz, Ed. Sinauer Assoc., Sunderland, MA.
- EHRILICH, P.R. 1988. The lost of diversity, causes and consequences. IN: WILSON, E.O. **Biodiversity**. National Academic Press.p.7
- FAIRBANKS, D.J.; WALDRIGUES, A.; RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; MAUGHAN, P.J.; ROBINSON, L.R.; ANDERSEN, W.R.; RIEDE, C.R.; PAULEY, C.S.; CAETANO, L.G.; ARANTES, M.N.; FUNGARO, M.H.P.; VIDOTTO, M.C. & JANKEVICIUS, S.E. 1993. Efficient characterization of biological diversity using field DNA extration and random amplified polymorphic DNA markers. **Rev. Brasil. Genet.****16(1):** 11-22.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1996. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2ª Ed., EMBRAPA-CENARGEM, Brasília, p. 16-23.

- FUTUYMA, D.J. 1992. *Biologia Evolutiva*. Ed. Soc. Bras. Genet., p. 646.
- GRAY, M.W. 1989. Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 5: 25-50.
- GRAYBELL, A. 1994. Evaluating the phylogenetic utility of genes: a search for genes informative about deep divergences among vertebrates. *Syst. Biol.* 43(2): 174-193.
- HARDRYS, H.; SCHIERWATER, B.; DELLAPORTA, S.L.; DESALLE, R. & BUSS, L.W. 1992. Determination of paternity in dragonflies by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Mol. Ecol.* 2: 79-87.
- HALL, H.G. 1990. Parental analysis of introgressive hybridization between Africanized and European honeybees using nuclear DNA RFLPs. *Genetics* 125: 611-621.
- HARRISON, R.G. 1991. Molecular changes at speciation. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 22: 281-308.
- HARRISON, R.G.; RAND, D.M.; WHEELER, W.C. 1987. Mitochondrial DNA variation across a narrow hybrid zone. *Mol. Bio. Evol.* 4: 144-58.
- HOSHINO, S.; KIMURA, A.; FUKUDA, Y.; DOHI, K. & SASAZUKI, T. 1992. PCR-SSCP analysis of polymorphism in DPA1 and DPB1 genes: Simple and rapid method for histocompatibility test. *Hum. Immunol.* 33: 98-108.
- HOY, M.A. 1994. *Insect Molecular Genetics: An introduction to principles and applications*. Academic Press, San Diego. (Chapters 13, 14). Academic Press, San Diego, p 546.

- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V. & THEIN, S.L. 1985. Individual-specific fingerprints of human DNA. **Nature** **316**: 76-79.
- JIANG, C.; LEWIS, M.E. & SINK, K.C. 1997. Combined RAPD and RFLP molecular linkage map of asparagus. **Genome** **40**: 69-76.
- KERR, W.E. 1974. Sex determination in bees. III Castle determination and genetic control in *Melipona*. **Insectes Sociaux** **21(4)**: 357-368.
- KERR, W.E. & VENCOSKY, R. 1982. Melhoramento genético em abelhas. I. Efeito do número de colônias sobre o melhoramento. **Rev. Brasil. Genet.** **5**: 279-285.
- KERR, W.E. 1987. Determinação do sexo nas abelhas. XVI. Informações adicionais sobre os genes *xo*, *xa* e *xb*. **Revista Brasileira de Biologia** **47(1/2)**: 111-113.
- KERR, W.E.; NASCIMENTO, V.A. & CARVALHO, G.A. 1994. Há salvação para os meliponíneos? **Anais I Encontro sobre Abelhas de Ribeirão Preto** (2 a 4 de julho/94). p. 60-65.
- KERR, W.E. 1996. Os heteroalelos *xo* nas populações de himenópteros. **Anais II Encontro sobre abelhas**. Ribeirão Preto-SP (06 a 09 de junho/96) p.03-11.
- KLEIN-LANKHORST, R.M.; VERMUNT, A.; WEIDE R.; LIHARSKA, T. & ZUBEL, P. 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Theor. Appl. Genet.** **81**: 101-108.
- LI, W.H.; GRAUR, D. 1991. **Fundamentals of Molecular Evolution**. Ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA. p 284 .

