

MON
30.04.99-15
MID
TES/ME

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA POR MARCADORES RAPD
EM *Tetragonisca angustula* LATREILLE, 1811
(HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINAE)**

Rosana de Cássia Oliveira

Tese apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos requisitos para a
obtenção do Título de Mestre em Genética e
Bioquímica, área de concentração Genética.

DIRBI/UFU



1000187162

Uberlândia - Minas Gerais - Brasil

Março de 1998

COMISSÃO JULGADORA

MEMBROS TITULARES:

Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr
Orientador

Prof. Dr. Luíz Ricardo Goulart Filho
Co-Orientador

Profa. Dra. Vera Lúcia Imperatriz-Fonseca

MEMBROS SUPLENTE:

Profa. Dra. Ana Maria Bonetti

Profa. Dra. Cecília Lomônaco de Paula

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Olavo e Maria de Fátima pelo apoio, incentivo e horas de ausência.

Às minhas irmãs, Rosemeire, Rosa Maria e Raquel e meus sobrinhos Matheus e Filipe.

Aos meus avós, João, Luzia e Emília.

Ao Agostinho, pelo amor, companheirismo e paciência nas infindáveis horas de espera.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela vida e generosidade.

Ao grande amigo e exemplo de vida, **Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr** pelo que me ensina diariamente.

À **Da. Lygia Sansigolo Kerr e Gilda C. Silva** pelo carinho com que sempre me recebem em sua casa.

Ao **Prof. Dr. Luíz Ricardo Goulart Filho** pela amizade, sugestões de tese e gentileza de ter colocado seu laboratório à disposição, enquanto o nosso encontrava-se em construção.

À **Profa. Dra. Ana Maria Bonetti** pelo que me ensinou sobre as abelhas, pela amizade e sugestões de tese.

À **Profa. Dra. Cecilia Lomônaco de Paula** pelas valiosas sugestões na discussão e gentileza de aceitar o convite de participar de minha banca examinadora.

À **Profa. Dra. Vera Lúcia Imperatriz-Fonseca** que gentilmente se dispôs a participar com sugestões em minha banca examinadora.

À **Vânia A. Nascimento e Gislene A. de Carvalho** que me despertaram para o mundo das abelhas.

Ao **Prof. Dr. João M. Franco de Camargo** (USP - Ribeirão Preto) pela gentileza em ter identificado o material biológico deste estudo.

À **Profa. Dra. Sydney A. Cameron** (University of Arkansas) pelo apoio (mesmo de longe).

A todos os demais **colegas e professores** deste Departamento que direta ou indiretamente contribuíram para com a minha tese.

Às minhas amigas **Soraya M. de Vasconcelos, Vívian A. Marques e Ana Paula S. Campos** que muito me auxiliaram no laboratório.

Aos **amigos** dos Laboratórios de Genética, Genética Molecular e Bioquímica (Adelmo, Alexandre, Bárbara, Carlos Gustavo, Carlos Humberto, Célia, Cícero, Cleber, Cristiane, Cristiano, Elisangela, Francis, Gismar, Graciele, Juliana, Júnior, Juarez, Katiere, Marcelo, Márcia Borges, Marcolino, Maurício Bezerra, Maurício Machain, Míriam, Regildo, Syomara, Terezinha, Valdesse, Vanessa, Viviane, Warley, Wania, Walter) com os quais muito aprendi e diverti.

Meus sinceros agradecimentos aos **pesquisadores e meliponicultores** que me enviaram amostras de jataí, sem as quais este trabalho não poderia ser realizado. São elas: Soraya M. de Vasconcelos (Campina Verde - MG, Barra do Corda - MA), Vânia A. do Nascimento (Ituiutaba - MG), Ivone A. Merege (Araxá - MG), José M. D. Bezerra (Canaã - MG, Domingos Martins - ES e Mirador - MA), Wanderlei Alonso (Rio Verde - GO), José Carlos Marcolino (Porangatu - GO), Warwick E. Kerr (Uberlândia - MG, Maricá - RJ e Blumenau - SC), Nilson Brilhante e Luíz Menezes (Rio Branco - AC), David W. Roubik (Panamá), Davi S. Aidar (Ribeirão Preto, Pilar do Sul - SP e Prudentópolis), José Luciano Panigassi (Pedreira - SP), Sebastião R. Gonzaga (Curitiba - PR), José B. P. Balestiere (Ladário - MS), Edson de Sousa Lima (Campinápolis - MT), Nelci T. Pascual e Jairo R. M. Lyra (Argentina).

Ao **CNPQ, CAPES, FAPEMIG e PROPP-UFU** pelo apoio financeiro.

Parágrafos 33, 153, 158, 165, 178, 184 e 191 da 4ª *Geórgica* escrito por Virgílio. A poesia era o meio de transmissão das idéias científicas mais apropriado ao gosto e aos usos do tempo. Virgílio, que apresentava toda a sua doutrina agrônômica em versos, leu este poema ao imperador Augusto que acabava de regressar, triunfante, duma campanha no Oriente, no ano 29 a.C.

.....Barram com cera as fendas estreitas e calafetam as aberturas com resina e com flores, e conservam para estes mesmos empregos uma cola reservada, mais pegajosa do que o visco e o pez.

Elas (são) as únicas que têm filhos comuns, e moradas comuns duma cidade, e passam a vida debaixo de grandes leis.

Porquanto umas, por uma covenção feita, guardam o alimento e ocupam-se nos campos; uma parte põe no interior da morada os primeiros fundamentos para os favos, uma lágrima de narciso e o branco visco da casca. Em seguida, outras suspendem as ceras tenazes; outras alimentam os fetos crescentes, esperança da raça; outras condensam os puríssimos méis, e enchem as células com este néctar líquido.

Há algumas (abelhas) às quais coube a guarda das portas, e por sua vez observam as águas e as nuvens do céu; ou recebem as cargas das que chegam, ou, feito um esquadrão, afastam dos cortiços os zangões, bando preguiçoso.

O cuidado de fabricar solidamente os favos, e construir as casas com a arte Dédalo, pertence às mais velhas. Mas as mais novas, fatigadas, recolhem-se alta noite, cheias de tomilho nas pernas.

Ao amanhecer, rompem pelas portas; nenhuma demora há; de novo a Estrela da Tarde avisou as mesmas para se retirarem finalmente dos campos e do pasto; então, dirigem-se às habitações.

Em seguida, logo que elas se recostaram nos alvéolos, faz-se silêncio durante a noite, e um sono (benfazejo) apossa-se dos membros fatigados.

Porém, nem elas se afastam bastante longe dos cortiços, estando a chuva iminente, nem se fiam do tempo, soprando os ventos.....

ÍNDICE

ABREVIACÕES.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A Família Apidae.....	1
1.2. A espécie <i>Tetragonisca angustula</i>	2
1.3. Dos Marcadores Bioquímicos em Meliponíneos.....	5
1.4. Dos Marcadores Moleculares.....	7
1.5. RAPD em Populações de Insetos.....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
2.1. Material Biológico.....	14
2.2. Extração de DNA.....	17
2.3. Quantificação e Qualificação do DNA.....	18
2.4. DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD).....	18
2.5. Separação e Visualização dos Produtos Amplificados.....	19
2.6. Análise dos Dados.....	20
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4. CONCLUSÕES.....	38
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

ABREVIações

μ l	microlitro(s)
2n	diplóide
ABS	absorbância
MgCl ₂	cloreto de magnésio
cm	centímetro(s)
cM	centimorgan(s)
dATP	5'-desoxiadenosina trifosfato
dCTP	5'-desoxicitosina trifosfato
dGTP	5'-desoxiguanosina trifosfato
dTTP	5'-desoxitimidina trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etilenodiaminotetra acético sal dissódico
h	hora(s)
M	molar
min	minuto(s)
ml	mililitro(s)
mM	milimolar
mm	milímetro(s)
n	haplóide
ng	nanograma(s)
nm	nanômetro(s)
P ³²	fósforo 32 (radioativo)
PA	puro para análise
pb	pares de base
pmol	pico-mol
rpm	rotações por minuto
U	unidade(s) de enzima
UV	ultra-violeta
UPGMA	unweighted pair-group method using arithmetic averages
V	volts

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Localização geográfica das amostras de <i>T. angustula</i> e <i>T. buchwaldi</i> . (1) - Panamá, (2) - Mirador, (3) - Barra do Corda, (4) - Porangatu, (5) - Rio Verde, (6) - Campinápolis, (7) - Ladário, (8) - Domingos Martins, (9) - Maricá, (10) - São Francisco, (11) - Bocaiúva, (12) - Grupiara, (13) - Uberlândia 1 e 2, (14) - Campina Verde, (15) - Araxá, (16) - Canaã, (17) - Ribeirão Preto, (18) - Pedreira, (19) - Pilar do Sul, (20) - Prudentópolis, (21) - Curitiba, (22) - Blumenau, (23) - Posadas, (24) - Aristóbulo del Valle, (25) - Cerro Azul.....	15
2	Dendrograma representativo da distância genética por Porcentagem de Desacordo e agrupamento pelo método de UPGMA entre os 29 genótipos (26 de <i>T. angustula</i> , 2 de <i>T. buchwaldi</i> e 1 de <i>A. mellifera</i>) por meio de 141 marcadores RAPD obtidos por "primers" curtos.....	24
3	Dendrograma representativo da distância genética por Porcentagem de Desacordo e agrupamento pelo método de UPGMA entre os 29 genótipos (26 de <i>T. angustula</i> , 2 de <i>T. buchwaldi</i> e 1 de <i>A. mellifera</i>) por meio de 77 marcadores RAPD obtidos por "primers" longos.....	26
4	Matriz das distâncias genéticas expressa em Porcentagem de Desacordo, obtida para 26 genótipos de <i>T. angustula</i> (4 a 29), dois genótipos de <i>T. buchwaldi</i> e um de <i>A. mellifera</i> por meio de 218 marcadores RAPD, gerados por "primers" curtos e longos.....	27

- 5 Dendrograma representativo da distância genética por Porcentagem de Desacordo e agrupamento pelo método de UPGMA entre os 29 genótipos (26 de *T. angustula*, 2 de *T. buchwaldi* e 1 de *A. mellifera*) por meio de 218 marcadores RAPD obtidos por “primers” longos e curtos..... 29
- 6 Visão das entradas dos ninhos de *T. angustula* e *T. buchwaldi*. A e B – Entrada do ninho de *T. angustula* em telefone público e muro, respectivamente. C – Perfil da entrada da colméia de *T. buchwaldi*. D – Ninho de *T. buchwaldi* em muro na Universidade Federal do Acre..... 31
- 7 Eletroforese em gel de Agarose (1%) dos produtos amplificados obtidos com o “primer” MAU-B2 (A) e com o “primer” OPL11 (B). M - Marcador de peso molecular de DNA, 1 - *A. mellifera*, 2 - *T. buchwaldi* 1, 3 - *T. buchwaldi* 2. As amostras de 4 a 29 são de *T. angustula*, sendo: 4 – Panamá, 5 – Mirador, 6 - Barra do Corda, 7 - Porangatu, 8 - Rio Verde, 9 – Campinápolis, 10 - Ladário, 11 – Domingos Martins, 12 – Maricá, 13 – Bocaiúva, 14 – São Francisco, 15 – Uberlândia 1, 16 – Uberlândia 2, 17 - Grupiara, 18 - Araxá, 19 – Campina Verde, 20 – Canaã, 21 – Ribeirão Preto, 22 – Pedreira, 23 – Pilar do Sul, 24 - Curitiba, 25 – Prudentópolis, 26 – Blumenau, 27 - Posadas, 28 – Aristóbulo del Valle, 29 - Cerro Azul..... 33
- 8 Localização geográfica dos dois “clusters” de *T. angustula* obtidos por 218 marcadores RAPD. O grupo 1 (vermelho) é constituído por (1) Panamá, (2) Mirador, (3) Barra do Corda, (10) São Francisco, (11) Bocaiúva, (15) Araxá, (8) Domingos Martins, (16) Canaã, (9) Maricá, (18) Pedreira, (21) Curitiba e (22) Blumenau. O grupo 2 (preto) : (4) Porangatu, (5) Rio Verde, (12) Grupiara, (13) Uberlândia 1 e 2, (14) Campina Verde, (17) Ribeirão Preto, (19) Pilar do Sul, (20) Prudentópolis, (6) Campinápolis, (7) Ladário, (23) Posadas, (25) Aristóbulo del Valle, e (24) Cerro Azul..... 35

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Identificação e origem das 29 amostras avaliadas neste estudo.....	16
2	"Primers" utilizados e suas respectivas sequências de nucleotídeos.....	19
3	Relação do número total de bandas amplificadas, polimórficas e tamanho estimado das bandas por "primer" curto para a população de <i>T. angustula</i>	22
4	Relação do número total de bandas amplificadas, polimórficas e tamanho estimado das bandas por "primer" longo para a população de <i>T. angustula</i>	23

RESUMO

Tetragonisca angustula (Latreille, 1811), conhecida popularmente como jataí, é uma das abelhas sem ferrão mais comuns da região Neotropical. Ela apresenta locais de nidificação bem variados e é encontrada do México à Argentina. Este trabalho determinou a distância genética por marcadores RAPD em populações de *T. angustula* provenientes de 26 lugares (3 países da América Latina), de duas amostras de *Tetragonisca buchwaldi* (jataí do Acre), usando *Apis mellifera* como "outgroup". Foram analisados 18 "primers" (11 curtos) e (7 longos) que produziram 218 bandas com uma média de 3,8 polimorfismos por "primer" para o grupo de jataí. A distância genética por Porcentagem de Desacordo e UPGMA dividiu a população de *T. angustula* em dois grupos a 0,139. O grupo 1 foi composto por Panamá, Mirador, Barra do Corda, Domingos Martins, São Francisco, Araxá, Canaã, Pedreira, Curitiba, Blumenau, Maricá e Bocaiúva. O grupo 2, foi constituído por Porangatu, Rio Verde, Uberlândia 1 e 2, Ribeirão Preto, Pilar do Sul, Prudentópolis, Campinápolis, Campina Verde, Grupiara, Ladário, Cerro Azul, Posadas e Aristóbulo del Valle. Panamá foi o genótipo mais externo do grupo 1 com uma distância genética de 0,121 enquanto que a distância genética máxima do grupo 2 foi de 0,072 para o grupo Argentino (Posadas, Aristóbulo del Valle e Cerro Azul). O genótipo de Pilar do Sul obtido pela análise de "cluster" (grupo 2) aparentemente, não correspondeu à distribuição geográfica. Isto pode ter ocorrido devido ao local de coleta desta amostra. Esta e, também, a de Prudentópolis, foram coletadas de colônias provenientes destes locais que estão em um meliponário em Ribeirão Preto desde 1993 e 1992, respectivamente. Os "primers" longos foram mais eficientes

na distinção de grupos mais distantes não sendo, porém, para os genótipos mais similares. Os "primers" curtos por sua vez, foram mais eficientes na distinção de genótipos mais próximos. O grau de distância genética entre *T. angustula* e *T. buchwaldi* que pertencem ao mesmo gênero (0.519) foi maior do que entre *T. angustula* e *A. mellifera* (0.525) que são de sub-famílias diferentes. Quatro suposições foram levantadas: 1). O número de amostras de *A. mellifera* e *T. buchwaldi*, usado neste trabalho, foi pequeno. 2). O número de "primers" longos (separa "clusters" mais altos) foi pequeno. 3). A eficiência da técnica de RAPD foi comprometida em grupos hierárquicos mais altos. 4). *T. buchwaldi* está mais distante de *T. angustula* do que é observado pela morfologia. Para elucidar esta questão, novos experimentos RAPD usando mais amostras de *T. buchwaldi* e "primers" longos, além de trabalhos de biologia e revisão sistemática do grupo, serão relevantes. Foram encontrados 5 marcadores moleculares (provenientes de dois "primers") capazes de distinguir os dois grupos de *T. angustula*. Um padrão de distribuição mais abrangente para o "cluster" 2 (correspondente à *T. a. fiebrigi*) foi encontrado, correspondendo ao nordeste da Argentina, oeste dos Estados do Paraná, Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais, Goiás e nos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. O grupo 1 (correspondente à *T. a. angustula*) encontrou-se distribuído no Panamá, Maranhão, Norte de Minas Gerais e pela Mata Atlântica alcançou o Estado de Santa Catarina. Exceto para as amostras do Norte de Minas (Bocaiúva e São Francisco) e Araxá, o "cluster" 1, de uma maneira geral, encontrou-se distribuído em florestas úmidas. Não foi possível estabelecer os limites entre os grupos na região norte de Mato Grosso, Goiás, Tocantins e Amazônia, por falta de coleta nestes locais. Marcadores RAPD mostraram ser uma eficiente ferramenta molecular para estudos de populações em Meliponíneos.

ABSTRACT

Tetragonisca angustula (Latreille, 1811) popularly known as 'jataí', is one of the most common stingless bees of the Neotropical region. It presents well varied nidification sites and it is found from Mexico to Argentina. This research determined the genetic distance through RAPD markers among 29 bee populations comprising: 26 samples of *T. angustula* from 26 different places in three Latin America countries; two samples of *T. buchwaldi* ('jataí' from Acre) and one sample of *Apis mellifera* as the outgroup. Eleven short and seven long primers were used in this analysis. They produced 218 bands with an average number of polymorphism per primer of 3,8 for the 'jataí' group. The genetic distance as Percent Disagreement (PD) divided the *T. angustula* population in two groups at the level of 0,139. Group 1 was formed by the samples: Panamá, Mirador, Barra do Corda, Domingos Martins, São Francisco, Araxá, Canaã, Pedreira, Curitiba, Blumenau, Maricá and Bocaiúva. Group 2 comprised: Porangatu, Rio Verde, Uberlândia 1 and 2, Ribeirão Preto, Pilar do Sul, Prudentópolis, Campinápolis, Campina Verde, Grupiara, Ladário, Cerro Azul, Posadas and Aristóbulo del Valle. Panamá was the most different genotype within group 1, with a genetic distance of 0,121 from the others, while the maximum distance within group 2 was 0,072 for the Argentinian group (Posadas, Aristóbulo del Valle and Cerro Azul) in relation to the others in the same group. The genotype of Pilar do Sul obtained by the cluster analysis (group 2) apparently does not correspond to its geographic distribution. This may have occurred due to the fact that this sample, and also the one from Prudentópolis, were collected in a meliponary in Ribeirão Preto which were kept there since 1993 and 1992, respectively. The long primers

were more efficient in the distinction of more distant groups, while short primers were more efficient in the distinction of closer genotypes. The genetic distance (0,159) between *T. angustula* and *T. buchwaldi* which belongs to the same genus was larger than between *T. angustula* and *A. mellifera* (0,525) which are from different sub-families. Four suppositions were raised: 1): the number of samples of *A. mellifera* and *T. buchwaldi* used in this study was small; 2): the number of long primers was small; 3): the efficiency of the RAPD technique was endangered in higher hierarchical groups. 4). *T. buchwaldi* is more distant from *T. angustula* than it is observed morphologically. To elucidate this question, new RAPD experiments using more *T. buchwaldi* samples and a large number of long primers, besides further biology and systematic research are needed. Five molecular markers (from two primers) were able to distinguish the two *T. angustula* groups. A larger pattern of distribution for cluster 2 (corresponding to *T. a. fiebrigi*) was found, corresponding to Northeast Argentina, West Paraná, Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso and Mato Grosso do Sul. Group 1 (corresponding to *T. a. angustula*) was distributed in Panamá, Maranhão, North Minas Gerais and through the Atlantic forest reached the state of Santa Catarina. Except for the samples of North Minas Gerais (Bocaiúva and São Francisco) and Araxá, cluster 1, in a general manner, was found distributed throughout rain forests. It was not possible to establish limits between groups in the Northern Mato Grosso, Goiás, Tocantins and the Amazon region, due to the lack of collectings in such areas. RAPD markers were considered to be an efficient molecular tool for the study of populations in meliponines.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Família Apidae

Os insetos constituem o grupo de animais dominante na Terra. Ultrapassam, em número de indivíduos, todos os outros animais e ocorrem praticamente em todos os lugares (BORROR & DELONG, 1988). Na classe Insecta, a superfamília Apoidea, com 9 famílias, destaca-se por sua grande diversidade de comportamentos sociais e por suas múltiplas relações com plantas e animais.

As abelhas estão presentes em todos os lugares da Terra, exceto em desertos como o Saara e em lugares frios como a Antártida. Entretanto, o maior número de espécies e abundância de indivíduos encontram-se nos trópicos. A família Apidae, que inclui também as abelhas com corbícula, está sub-dividida em quatro sub-famílias: as de comportamento eusocial: as melíferas (Apinae) e as sem ferrão (Meliponinae); os primitivos *Bombus* sociais (Bombinae) e as de comportamento parasocial ou solitário (Euglossinae) (KERR, 1969; SAKAGAMI, 1982; MICHENER, 1990; CAMERON, 1993; SANTOS, 1993).

As abelhas da sub-família Meliponinae, também conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão, são responsáveis pela polinização de 40 a 90% da flora, conforme o ecossistema (KERR *et al.*, 1996). Elas possuem distribuição pantropical, com maior diversidade de formas nos trópicos das regiões Neotropical e Indo-Malaia (SAKAGAMI, 1982; WILLE, 1983; CAMARGO, 1989; ROUBIK, 1989; MICHENER, 1990; CAMARGO & PEDRO, 1992). Embora certos taxa sejam restritos às zonas subtropicais do hemisfério sul (CAMARGO, 1989;

CAMARGO & PEDRO, 1992), ainda hoje, são poucos os estudos sobre sua biologia, genética, ecologia e evolução, quando comparados com *Drosophila*, *Apis* e *Bombix*.

Os Meliponíneos são distinguíveis das outras abelhas pela redução e fragilidade da venação das asas, atrofia do ferrão e presença de penicílio na tíbia (conjunto de cerdas grossas e longas, localizado na tíbia posterior) (MOURE, 1961; SAKAGAMI, 1982; WILLE, 1983; CAMARGO, 1989; MICHENER, 1990).

MOURE (1961), por meio da morfologia e da origem da rainha, dividiu os Meliponinae em duas tribos: Meliponini e Trigonini. *Melipona* é o único gênero dos Meliponini e é restrito apenas à região neotropical. Os Trigonini por sua vez, são constituídos de 55 gêneros (com 2 gêneros fósseis) e apresentam uma ampla variação na biologia, morfologia e comportamento. Estes encontram-se distribuídos em todas as áreas citadas (CAMARGO & PEDRO, 1992).

1.2. A espécie *Tetragonisca angustula*

A distribuição geográfica do gênero *Tetragonisca* é ampla, abrangendo-se do México à Argentina. Ele apresenta quatro espécies, as quais, *T. angustula* Latreille, *T. buchwaldi* Friese e *T. pfeifferi* Friese são bem conhecidas (MICHENER, 1990).

T. angustula, conhecida popularmente como jataí, jati, jateí, yateí, angelitos, emerim, mirim, abelha ouro, entre outros, é uma das abelhas sem ferrão mais comuns da região Neotropical. Ela apresenta locais de nidificação bem variados, sendo encontrada em florestas virgens, cerrados, moirões de cerca, buracos em parede e até no centro de cidades de grande porte como, por exemplo, o Rio de Janeiro (NOGUEIRA-NETO, 1970; IMPERATRIZ-FONSECA, et al., 1984; MUXFELDT, 1986; NOGUEIRA-NETO, 1997). Além disso, um outro fato que contribui para a sua grande popularidade é a atribuição de propriedades terapêuticas ao seu mel. Ele tem sido usado no tratamento de várias oftalmias e doenças pulmonares (IOIRICH, 1981; IMPERATRIZ-FONSECA et al., 1984).

São conhecidas duas sub-espécies de jataí: *Tetragonisca angustula angustula* Latreille e *T. angustula fiebrigi* Schwarz. A ocorrência de *T. a. fiebrigi* restringe-se ao Sul do Brasil (Santa Catarina, parte do Paraná e Vale do rio Paraná, em São Paulo), Argentina e Paraguai (NOGUEIRA-NETO, 1970), enquanto que nas demais localidades, a forma existente é a *T. a. angustula*.

Os primeiros trabalhos feitos com esta espécie datam do início deste século. Naturalistas estrangeiros, em visita ao Brasil (DUCKE, 1901, 1902, 1906; MULLER 1921 e VON IHERING, 1930 e 1933 *apud* IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 1984) relataram as plantas visitadas por jataí para coleta de néctar e pólen.

Até meados da década de 70, os trabalhos com esta espécie restringiram-se à aspectos de nidificação, flora visitada, estudos taxonômicos, processos de enxameagem, comunicação e distribuição geográfica (MARIANNO FILHO, 1911; SCHWARZ, 1948; NOGUEIRA-NETO, 1954, 1970; LINDAUER & KERR, 1960). O aprisionamento de rainhas virgens e as etapas da formação de uma nova colônia nesta espécie foram observados por KERR *et al.* (1962) em estudo sobre reprodução das abelhas sociais.

Em 1979, IWAMA & MELHEM estudaram a composição do mel de *T. a. angustula* e o seu espectro polínico. Eles verificaram a presença de 55 tipos polínicos para o ano de 1977, na Cidade Universitária (SP). Semelhantemente, IMPERATRIZ-FONSECA *et al.* (1984) coletaram amostras de mel e pólen em colméias de *T. a. angustula*, referente ao ano de 1981, no Campus da USP-São Paulo e concluíram que estas abelhas visitaram 180 espécies vegetais pertencentes a 45 famílias diferentes para coleta de alimento. Isto, sem dúvida, é fator importante no sucesso dessa abelha. IMPERATRIZ-FONSECA & AGUILAR (1984) estudando intensidade de vôo de *T. a. fiebrigi*, observaram que as condições de clima (variação da temperatura, umidade relativa do ar e intensidade luminosa) são muito importantes para que uma determinada espécie de abelha seja utilizada como agente polinizador ou produtor de mel.