- MARUYA, E.; SAJI, H. & YOKOYAMA, S. 1996. PCR-LIS-SSCP (Low Ionic Strength Single-stranded Conformation Polymorphism). A simple method for high-resolution allele typing of HLA-DRB1, DQB1 and DPB1. **Genome Research** 6: 51-57.
- MEUNIER, J.R. & GRIMONT, P.A.D. 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Res. Microbiol.** 144: 373-379.
- MYERS, N. 1997. Mass extinction and evolution. **Science** 278: 597-598.
- MORITZ, C.; DOWLING, T.E.; BROWN, W.M. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 1987. 18: 269-292.
- MORITZ, R.F.A.; MEUSEL, M.S. & HABERL, M. 1991. Oligonucleotide DNA fingerprinting discriminates super and half-sisters in honeybee colonies (*Apis mellifera* L.). **Naturwissenschaften** 78: 442-424.
- MOURE, J.S. & KERR, W.E. 1950. Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apoidea). **Dusenía** 1(2): 125-129.
- OLDROYD, B.O.; CORNUET, J.M.; ROWE, D.; RINDERER, T.E. & CROZIER, R.H. 1995. Racial admixture of *Apis mellifera* in Tasmania, Australia: similarities and differences with natural hybrid zones in Europe. **Heredity** 74: 315-325.
- ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K. & SEKIYA, T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 86: 2766-2770.
- PAGE, R.E.; LAIDLAW, H.H. & ERICKSON, E.H. 1985. Closed population honeybee breeding. 4. The distribution of sex alleles with top crossing. **J. Apic Res.** 24(1): 38-42.

- POWELL, J.R.; CACCONI, A.; AMATO, G.D.; YOON, C. 1986. Rates of nucleotide substitution in *Drosophila* mitochondrial DNA and nuclear DNA are similar. **Proc. Natl. Acad. Sci. 83**: 9090-9093.
- RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. **Trends in Genetics 9(8)**: 275-280.
- ROUBIK, D.W. 1989. **Ecology and natural history of tropical bees**. Cambridge, University Press, New York, p 514.
- ROUBIK, D.W.; WEIGT, L.A. & BONILLA, M.A. 1996. Population genetics, diploid males and limits to social evolution of Euglossine bees. **Evolution 50(2)**: 931-935.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.E. & MANIATS, T. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press-NY.
- SCARPASSA, V.M. 1996. **Divergência Genética entre populações alopátricas de *Anopheles nuneztovari* Galbaldón, 1940 (Diptera: Culicidae) do Brasil e da Colômbia**. Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do Convênio INPA/FUA. 159p.
- SCHIERWATER, B. & ENDER, A. 1993. Different thermostable DNA polymerase may amplify different RAPD products. **Nucl. Acid. Res. 21**: 4647-4648.
- SCHIERWATER, B. 1995. Arbitrarily amplified DNA in systematics and phylogenetics. **Electrophoresis 16**: 1643-1647.
- SHEPPARD, W.S.; RINDERER, T.E.; MAZZOLI, J.A.; STELZER, J.A. & SHIMANUKI, H. 1991. Gene flow between African and European derived honey bee populations in Argentina. **Nature 349**: 782-784.

- SHEPPARD, W.S.; STECK, G.J. & MCPHERON, B.A. 1992. Geographic populations of the medfly may be differentiated by mitochondrial DNA variation. **Experientia 48**: 1010-1013.
- SOUTHERN, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Molec. Biol. 98**: 503-511.
- SZYMURA, J.M.; SPOLSKY, C.; UZZELL, T. 1985. Concordant change in a hybrid zone between two frog species. **Experientia 41**: 1469-1470.
- TANKSLEY, S.D.; YOUNG, N.D.; PATERSON, A.H.; BONIERBALE, M.W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Biotechnology 7**: 257-264.
- TEMPLETON, A.R. 1981. Mechanisms of speciation a population genetic approach. **Ann. Rev. Ecol. Syst. 12**: 23-48.
- TEMPLETON, A. R. 1994. The role of molecular genetics in speciation studies. **Mol. Ecol. Evol.** 455-477.
- VAWTER, L. & BROWN, W.M. 1986. Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. **Science 234**: 194-196.
- VASIL, I.K. & HERRERA-ESTRELLA, L. 1994. Da revolução verde à revolução genética. **O Correio da Unesco, 22(8)**: 30-34.
- WALLACE, C. 1969. **A study of Evolution**. Blackie and Son Limited. Bishopbriggs, Glasgow 5 London, W.1. p. 93-94.

- 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.
- 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.
- WILSON, A.C.; CANN, R.L.; CARR, S.M.; GEORGE, M.; GYLLENSTEIN, U.B. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biol. J. Linn. Soc.** **26**: 375-400.
- WOYKE, J. 1980. Effect of sex allele homo-heterozygosity on honeybee colony populations and on their honey colony populations and on their honey production.1. Favourable development conditions and unrestricted queens. **Journ. Apic.Res.** **19**: 51-63
- YOKOYAMA & NEI, M. 1979. Population dynamics of sex determining alleles in honey bees and self-incompatibility alleles in plants. **Genetics** **91**: 609-626

FU-00009873-1