A influência da temperatura sobre as atividades de jataí ainda foram avaliadas por PRONI & HEBLING-BERALDO (1985) *apud* GROSSO (1993) que determinaram a tolerância às variações térmicas, isto é, os valores letais

inferiores e superiores para ambas as subespécies de *T. angustula*, nos períodos de inverno e verão. Eles, ainda, confirmaram a existência de mecanismos termorreguladores ativos nos ninhos de jataí, onde, provavelmente, grande parte do calor produzido na área de cria seria resultante do isolamento propiciado por materiais como o invólucro ou batume ou devido ao local habitado.

Estudos referentes à abundância relativa e à utilização de recursos por *T. angustula* foram realizados por KNOLL & IMPERATRIZ-FONSECA (1987). Elas avaliaram suas preferências florais e concluíram que a espécie pode ser considerada generalista em relação à escolha de locais para nidificação e utilização de recursos alimentares.

Poucas espécies de Meliponíneos apresentam um comportamento de defesa eficiente, pelas operárias. A jataí é uma delas: cerca de 10 a 20 operárias ficam voando "paradas" de 20-50 cm da entrada da colméia. WITTMANN (1985) as considera como kamikazes, prontas a se sacrificarem contra a grande inimiga *Lestrimelitta límao*. ZEIL & WITTMANN (1989), KELBER & ZEIL (1990) e ZEIL & WITTMANN (1993) também ressaltaram a importância da referência de posicionamento de vôo das abelhas guarda, bem como a localização da entrada do seus ninhos.

FOWLER (1979) fez um levantamento dos ninhos de *T. a. fiebrigi* em habitat natural, na região central do Paraguai. Ele observou que o sítio de nidificação foi predominante nas raízes das árvores, sendo utilizadas pelo menos, 28 espécies diferentes. A dispersão das colônias foi ao acaso e ocorreu numa densidade de 3,7 colônias/hectare. ROUBIK (1983), em um estudo de populações, alimento estocado e arquitetura do ninho de 351 colônias (cerca de 40 espécies) de meliponíneos nas florestas do Panamá, observou que 18 colônias eram de *T. angustula*.

BALESTIERE, em 1989, verificou a proximidade das colônias de *T.a. angustula* e *Nannotrigona t. testaceicornis* a áreas agrícolas e avaliou a toxicidade de inseticidas organofosforados, carbamatos, organoclorados e piretróides por aplicação tópica, em operárias adultas. Todos os nove inseticidas, testados por ele, foram considerados altamente tóxicos para estas espécies.

Um trabalho, hoje clássico, de CAMARGO & POSEY (1990) coloca *T. angustula* entre as abelhas sem ferrão mais conhecidas pelos índios Kayapó. Eles dispõem de muitas informações sobre nicho, estrutura de ninhos, ciclo de vida, alimentação, morfologia, comportamento e ecologia desta espécie. Além disto, a mitologia associada às abelhas, ao mel e a seus outros produtos apresenta grande importância social entre os índios da tribo.

FERREIRA (1993) analisou a estratégia reprodutiva de *T. a. angustula* e GROSSO (1993) os aspectos bionômicos, envolvendo arquitetura de ninho, divisão de trabalho e processo de provisionamento e oviposição.

1.3. Dos Marcadores Bioquímicos em Meliponíneos

Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos de fácil identificação visual.

HUBBY & LEWONTIN (1966) e LEWONTIN & HUBBY (1966), em estudos com *Drosophila* e HARRIS (1966) com humanos, impulsionaram o estudo de variação genética por polimorfismos protéicos em populações naturais. Eles observaram que a variação alélica em genes estruturais poderia ser detectada por eletroforese e que esta se comportava de maneira mendeliana. Assim, os fenótipos observados poderiam ser equacionados a genótipos homocigóticos e heterocigóticos.

O princípio básico da técnica de isoenzimas reside no uso de eletroforese em gel de amido (SMITHIES, 1955) e na visualização do produto enzimático por métodos histoquímicos (HUNTER & MARKERT, 1957). Assim, enzimas com múltiplas formas moleculares apresentam diferenças na mobilidade em um campo elétrico. Essas diferenças de migração são resultantes de diferenças ao nível de seqüências de DNA que codificam tais enzimas.

Esta técnica é, relativamente, rápida e barata. O controle genético é conhecido para a maioria das isoenzimas e os genótipos heterocigotos e

homozigotos de um determinado *locus* são, facilmente, identificados nos padrões de bandas observadas no gel, ou seja, os alelos isoenzimáticos são co-dominantes.

Embora as isoenzimas sejam consideradas marcadores seletivamente neutros, o nível de polimorfismo enzimático possui um certo limite, uma vez que estas enzimas possuem funções metabólicas importantes. Outros fatores restringem o seu uso: o número total de *loci* que podem ser detectados no genoma é baixo; modificações pós-traducionais das enzimas, produzindo as chamadas "isoenzimas conformacionais", as quais diferem em estruturas secundárias e terciárias. Também, podem ocorrer diferenças na atividade isoenzimática associadas a estágios diferentes de desenvolvimento (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

O primeiro artigo publicado sobre variabilidade alozímica em meliponídeos foi o de CONTEL & MESTRINER (1974). Eles descreveram o primeiro polimorfismo dos Meliponíneos no *locus Est 3* de *Melipona subnitida* e *M. quadrifasciata*. A partir de então, uma grande quantidade de informações sobre polimorfismos de populações têm sido descrita para o grupo. CONTEL & MESTRINER (1975) e RESENDE (1997) caracterizaram a atividade esterásica durante o desenvolvimento ontogenético de três espécies de *Melipona*. CONTEL & KERR (1976) e MACHADO *et al.* (1984) estudaram a origem dos machos produzidos por rainhas e operárias em *M. subnitida* e *Plebeia droryana*, respectivamente. WAGNER & BRISCOE (1983), DEL LAMA & MESTRINER (1984), FALCÃO (1984), LIMA & MESTRINER (1985), MACHADO & CONTEL (1989; 1991a,b), FALCÃO & CONTEL (1990; 1991a,b), YONG (1991), CURSINO & CONTEL (1991), MACHADO *et al.* (1992), CURSINO (1993), SANTOS (1993), entre outros, analisaram os padrões protéicos de diferentes espécies para vários sistemas enzimáticos.

CASTANHEIRA (1995) analisou populações de *Tetragonisca angustula* e *Plebeia droryana* para glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPDH), isocitrato desidrogenase (IDH), malato desidrogenase (MDH), enzima málica (ME), hexoquinase (HK) e fosfoglicomutase (PGM) e descreveu um polimorfismo para o

locus da hexoquinase, cujo alelo *Hk*⁸⁸ parece indicar um marcador da subespécie *T. a. fiebrigi*. Indicou 5 variantes raras da enzima GPDH e descreveu dois polimorfismos (MDH e PGM) para *P. droryana*.

1.4. Dos Marcadores Moleculares

Depois do grande avanço proporcionado pelo estudo das isoenzimas, a partir da década de 70, foi descoberto um grupo de enzimas (endonucleases) que eram capazes de cortar a molécula de DNA em grande número de sítios específicos (SOLLER, 1990). O DNA digerido e seus fragmentos, separados em gel de agarose, podem ser hibridados com uma sonda (geralmente um oligonucleotídeo marcado com P³²) e então expostas a um filme de raio X. Esta técnica que utiliza os polimorfismos por tamanhos de restrição (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism) produzidos por endonucleases e o aparato de hibridação de SOUTHERN (1975) foram propostos há cerca de 20 anos, pela primeira vez, para estudos de detecção de mutação em DNA de vírus (GRODZICKER *et al.*, 1974). Assim como as isoenzimas, marcadores RFLP possuem expressão co-dominante, sendo possível identificar os genótipos homozigotos e heterozigotos.

Embora, em pouco tempo, os marcadores RFLP tenham se tornado uma ferramenta útil em estudos de evolução, sistemática, melhoramento animal e vegetal, as limitações financeiras e de tempo têm sido as principais restrições ao seu uso.

Um avanço extraordinário ocorreu quando KARY MULLIS, na década de 80, concebeu a tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR-Polymerase Chain Reaction). Isto lhe valeu o Prêmio Nobel de Química em 1993.

A PCR é um método *in vitro* de produção de grandes quantidades de fragmentos de DNA a partir de pequenas quantidades, por uma polimerase termo-estável (Taq DNA polimerase). Na amplificação enzimática pela polimerase, um fragmento é flanqueado por dois oligonucleotídeos que hibridizam

Biblioteca
Biblioteca Federal de Curitiba

com as cadeias opostas da sequência alvo. Ciclos repetidos de desnaturação do DNA molde, anelamento dos "primers" e extensão destes pela Taq DNA polimerase, resultam em amplificação dos segmentos definidos pelo término 5' dos "primers". O produto de extensão de cada "primer" serve como molde para outro "primer" no ciclo seguinte. Assim, em cada ciclo, dobram-se as quantidades do fragmento produzido (WHITE *et al.*, 1989).

SAIKI *et al.* (1985) fizeram a primeira amplificação enzimática de uma sequência específica para diagnóstico da anemia falciforme em humanos. A polimerase usada era a DNA polimerase I de *E. coli*, sendo esta adicionada a cada ciclo da desnaturação. O isolamento de uma polimerase de uma eubactéria termofílica (*Thermus aquaticus*) por SAIKI *et al.* (1988) *apud* BORGES (1997) resolveu o problema da reposição de polimerase a cada ciclo. Eles contribuíram em muito para o estudo de cinética enzimática, mostrando que o tempo de extensão, quantidade de Taq e temperatura de anelamento influenciam na especificidade da enzima.

Com o desenvolvimento da tecnologia da reação em cadeia da polimerase, inúmeras outras técnicas (AFLP, RNA display, VNTR e outras) foram desenvolvidas para a detecção de polimorfismos de DNA. Uma dessas técnicas, que tem sido muito usada em estudos de populações, foi desenvolvida independentemente por WILLIAMS *et al.* e WELSH & MACCLELLAND (1990). A técnica foi denominada de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA) e AP - PCR (Arbitrary Primed-Polymerase Chain Reaction), respectivamente. Independentemente do nome utilizado e das pequenas variações na metodologia, a técnica de PCR utilizando "primers" de sequência arbitrária (cerca de 10 pares de bases), é utilizada sob condições de baixa estrigência. O "primer" encontra várias sequências de DNA complementares; quando tais sequências estão a menos de 4000 pares de bases e em orientação oposta, a região do DNA inclusa pode ser amplificada pela polimerase.

✕ O comportamento dos marcadores RAPD é de caráter dominante. Os polimorfismos são detectados como presença (homozigoto dominante e

heterozigoto) ou ausência de bandas (homozigoto recessivo). A ausência de banda representa o conjunto de todos os alelos de um determinado *locus* que não pode ser amplificado devido a inserções, deleções ou mutações de ponto no sítio de anelamento dos "primers". Assim, a técnica RAPD detecta apenas um alelo em cada *locus*. Embora a grande maioria dos marcadores RAPD possua um comportamento dominante, existe a possibilidade de se amplificar ambos os alelos de um *locus* (indivíduo diplóide), utilizando o mesmo "primer". Codominância de marcadores RAPD resulta de pequenas inserções ou deleções de DNA entre os sítios de iniciação dos "primers", sendo que sua detecção só pode ser feita por análise de segregação de marcadores (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). Esse caráter co-dominante foi obtido pela primeira vez por HUNT & PAGE (1992a) em estudo de segregação de marcadores RAPD em *Apis mellifera*.

A facilidade de detectar marcadores RAPD (não necessitam de informações prévias sobre a sequência de DNA a ser amplificada), a pequena quantidade de DNA requerida e a automatização do processo (muito eficiente em termos de baixos custos e tempo requerido) (THORMANN & OSBORN, 1992; SCHIERWATER, 1995) fazem com que esta técnica seja muito usada em análise de fluxo gênico, identificação de cultivares e espécies, mapeamento e outros. Entretanto, esta técnica apresenta algumas limitações. A natureza dominante dos marcadores não permite a distinção de um *locus* em estado heterozigoto, exceto, por análise de segregação dos marcadores, em progênies. A falta de reprodutibilidade entre as reações é outra, senão, a maior limitação.

A falta de reprodutibilidade têm levado pesquisadores de diversos laboratórios a estabelecerem suas condições ótimas de trabalho. SCHIERWATER & ENDER (1993) comparou o padrão de amplificação de 13 DNA polimerases comerciais. Eles observaram que todas as polimerases derivadas de *T. aquaticus* produzem amplificações similares (mas não idênticas), enquanto que todas as polimerases de outras fontes (exceto *Thermus flavus*) amplificaram muito pouco ou nenhum produto.

A amplificação de DNA em PCR de um modo geral, é significativamente, afetada pela temperatura, concentração de $MgCl_2$, sequência dos "primers" e DNA molde. MURALIDHARAN & WAKELAND (1993) compararam duas concentrações de "primer" e DNA molde. Algumas bandas detectadas em baixa concentração (15 ng de primer e 25 ng de DNA) estão ausentes em produtos de alta concentração (45 ng primer e 100 ng de DNA) sendo que nesta, novas bandas aparecem. WEEDEN *et al.* (1992) também observaram a pureza e o efeito da concentração do DNA em manterem o padrão de produtos RAPD (3 a 30 ng por 25 μ l de reação) e de $MgCl_2$, (entre 2 a 5 mM).

ROUX (1995) descreveu alguns agentes inibidores, incluindo detergentes iônicos (SDS, sarcosil, usados na extração de DNA), fenol, heparina, xileno cianol, azul de bromofenol e proteinase K que podem interferir na reação de PCR, não necessariamente nas amplificações RAPD. Ele recomenda inativar a proteinase K a 95° por 5 min. para evitar a digestão da Taq polimerase como, também, manipular a concentração de $MgCl_2$, desde 0,5 mM até 5 mM em intervalos de 0,5 mM.

Variações nos padrões RAPD são observados entre termocicladores e entre polimerases diferentes. MEUNIER & GRIMONT (1993) testaram dois termocicladores e 2 marcas diferentes de Taq polimerase com diferentes amostras de DNA, por 6 vezes. Eles observaram que a reprodutibilidade foi excelente quando usados o mesmo termociclador e Taq polimerase. O mesmo não aconteceu, quando o aparelho e a Taq eram diferentes. Um outro fator crítico nas reações, usando-se termocicladores diferentes (ciclo rápido e tradicional com aquecimento de placa), é o aparecimento de fragmentos múltiplos (WITTWER & GARLING, 1991), que surgem em maior frequência, devido ao aumento no tempo de salto (tempo gasto para se atingir a temperatura de anelamento a partir da temperatura de desnaturação).

O tamanho dos fragmentos amplificados também poderá variar em função do tamanho dos oligonucleotídeos com sequências arbitrárias usados; 20 pb para AP-PCR (arbitrarily primed PCR) (WELSH & MCCLELLAND, 1990), 10 a 12 pb para RAPD (random amplified polymorphic DNA) (WILLIAMS *et al.* 1990) e 5 pb

para DAF (DNA amplification fingerprinting) (CAETANO-ANOLLÉS *et al.*, 1991). A variação fica em torno de 500 pb para AP-PCR e DAF e de 300 a 4.000 pb para RAPD.

Uma vez que todos esse fatores forem controlados, diagnósticos com marcadores RAPD, identificados em diferentes laboratórios, poderão ser permutáveis e condizentes (SCHIERWATER & ENDER, 1993). Além do mais, de uma maneira geral, nenhuma técnica molecular é superior a outra, pois a eficiência nos resultados irá depender da adequação da técnica usada para responder a questão proposta (SCHIERWATER, 1995).

1.5. RAPD em Populações de Insetos

A reconstrução da história filogenética em populações de insetos por marcadores RAPD tem recebido grande atenção em virtude das facilidades da técnica. CARTER *et al.* (1996) estimaram a divergência genética por análise de "cluster" e isoenzimas em populações do besouro *Tomicus piniperda*, nos Estados Unidos. A população de Illinois foi a mais divergente a um limite de 0,895 e a média das distâncias das outras populações foi de 0,595. A comparação entre as médias das distâncias genéticas e geográficas sugeriu estabelecimentos separados para *T. piniperda*, em Illinois, (próximo ao lago Michigan) e em Ohio, (próximo ao lago Erie). Os marcadores RAPD indicaram que a população atual é derivada de 2 grupos fundadores que, gradualmente, se inter cruzaram na região Oeste de Indiana.

Ao contrário dos dados obtidos para 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 cálculos da heterozigosidade, divergência de nucleotídeos e distância genética.

TABERNER *et al.* (1997) caracterizaram a população de um coleóptero que ataca plantações de beterraba destinadas à produção de açúcar, no Sul da Espanha. A distância genética entre as populações foi estimada por 8 "primers" e foi possível verificar que houve um único evento de colonização, bem como inferir a evolução desta peste, nas plantações vizinhas.

Muito pouco em marcadores RAPD foi feito, até o momento, para os apídeos. O primeiro trabalho em *Apis mellifera* foi feito por HUNT & PAGE (1992a), em que foi demonstrado, pela primeira vez, que marcadores RAPD não são herdados somente de maneira dominante. Por meio de segregação dos marcadores RAPD em rainhas (2n) e zangões (n) obtidos por inseminação instrumental, foram encontrados 4 tipos de polimorfismos em zangões e rainhas virgens F1. Os polimorfismos para presença/ausência e intensidade de banda foram herdadas de maneira dominante. Os polimorfismos por tamanho de fragmento que segregaram na proporção de 1:1 na progênie de zangões, seriam marcadores alélicos para zangões ou estariam compactamente ligados em trans. O último tipo de polimorfismo foi observado como uma banda específica de zangões 2n, obtidos por retrocruzamento. Observou-se que, quando os produtos amplificados de PCR de dois zangões haplóides diferentes eram misturados, uma banda específica de zangões 2n se restabelecia, sendo portanto alelos diferentes do mesmo *locus*, presentes em heterozigidade na rainha.

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 sequenciado. "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 a ocorrência de alelos para tamanho de fragmento). Quatro zangões diplóides da progênie foram homozigotos para esses marcadores e somente 3 de 181 operárias 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 cruzamentos artificiais 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 que, pelo tamanho do mapa, existe uma alta taxa de recombinação nesta espécie.

Uma outra linha de pesquisa foi adotada por HUNT *et al.* (1995) associando marcadores RAPD ao comportamento de forrageamento em operárias de *A. mellifera*. Eles identificaram dois *loci*, por segregação, que afetam a quantidade de pólen estocado em colônias, distinguindo abelhas forrageadoras de pólen ou néctar.

Considerando que não existem trabalhos sobre a variabilidade por marcadores RAPD em nenhuma espécie de Meliponíneo, até o momento, este trabalho foi realizado com o seguinte objetivo: determinar a distância genética entre as populações *T. angustula* e *T. buchwaldi* (jataí do acre), provenientes de 26 localidades, utilizando a técnica de DNA amplificado ao acaso (RAPD). Para isto, serão identificados "primers" polimórficos no grupo, utilizando *A. mellifera* para comparação "outgroup".

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi desenvolvido nos Laboratórios de Genética e Genética Molecular, ambos do Departamento de Genética e Bioquímica (DEGEB) da Universidade Federal de Uberlândia.

2.1. Material Biológico

Foram avaliadas 26 amostras de *Tetragonisca angustula* Latreille 1911 (jataí) e duas amostras de *T. buchwaldi* Friese (jataí do Acre). Uma amostra de *Apis mellifera* L. (abelha africanizada) foi usada como "outgroup". LI & GRAUR (1991) definem "outgroup" como uma espécie ancestral ou ainda como espécie menos relacionada às outras analisadas. As amostras, cedidas por pesquisadores e meliponicultores dos locais de origem (Figura 1), constituíram-se de operárias campeiras coletadas com puçás, na entrada de suas respectivas colméias. As amostras foram colocadas em frascos limpos, com álcool absoluto e assim mantidas até chegarem ao laboratório. POST *et al.* (1993) em um estudo de métodos de preservação de insetos para estudo de DNA, afirmaram que os melhores métodos de preservação são o nitrogênio líquido, etanol estocado a 4°C ou dessecação imediata em sílica gel. Considerando a facilidade de se encontrar álcool em qualquer local, este foi o método adotado.

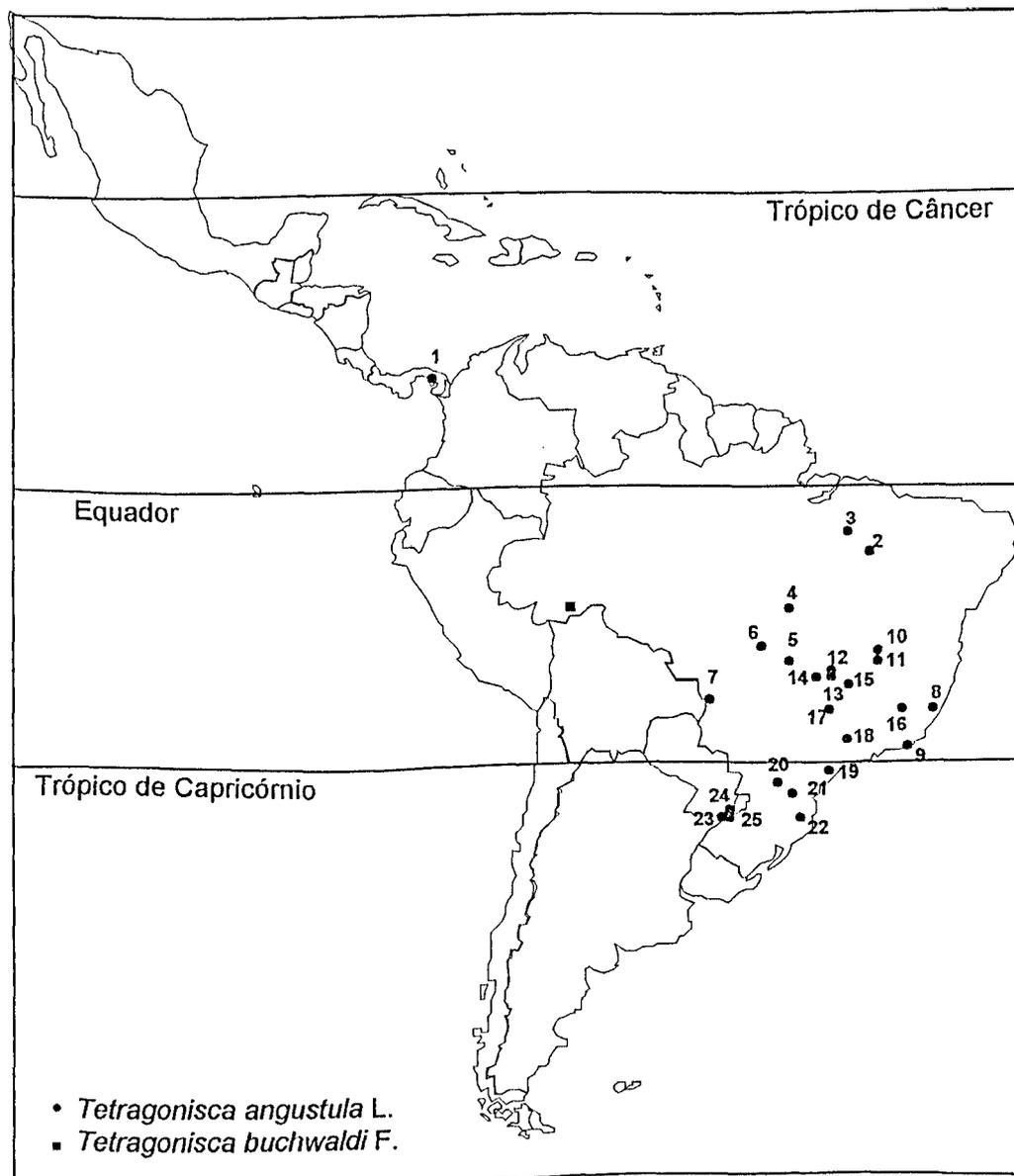


Figura 1: Localização geográfica das amostras de *T. angustula* e *T. buchwaldi*. (1) - Panamá, (2) - Mirador, (3) - Barra do Corda, (4) - Porangatu, (5) - Rio Verde, (6) - Campinápolis, (7) - Ladário, (8) - Domingos Martins, (9) - Maricá, (10) - São Francisco, (11) - Bocaiúva, (12) - Grupiara, (13) - Uberlândia 1 e 2, (14) - Campina Verde, (15) - Araxá, (16) - Canaã, (17) - Ribeirão Preto, (18) - Pedreira, (19) - Pilar do Sul, (20) - Prudentópolis, (21) - Curitiba, (22) - Blumenau, (23) - Posadas, (24) - Aristóbulo del Valle, (25) - Cerro Azul.

No laboratório, um indivíduo de cada uma das amostras, foi reidratado em tampão (TrisCl 10mM, pH 8; NaCl 100mM e MgCl₂ 1mM) e enviado para identificação. As amostras foram identificadas pelo Prof. Dr. João M. Franco de Camargo (USP - Ribeirão Preto) e encontram-se depositadas no Laboratório de Genética da Universidade Federal de Uberlândia.

Muitas amostras foram identificadas a nível de subespécie, devido à coloração do mesepisterno (estrutura torácica em baixo das asas, que distingue as duas subespécies) (CASTANHEIRA, 1995). As subespécies das demais amostras não foram determinadas, pois a estocagem em álcool alterou a coloração destas.

As amostras foram mantidas em freezer a -80°C até a extração do DNA.

Tabela 1. Identificação e origem das 29 amostras avaliadas neste estudo.

Espécie	Origem
1. <i>Apis mellifera</i> L.	Uberlândia – MG
2. <i>Tetragonisca buchwaldi</i> (Friese) ¹	Rio Branco – AC
3. <i>T. buchwaldi</i> ²	Rio Branco – AC
4. <i>Tetragonisca angustula</i> (Latreille)	Panamá – América Central ³
5. <i>T. angustula</i>	Mirador – MA
6. <i>T. angustula fiebrigi</i> (Schwarz)	Barra do Corda – MA
7. <i>T. a. fiebrigi</i>	Porangatu – GO
8. <i>T. angustula</i>	Rio Verde – GO
9. <i>T. a. fiebrigi</i>	Campinápolis – MT
10. <i>T. angustula</i>	Ladário – MS
11. <i>T. angustula</i>	Domingos Martins – ES
12. <i>T. angustula</i>	Maricá – RJ
13. <i>T. angustula</i>	Bocaiúva – MG
14. <i>T. angustula</i>	São Francisco – MG
15. <i>T. angustula</i>	Uberlândia – MG ⁴
16. <i>T. angustula</i>	Grupiara – MG
17. <i>T. angustula</i>	Araxá – MG
18. <i>T. angustula</i>	Campina Verde – MG
19. <i>T. angustula</i>	Canaã – MG
20. <i>T. angustula</i>	Ribeirão Preto – SP
21. <i>T. angustula</i>	Pedreira – SP
22. <i>T. angustula</i>	Pilar do Sul – SP
23. <i>T. angustula</i>	Curitiba – PR
24. <i>T. a. fiebrigi</i>	Prudentópolis – PR
25. <i>T. angustula</i>	Blumenau – SC
26. <i>T. angustula</i>	Posadas – Misiones, Argentina
27. <i>T. angustula</i>	Aristóbulo del Valle, - Mis., Argentina
28. <i>T. angustula</i>	Cerro Azul – Mis., Argentina

1 e 2: As duas amostras de *T. buchwaldi* (jataí do Acre) de Rio Branco pertencem a colméias diferentes.

3: Para esta amostra não foi fornecido o local (município) de origem, somente o país e data de coleta. Por convenção, atribuiu-se o seu local de origem como sendo a capital do Panamá – Panamá.

4: Utilizou-se duas abelhas deste local, provenientes de mesma colméia.

2.2. Extração de DNA

Inicialmente, um indivíduo de cada amostra foi lavado em tampão (TrisCl 0,01M, pH 8; NaCl 0,1M e MgCl₂ 0,001M) em três banhos sucessivos de 15 minutos. Em seguida, foram secos em papel de filtro e tiveram seus abdômens removidos com uma lâmina de bisturi estéril, para evitar possível contaminação com bactérias simbióticas (CAMPOS, 1997).

O protocolo utilizado para extração foi o de SHUSTER *et al.* (1992), com modificações na adição de RNase, fenol e clorofórmio. Cada abelha foi macerada individualmente em nitrogênio líquido e transferida para um microtubo (estéril) de 2 ml juntamente com 1,2 ml de tampão fosfato de sódio (Na₂HPO₄ 0,01M, pH 7,8). A solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 1 min e, então, o sobrenadante foi descartado. Ressuspendeu-se o "pellet" em 1,2 ml de tampão PBS pH 7,4 (NaCl 0,137M; KCl 0,0026M; Na₂HPO₄ 0,01M e KH₂PO₄ 0,0017M), adicionou-se 10 µl (10 mg/ml) de proteinase K e incubou-se a solução a 50°C por 45 min. Em seguida, à suspensão foi adicionada 15 µl de RNase (10mg/ml) e, novamente, incubada a 37°C por 1:30 h. Após a incubação, os volumes dos microtubos foram completados com fenol por 2 vezes, agitados por 2 min e centrifugados a 5.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi então submetido a um processo de desproteinização pela adição de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1) por duas vezes, agitado por 2 min e, então, centrifugado a 5.000 rpm por 2 min. O sobrenadante coletado foi transferido para um outro microtubo e os ácidos nucléicos, precipitados com 1/10 do volume de NaCl 2M, 2 volumes de etanol absoluto PA e 2h a -20°C. Após a centrifugação (13.000 rpm por 15 min) os ácidos nucléicos foram lavados com 500 µl de etanol 70%, secos à vácuo e ressuspendidos em 70 µl de H₂O duplamente destilada.

2.3. Quantificação e Qualificação do DNA

O DNA foi quantificado por absorvância a 260 nm em espectrofotômetro Hitachi U-2000. Uma alíquota de 10 µl de cada amostra foi diluída 100 vezes em água ultrapura, para a leitura. A seguir, suas concentrações foram calculadas pela fórmula:

$$[\text{DNA}] = \text{ABS}(260) \times 50 \times \text{Fator de Diluição},$$

e diluídas para uma concentração final de 5 ng/µl.

A qualidade do DNA foi avaliada submetendo-se 10 µl do DNA (antes da diluição) a eletroforese em agarose 0,8% (SAMBROOK *et al.*, 1989) para verificar se o DNA não estava fragmentado ou apresentava contaminantes. Não quantificou-se proteína por espectrofotometria devido a baixa quantidade de amostra disponível.

2.4. DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD)

Foram testados 31 "primers", e 18 "primers" informativos foram utilizados na análise. Foram selecionados 11 "primers" curtos de 10 pb (sequências arbitrárias) da OPERON Technology e 7 "primers" longos (Tabela 2). Cada reação de amplificação continha Tris-Cl 10 mM, KCl 50mM, MgCl₂ 2mM, dNTPs 100 µM de cada (dCTP, dATP, dGTP, dTTP), 10 pmoles de "primer", 1,5U de Taq DNA polimerase, 10 ng de DNA genômico e volume final completado com água ultrapura para 25µl. Cada reação foi coberta com uma gota (~20µl) de óleo mineral para evitar a evaporação e centrifugada a 4000 rpm por 10 segundos.

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

As reações foram amplificadas em termociclador MJ Research, Inc., modelo PTC-100, por 3 ciclos de 94°C/1 min, 35°C/1 min e 72°C/2 min; 34 ciclos

de 94°C/10 s, 40°C/20 s, 72°C/2 min e 1 ciclo de 72°C/5 min, conforme descrito por YOUNG & KELLY (1996) e citado por BELELE (1997).

Foi feita uma repetição de amplificação para cada "primer", para confirmar os padrões de bandas obtidos.

Tabela 2. "Primers" utilizados e suas respectivas sequências de nucleotídeos.

"Primer"		Sequência (5' → 3')
L O N G O S	GOU 07	AACGCGGCACACATAGTTTT
	GOU 10	CTCGAACCTTCCCATTCAA
	MAU 101	CCAATTCAGTATGTGCTGAGT
	MAU B1	GTTCCCTGTGTGTGTGCAATGGTG
	MAU B2	GCCAGGCAGCAAGTTCTCAGTAAT
	MAU 402	AATGTCACACTTGAATCGCATC
	MAU 801	TGGTAGAGCAATATGAAGGCC
C U R T O S	OPA-03	AGTCAGCCAC
	OPA-09	GGGTAACGCC
	OPA-10	GTGATCGCAG
	OPA-13	CAGCACCCAC
	OPF-13	GGCTGCAGAA
	OPL-04	GACTGCACAC
	OPL-11	ACGATGAGCC
	OPL-13	ACCGCCTGCT
	OPO-06	CCACGGGAAG
	OPV-07	GAAGCCAGCC
	OPV-10	GGACCTGCTG

2.5. Separação e Visualização dos Produtos Amplificados

Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1%, dimensões de 20 cm x 24.5 cm x 6 mm e tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 0,5X, conforme SAMBROOK *et al.* (1989). O corante brometo de etídio estava diluído no gel a uma concentração de 0,5 µg/ml de gel.

A cada 15 µl de amostra foi adicionada um tampão de carregamento (azul de bromofenol 3,61M, xileno cianol 4,64M, sacarose 1,17M e EDTA 0,1M pH8) na proporção de 5:1, respectivamente. A eletroforese foi conduzida a 0,23 V/ml por 2 horas. Os géis foram visualizados em transiluminador UV e fotografados em VDS Image System - Pharmacia, usando filtro laranja, tempo de exposição variando

entre 2,17 a 2,83 segundos, contraste de 0 e 6, e 0,45 de fator de correção da câmera.

2.6. Análise dos Dados

Foi montada uma matriz binária de acordo com presença (1) e ausência (0) de bandas reproduzíveis e mais intensas.

A matriz gerada pelo programa STATISTICA 4.5A (1993) foi usada para o cálculo das distâncias genéticas e análise de "cluster". As distâncias genéticas foram calculadas pelo método de Porcentagem de Desacordo, que é dado pela fórmula:

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

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 "clusters" foi feita pelo método não-ponderado de agrupamento aos pares, utilizando médias aritméticas (UPGMA-"Unweighted pair-group method using arithmetic averages"), o qual agrupa, inicialmente, indivíduos mais similares e assim, sucessivamente, até os indivíduos ou grupos mais distantes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar a descrição dos resultados obtidos, os genótipos da população de *Tetragonisca angustula* serão discriminados pelo local de origem.

Inicialmente, testou-se 31 "primers" em três genótipos (*T. buchwaldi* 1 e *T. angustula* de Domingos Martins e Canaã). Destes, dezoito (Tabela 2) geraram um padrão de bandas adequado para a análise da diversidade genética entre os genótipos.

Os outros 13 "primers" (OPA 01, 02; OPL 15; OPI 10, 11, 14, 17; OPV 06; 14, 15, 17, curtos) e dois longos, (GOU 03 e GOU 08) não foram utilizados por estarem com padrão de bandas muito compactado. Isto, provavelmente, ocorreu devido à malha do gel (agarose 1%) usada, que não permitiu a separação de bandas de tamanhos muito próximos. Um outro fator que contribuiu para a não utilização destes "primers" foi o fato de não apresentarem um bom (ou nenhum) padrão de amplificação para as condições estabelecidas na reação e no termociclador. LOWE *et al.* (1990), WANG *et al.* (1994) e ROUX (1995) discutiram esses problemas e observaram que a solução seria a otimização das condições de cada reação (concentração de DNA, MgCl₂, dNTPs, "primer") e, ainda, a alteração da temperatura de anelamento para cada "primer" testado.

Com exceção de Uberlândia, de onde foram usados dois indivíduos, apenas um indivíduo foi amostrado para cada um dos demais locais. Utilizou-se duas amostras de Uberlândia, com o objetivo de correlacionar o efeito das distâncias geográficas com as distâncias genéticas. A opção por utilizar apenas uma amostra foi por considerar o padrão de um único indivíduo, representativo do local, embora estudos sobre a variabilidade dentro de cada ponto de coleta não

tenham sido realizados. AYALA (1983) observou que os métodos de análise de variabilidade devem considerar que as amostras individuais não são mais ou menos, mas sim, representantes genéticos da população em questão. Um outro fator que levou ao uso de apenas uma amostra por localidade foi o de permitir que todas as amplificações de um único "primer" fossem corridas em único gel, minimizando, assim, o erro de contagem de bandas produzidas por artefato de migração. Esta observação foi feita por CHALMERS, *et al.* (1992) e DAWSON, *et al.* (1993).

Somente as bandas intensas e bem definidas nos dois testes foram consideradas na análise para a montagem da matriz das distâncias, para evitar erros advindos da contagem incorreta de produtos amplificados fracamente.

As reações de amplificação de DNA, por meio de 11 "primers" curtos entre os 29 genótipos, resultaram em 141 bandas amplificadas, com tamanho variando entre 300 e 2600 pb. Foram observadas, para jataí, 82 bandas, das quais 45 (54,8%) eram polimórficas (Tabela 3).

Tabela 3: Relação do número total de bandas amplificadas, polimórficas e tamanho estimado das bandas por "primer" curto para a população de *T. angustula*.

Primer	Bandas		
	Totais	Polimórficas	Tamanho (pb)
OPA-03	05	00	450 – 2100
OPA-09	08	03	320 – 1200
OPA-10	13	07	370 – 1700
OPA-13	06	03	700 – 2100
OPF13	08	05	550 – 2000
OPL-04	06	04	480 – 1500
OPL-11	10	04	400 – 2000
OPL-13	06	04	400 – 2000
OPO-06	05	04	700 – 1500
OPV-07	04	02	550 – 700
OPV-10	11	09	600 – 1400
Total	82	45 (54,8%)	

A análise de "cluster" para "primers" curtos (Figura 2) permitiu a separação de *T. angustula* em dois grupos distintos com uma distância genética limite de 0.130. O primeiro grupo com 12 genótipos, inclui o Panamá, Mirador, Barra do Corda, Domingos Martins, Araxá, Bocaiúva, Canaã, São Francisco, Curitiba, Blumenau, Maricá e Pedreira, enquanto que o segundo (Porangatu, Rio Verde, Grupiara, Campina Verde, Uberlândia 1 e 2, Campinópolis, Ladário, Ribeirão Preto, Pilar do Sul, Prudentópolis, Posadas, Aristóbulo del Valle e Cerro Azul) apresenta as amostras localizadas a sudoeste da região de coleta.

No "cluster" 1 de *T. angustula* o genótipo mais distante foi o do Panamá (0.106), apresentando-se como grupo irmão de todos os outros genótipos. O "cluster" 2, também foi separado em dois grupos, a nível de 0.080, um grupo reuniu as localidades da Argentina (Posadas, Aristóbulo del Valle e Cerro Azul) e o outro, os dos demais genótipos. A menor distância entre os genótipos do "cluster" 2 foi apresentada entre Pilar do Sul e Prudentópolis (0.008).

As dissimilaridades genéticas entre as populações de *T. angustula* e *A. mellifera* e *T. buchwaldi* foram de 0.510 e 0.519, respectivamente.

As amplificações com "primers" longos para as três espécies geraram 77 bandas, das quais 24 (58.5%) foram polimórficas para *T. angustula* (Tabela 4).

Tabela 4: Relação do número total de bandas amplificadas, polimórficas e tamanho estimado das bandas por "primer" longo para a população de *T. angustula*.

Primer	Bandas		
	Totais	Polimórficas	Tamanho (pb)
GOU-07	07	06	600 - 1400
GOU-10	02	01	600 - 1200
MAU-101	06	04	370 - 1800
MAU-B1	02	00	600 - 900
MAU-B2	12	06	370 - 2000
MAU-402	05	01	800 - 1900
MAU-801	07	06	400 - 800
Total	41	24 (58.5%)	

Genótipos

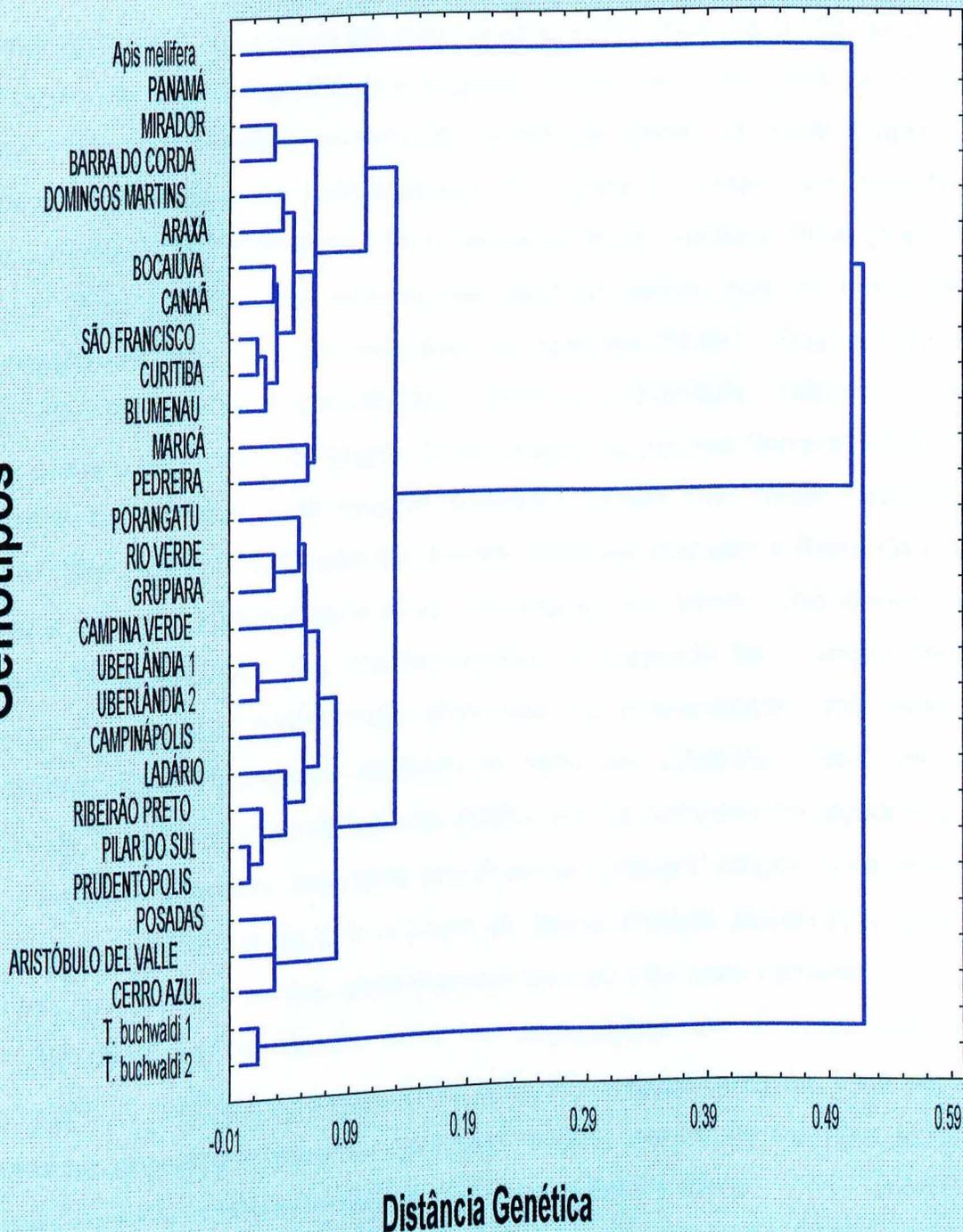


Figura 2: Dendrograma representativo da distância genética por Porcentagem de Desacordo e agrupamento pelo método de UPGMA entre os 29 genótipos (26 de *T. angustula*, 2 de *T. buchwaldi* e 1 de *A. mellifera*) por meio de 141 marcadores RAPD obtidos por "primers" curtos. Os genótipos de *T. angustula* foram discriminados pelo local de origem.

A análise de "cluster" para os "primers" longos (Figura 3) também permitiu a separação de *T. angustula* em dois grupos a um limite de 0.153. O grupo 1 apresentou-se com 12 genótipos e o grupo 2 com 14. Como para os "primers" curtos, foram encontrados os mesmos genótipos dentro de cada grupo. Uma mudança significativa no dendrograma de "primers" longos em relação ao dendrograma de "primers" curtos foi a colocação de *A. mellifera* como grupo mais externo. Esta posição mais externa que está de acordo com os trabalhos de parentesco baseado na morfologia para os apídeos (KERR, 1969; SAKAGAMI, 1982; RUTTNER, 1987; MICHENER, 1990 e CAMERON, 1993) foi melhor evidenciada pelos "primers" longos. Deste modo, os primers "longos" foram mais eficientes na distinção dos grupos distantes, porém não foram capazes de mostrar diferenças entre os genótipos mais próximos (Mirador e Barra do Corda; Pedreira, Curitiba e Blumenau e ainda Porangatu, Rio Verde, Uberlândia 1 e 2, Ribeirão Preto, Pilar do Sul, Prudentópolis). O contrário foi o obtido com os "primers" curtos, que foram mais eficientes na diferenciação dos genótipos intragrupos. Esta observação também foi feita por CABRAL (1997) em uma análise de diversidade por marcadores RAPD, em 24 cultivares de algodoeiro.

O grupo Argentino, analisado somente por "primers" longos, apresentou-se com maior variabilidade do que o grupo do Brasil Central, observação que não ocorreu para "primers" curtos, onde o grupo brasileiro foi mais variável.

As distâncias genéticas entre as populações de *T. angustula* e *T. buchwaldi* e *A. mellifera* foram de 0.523 e 0.547, respectivamente. Este valor foi próximo ao encontrado para os "primers" curtos, porém houve uma troca de posições, onde *A. mellifera* passou a ser o grupo mais externo.

Quando reunimos os dados obtidos com os "primers" longos e curtos obtivemos um total de 218 marcadores, com uma média de 3,8 polimorfismos por "primer" para as populações de jataí. A matriz das distâncias genéticas não forneceu dissimilaridade genética entre Pilar do Sul e Prudentópolis (Figura 4), sendo que a maior porcentagem ficou entre *A. mellifera* e *T. buchwaldi* 2 (0.56).

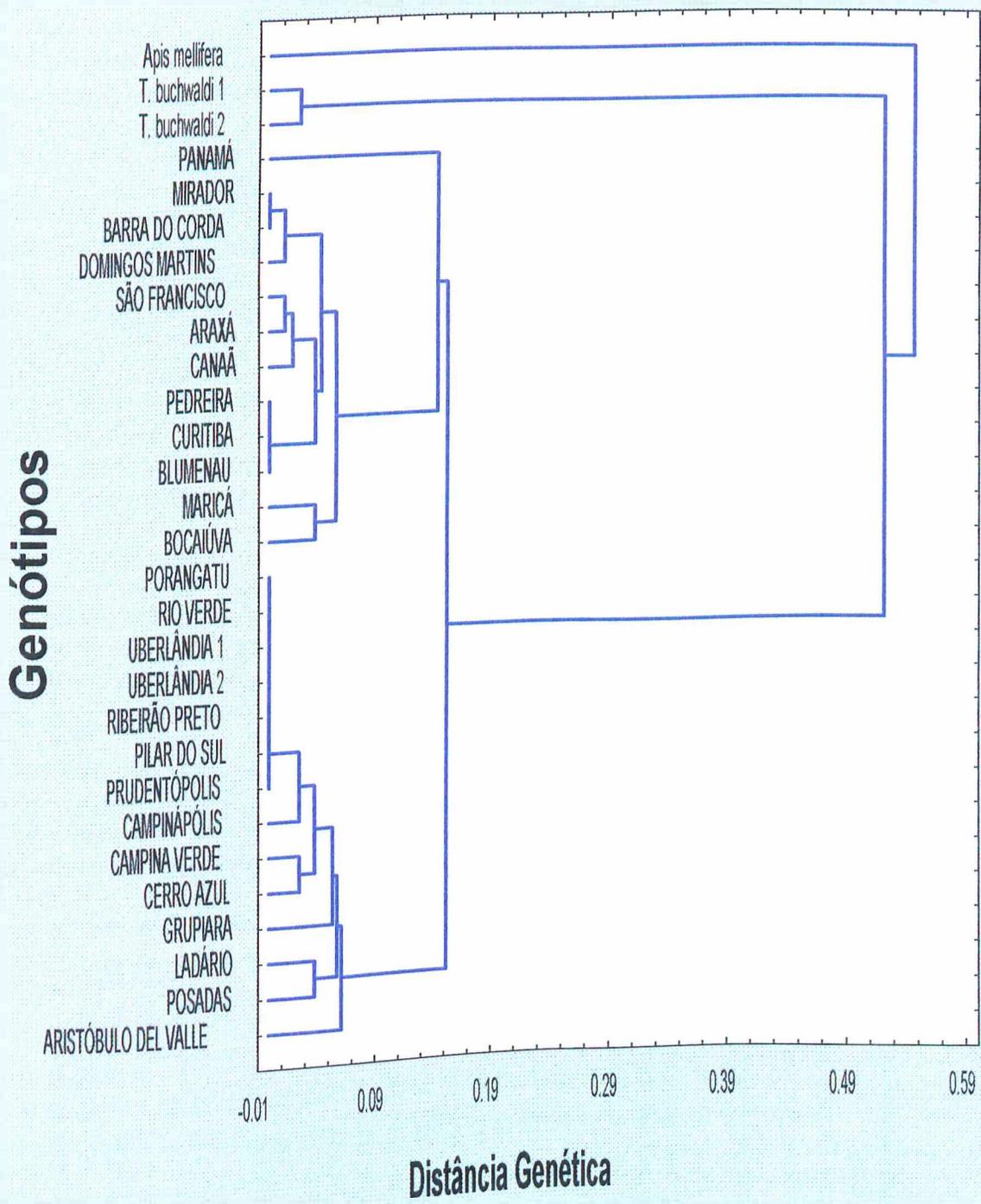


Figura 3: Dendrograma representativo de dados de distância genética por Porcentagem de Desacordo e agrupamento pelo método de UPGMA entre os 29 genótipos (26 de *T. angustula*, 2 de *T. buchwaldi* e 1 de *A. mellifera*) por meio de 77 marcadores RAPD obtidos por "primers" longos.

Variáveis	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
<i>A. mellifera</i>	.00																												
<i>T. buchwaldi</i> 1	.54	.00																											
<i>T. buchwaldi</i> 2	.56	.02	.00																										
Panamá	.53	.52	.52	.00																									
Mirador	.52	.51	.51	.08	.00																								
Barra do Corda	.53	.53	.53	.10	.02	.00																							
Porangatu	.54	.53	.53	.18	.13	.12	.00																						
Rio Verde	.53	.52	.52	.17	.12	.10	.02	.00																					
Campinápolis	.52	.51	.51	.17	.11	.12	.05	.04	.00																				
Ladário	.53	.51	.51	.17	.12	.13	.06	.06	.05	.00																			
Domingos Martins	.54	.52	.52	.11	.04	.06	.14	.15	.12	.13	.00																		
Maricá	.51	.52	.52	.13	.07	.06	.17	.14	.17	.17	.08	.00																	
Bocaiúva	.52	.52	.52	.11	.05	.06	.15	.15	.13	.15	.05	.05	.00																
São Francisco	.53	.53	.53	.12	.05	.05	.13	.14	.13	.15	.05	.05	.04	.00															
Uberlândia 1	.52	.52	.52	.17	.11	.13	.05	.04	.05	.06	.12	.16	.14	.13	.00														
Uberlândia 2	.52	.53	.53	.17	.12	.12	.04	.03	.06	.07	.13	.15	.15	.12	.01	.00													
Grupiara	.52	.53	.53	.20	.15	.13	.06	.04	.07	.09	.17	.16	.16	.15	.05	.04	.00												
Araxá	.53	.52	.52	.12	.04	.06	.13	.13	.11	.12	.04	.08	.05	.03	.11	.12	.14	.00											
Campina Verde	.51	.52	.53	.19	.14	.14	.05	.05	.06	.09	.17	.15	.16	.15	.06	.05	.06	.15	.00										
Canaã	.53	.53	.53	.14	.06	.08	.16	.16	.13	.14	.04	.07	.03	.03	.14	.15	.16	.04	.17	.00									
Ribeirão Preto	.51	.50	.51	.17	.11	.13	.05	.03	.04	.04	.13	.16	.13	.15	.04	.05	.07	.13	.06	.15	.00								
Pedreira	.51	.53	.54	.14	.06	.06	.15	.14	.13	.16	.07	.06	.05	.04	.16	.15	.15	.06	.14	.05	.15	.00							
Pilar do Sul	.52	.50	.50	.17	.12	.14	.04	.04	.04	.05	.12	.15	.14	.14	.02	.03	.07	.11	.06	.13	.01	.15	.00						
Curitiba	.54	.53	.53	.12	.05	.06	.14	.15	.12	.14	.04	.06	.04	.03	.12	.13	.17	.03	.15	.02	.14	.03	.13	.00					
Prudentópolis	.52	.50	.51	.17	.12	.14	.05	.04	.05	.04	.12	.16	.14	.14	.03	.04	.08	.12	.06	.14	.01	.16	.00	.13	.00				
Blumenau	.54	.54	.54	.14	.06	.06	.14	.15	.14	.15	.05	.05	.05	.03	.14	.13	.17	.05	.15	.03	.15	.03	.14	.02	.14	.00			
Posadas	.50	.49	.50	.17	.12	.14	.07	.08	.07	.05	.14	.16	.12	.12	.07	.08	.10	.11	.07	.13	.06	.14	.06	.12	.06	.14	.00		
Aristóbulo del Valle	.51	.51	.52	.16	.11	.11	.07	.08	.09	.09	.12	.12	.11	.09	.08	.07	.09	.10	.07	.11	.07	.10	.08	.11	.07	.11	.04	.00	
Cerro Azul	.51	.51	.51	.17	.12	.12	.06	.06	.07	.07	.14	.13	.11	.10	.07	.06	.08	.11	.06	.12	.06	.12	.07	.11	.06	.11	.03	.03	.00

Figura 4: Matriz das distâncias genéticas expressa em Porcentagem de Desacordo, obtida para 26 genótipos de *T. angustula* (4 a 29), dois genótipos de *T. buchwaldi* e um de *A. mellifera* por meio de 218 marcadores RAPD, gerados por "primers" curtos e longos.

Obs: As distâncias genéticas sombreadas correspondem às distâncias mencionadas no texto.

O dendrograma resultante da reunião dos dados (Figura 5) mostrou que ao nível de 0.139 de dissimilaridade genética, as populações de *T. angustula* foram divididas em dois "clusters", os mesmos observados para os "primers" curtos e longos, separadamente. Panamá continuou sendo o genótipo externo do grupo 1, tendo como grupo correlato todos os outros genótipos. Neste mesmo "cluster" os genótipos com menor distância genética na matriz foram Blumenau com Curitiba e Mirador com Barra do Corda, ambos com 0.02.

A presença do genótipo Panamá no grupo 1 fez com que esta apresentasse uma distância genética limite (0.121) maior do que a observada para o grupo 2 com os genótipos Argentinos (0.072). Isto pode estar relacionado ao grande intervalo geográfico de amostragem para este grupo (aproximadamente 5.770 km, entre Panamá e Blumenau) em relação ao genótipos do grupo 2 (1.770 km, entre Porangatu e Posadas). Geralmente, quanto mais distanciadas estão as populações, mais divergentes elas são em frequências alélicas e nas características fenotípicas de base genética, embora não haja, frequentemente, correlação estrita entre ambos (FUTUYMA, 1992). Estes grandes intervalos geográficos e as distâncias genéticas moleculares obtidos para *T. angustula* nos grupos 1 e 2 parecem sugerir que esta espécie está em um processo inicial de especiação, onde os genótipos mais periféricos em cada grupo (Panamá e Argentina) são os que apresentam maior dissimilaridade genética. Algumas diferenças na biologia, tem sido relatadas para *T. angustula*. As abelhas encontradas a oeste do Estado do Paraná, denominadas morfologicamente como *T. a. fiebrigi*, apresentam colônias de maior porte e, assim, número maior de indivíduos do que as de *T. a. angustula* encontradas, por exemplo, a Norte de Minas Gerais (Dra. Vera Lúcia Imperatriz Fonseca, comunicação pessoal). Uma observação a ser feita é que, embora não tenha sido fornecido o local (município) de origem da amostra do Panamá, a capital deste país (Panamá) foi considerada como ponto de referência para o cálculo da distância geográfica. Isto foi feito porque este país é pequeno em extensão territorial e, ainda, por ter sido fornecida apenas uma amostra.

Genótipos

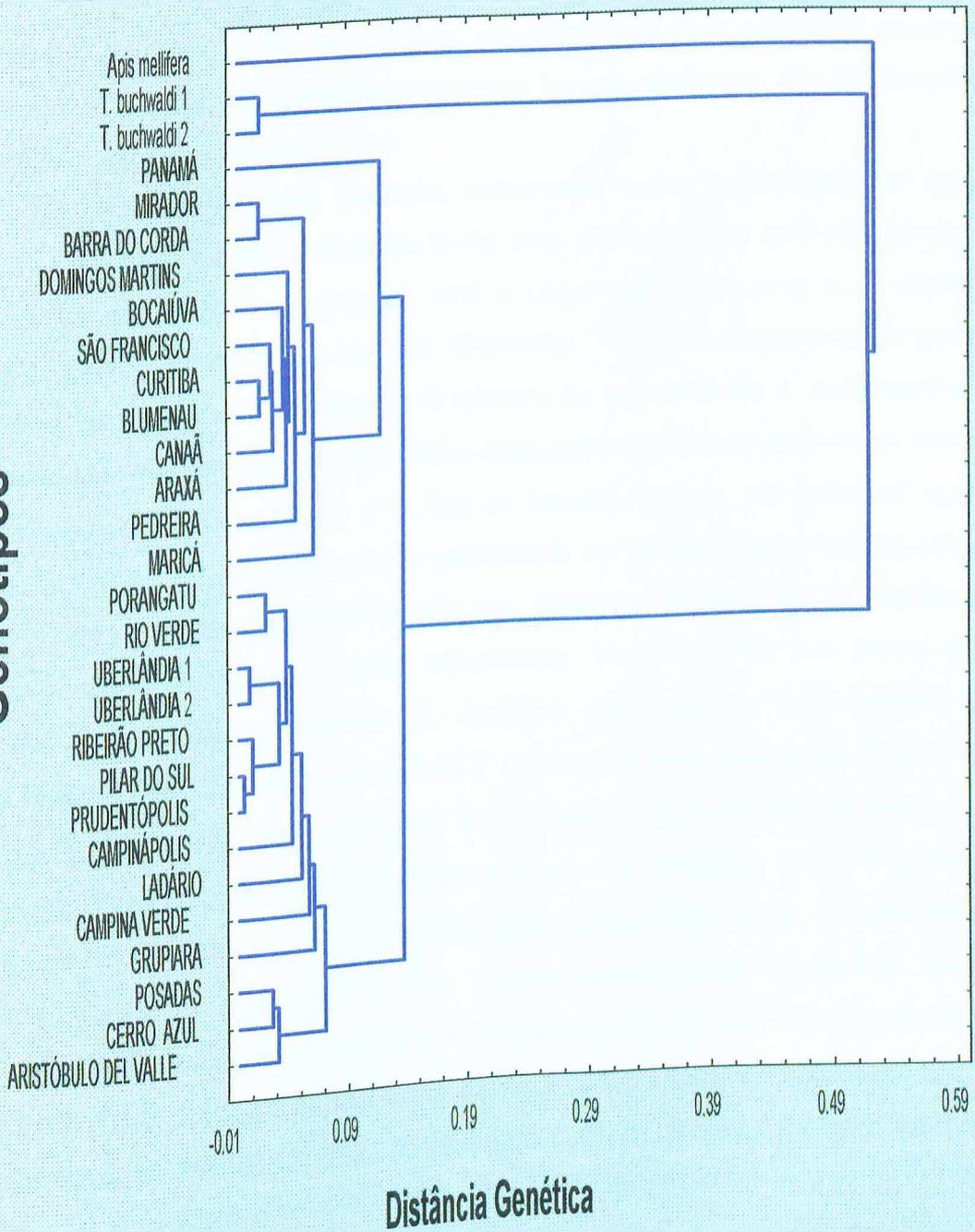


Figura 5: Dendrograma representativo da distância genética por Porcentagem de Desacordo e agrupamento pelo método de UPGMA entre os 29 genótipos (26 de *T. angustula*, 2 de *T. buchwaldi* e 1 de *A. mellifera*) por meio de 218 marcadores RAPD obtidos por "primers" longos e curtos.

O "cluster" 2 foi dividido a 0.072 em 2 sub-grupos: o Argentino (Aristóbulo del Valle, Posadas e Cerro Azul) e outro envolvendo os onze genótipos restantes, dos quais, Pilar do Sul e Prudentópolis foram os mais similares. Isto também foi observado para os "primers" curtos.

O grau de distância genética observada entre as populações de *T. angustula* e *T. buchwaldi* (0.519) foi muito alto, considerando que pertencem ao mesmo gênero, quando comparado com o observado entre jataí e *A. mellifera* (0.525) que pertencem a sub-famílias diferentes. Algumas considerações podem ser feitas a este respeito. **Primeira:** O número de amostras de *T. buchwaldi* e *A. mellifera* deste experimento foi pequeno. **Segunda:** O número de bandas obtidos por "primers" longos foi menor (77) que as bandas obtidas por "primers" curtos (141). Talvez se fosse aumentada a quantidade de "primers" longos (que separa "clusters" mais altos) a distância média das dissimilaridades entre *A. mellifera* e as outras duas espécies, também, aumentaria. Vale ressaltar que foram os 6 "primers" longos que colocaram *A. mellifera* como grupo mais externo no dendrograma final. **Terceira:** A espécie *T. buchwaldi* pode estar mais distante de *T. angustula* do que realmente tem sido relatado. A nível de morfologia as operárias são muito semelhantes. Embora pouco se conheça sobre a biologia, bioquímica e genética de *T. buchwaldi*, elas apresentam duas características muito distintas. *T. angustula* é uma abelha amplamente distribuída, sendo encontrada do México à Argentina e *T. buchwaldi* é uma espécie endêmica no Estado do Acre. Um outro aspecto que difere *T. angustula* e *T. buchwaldi*, refere-se aos tipos de ninhos. A jataí apresenta locais de nidificação bem variados (Figura 6) (NOGUEIRA-NETO, 1970; IMPERATRIZ-FONSECA, et al., 1984; MUXFELDT, 1986; NOGUEIRA-NETO, 1997), sendo encontrados em diversos tipos de cavidades (troncos, muros, cercas, medidores de energia e outros). O mesmo não acontece com *T. buchwaldi*, pois ela apresenta nidificação aérea ou seja, o seu ninho é parecido com o de várias outras Trigonas (*T. hyalinata*, *T. spinipes*) que não utilizam cavidades, mas sim, constroem um envoltório muito rígido (resina e barro) em torno do ninho preso a galhos de árvores, muros, e tetos. Assim, parece provável que a colineridade fenotípica em certas espécies

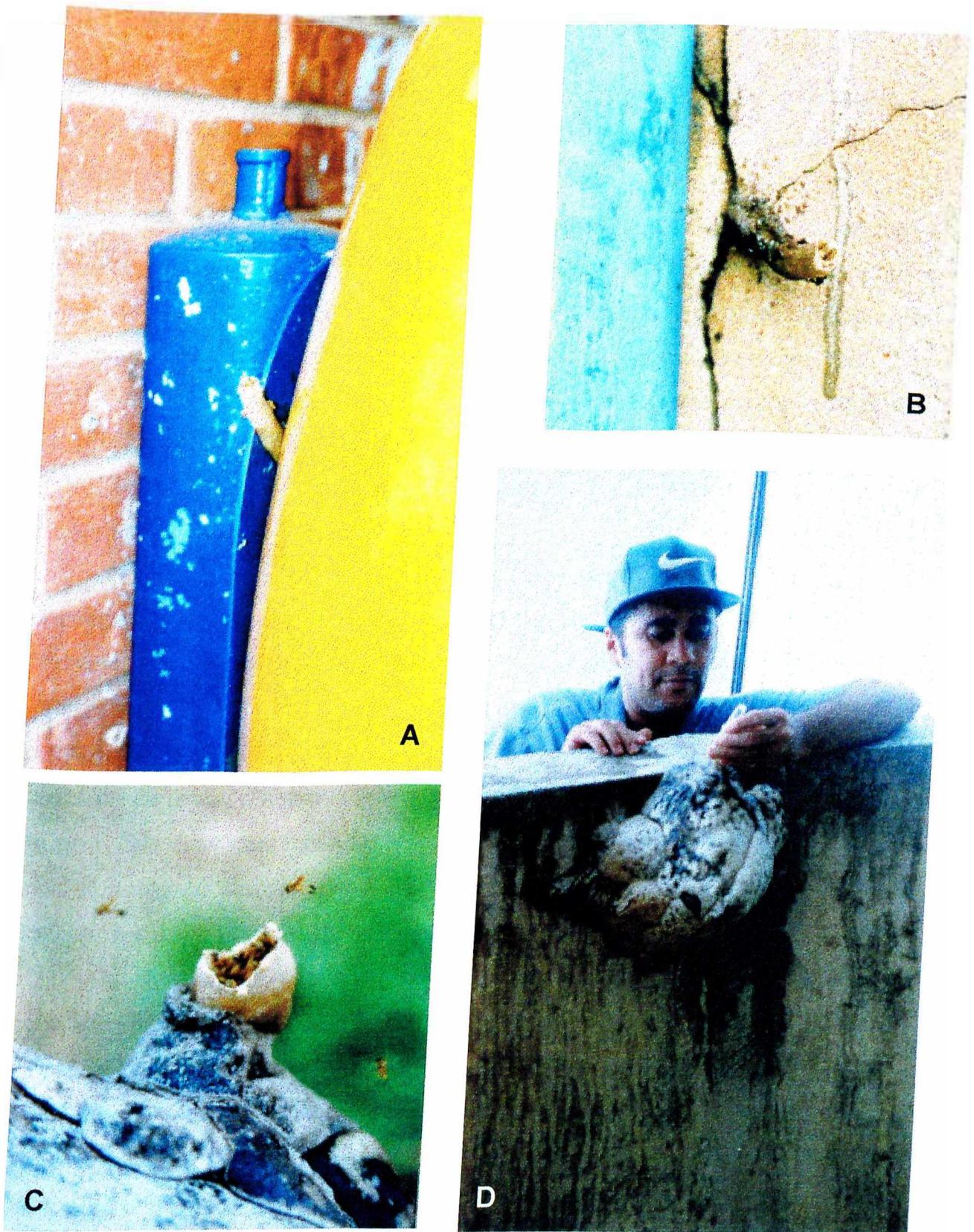


Figura 6: Visão das entradas dos ninhos de *T. angustula* e *T. buchwaldi*. **A e B** – Entrada do ninho de *T. angustula* em telefone público e muro, respectivamente. **C** – Perfil da entrada da colméia de *T. buchwaldi*. **D** – Ninho de *T. buchwaldi* em muro na Universidade Federal do Acre.

de himenópteros sugira proximidade genética, contudo, não só marcadores indicam tal diversidade mas, também, o comportamento diferenciado de arquitetura dos ninhos. Portanto, para esclarecer estes resultados, uma nova revisão da sistemática, biologia, genética, etc.. para o grupo, seria importante. **Quarta:** Marcadores RAPD realmente sejam eficientes apenas para estudos dentro e entre populações. O alto grau de polimorfismo (e portanto, de distância genética) obtido para espécies não relacionadas (*T. buchwaldi* e *A. mellifera*) faz com que a precisão da técnica em inferir parentesco, seja comprometida nos grupos hierárquico mais altos. Esta mesma observação foi feita por GONZÁLEZ & FERRER (1993) em um estudo de polimorfismos entre espécies do gênero *Hordeum*.

Na busca de marcadores genéticos para as populações de *T. angustula*, encontrou-se dois "primers"; OPL11 e MAU-B2 que permitiram diferenciar os dois "clusters". O "primer" MAU-B2 (Figura 7-A) apresenta três bandas polimórficas informativas de, aproximadamente, 650, 500 e 470 pb. As bandas de 650 e 500 pb segregaram juntas e serviram para identificar o "cluster" 2 (encontrado a sudoeste da área de estudo). A outra banda (470 pb) está presente somente no grupo 1. Nas duas repetições feitas para este "primer" verificou-se a existência de mais duas outras bandas (de menor intensidade) de, aproximadamente, 670 e 630 pb que também segregaram juntas na população 1. Como sua separação ficou prejudicada pela malha do gel (agarose a 1%) e pouca resolução pela coloração com brometo de etídio, torna-se necessário separar os produtos amplificados com este "primer" em poliacrilamida e fazer coloração com nitrato de prata para melhorar a resolução destas bandas.

O "primer" OPL11 (Figura 7-B) também foi capaz de reconhecer os dois grupos de jataí. Foram encontradas duas bandas de, aproximadamente, 1700 e 1100 pb. Quando a banda de 1700 pb está presente nos genótipos dos indivíduos do grupo 2, ela não é encontrada no grupo 1. Uma observação deve ser feita para esta banda, que apresentou uma menor intensidade nas amostras 28 e 29. Isto pode ter ocorrido devido à falta de Taq DNA polimerase no mix das últimas reações e/ou por competição dos sítios de anelamento dos "primers".

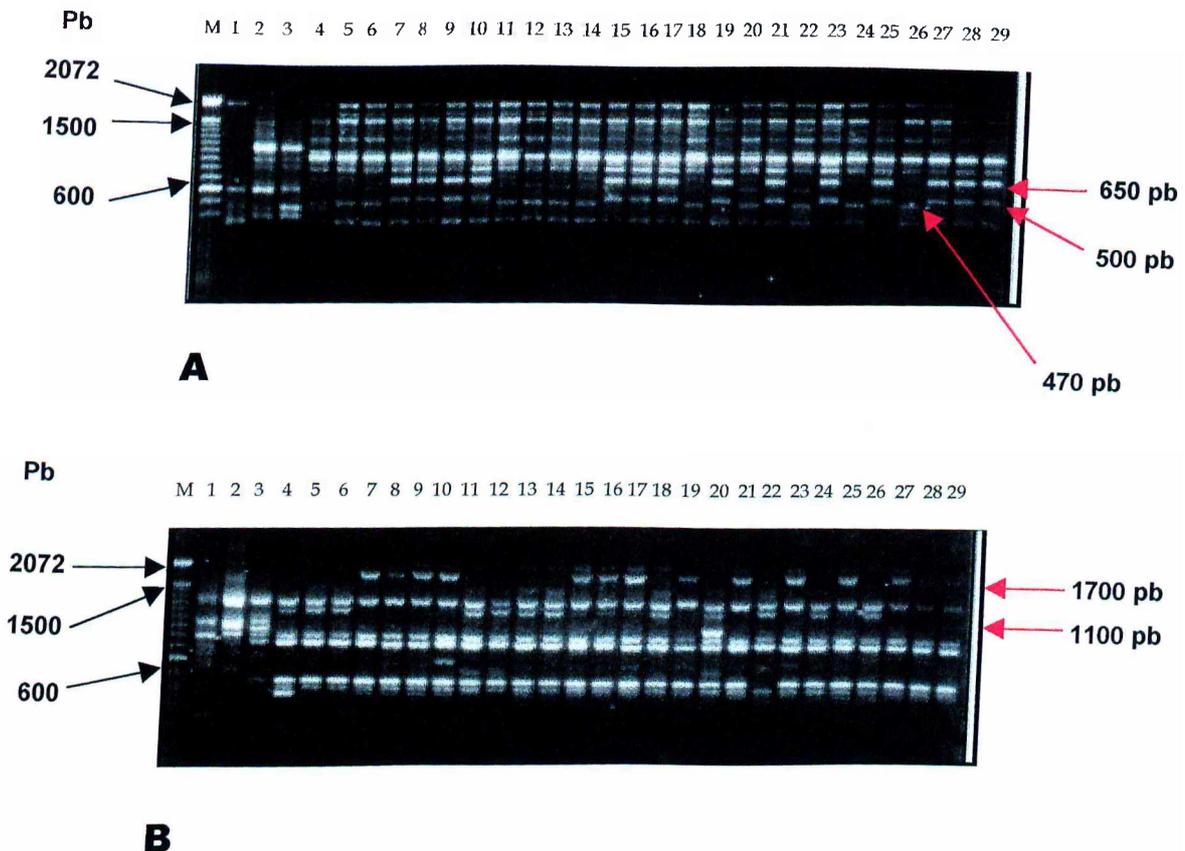


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos amplificados obtidos com o “primer” MAU-B2 (**A**) e com o “primer” OPL11 (**B**). M – Marcador de peso molecular de DNA, 1- *A. mellifera*, 2- *T. buchwaldi* 1, 3- *T. buchwaldi* 2. As amostras de 4 a 29 são de *T. angustula*, sendo: 4- Panamá, 5- Mirador, 6- Barra do Corda, 7- Porangatu, 8- Rio Verde, 9- Campinápolis, 10- Ladário, 11- Domingos Martins, 12- Maricá, 13- Bocaiúva, 14- São Francisco, 15- Uberlândia 1, 16- Uberlândia 2, 17- Grupiara, 18- Araxá, 19- Campina Verde, 20- Canaã, 21- Ribeirão Preto, 22- Pedreira, 23- Pilar do Sul, 24- Curitiba, 25- Prudentópolis, 26- Blumenau, 27- Posadas, 28- Aristóbulo del Valle, 29 – Cerro Azul.

Para a outra banda de 1100 pb ocorreu o contrário. Ela ocorreu somente no “cluster” 1. Este tipo de polimorfismo (deleção ou inserção de fragmentos) não ocorre com frequência em RAPD, visto que o polimorfismo mais comum é o de mutação de ponto (CLARK & LANIGAN, 1993). Assim, com apenas 2 “primers” (Figura 7) foi possível distinguir os dois grupos de jataí. Para verificar a fidelidade destes marcadores em discriminar os dois “clusters”, um intercruzamento controlado, em novo experimento, deve ser feito e os indivíduos F1, monitorados. Isto é de grande importância, porque marcadores RAPD podem ser obtidos

facilmente, sendo possível discriminar, rapidamente, as populações para estudos de genética e evolução. Similarmente, HU & QUIROS (1991) utilizando marcadores RAPD gerados por apenas 4 "primers" foram capazes de discriminar 14 cultivares de brócolos e 12 cultivares de couve-flor (*Brassica oleracea*).

O "cluster" 1 (Figura 8) encontrou-se distribuído no Panamá, na Floresta Amazônica (embora não se tenha coletado amostras nesta região, as amostras de Mirador e Barra do Corda - MA mantêm características mistas, com este tipo de vegetação), Norte de Minas e, acompanhando a mata Atlântica, chegou ao Sul da área de coleta. A amostra 19 de Pilar do Sul (grupo 2) aparentemente está deslocada por introgridir na distribuição do grupo 1. Isto poderia ser, de fato real, ou seja, o genótipo de Pilar do Sul ser um genótipo limítrofe do grupo 2. Parece não ser, quando se analisa que as amostras de Uberlândia 1 e 2 (provenientes da mesma colméia) apresentam apenas 0.01 de distância genética na matriz (Figura 4). Não houve distância genética entre Pilar do Sul e Prudentópolis, e a distância genética de Pilar do Sul e Ribeirão Preto (0.01) não correspondem à verdadeira distância geográfica (aproximadamente 560 e 470 km), respectivamente. Buscou-se uma explicação lógica para este fato junto ao fornecedor dessas amostras em Ribeirão Preto. Ele possui entre outras espécies, 20 colméias de jataí de Ribeirão Preto e duas de outros locais, uma de Prudentópolis e outra de Pilar do Sul. As colméias de Prudentópolis e de Pilar do Sul foram transferidas para o meliponário de Ribeirão Preto em 1992 e 1993, respectivamente. Considerando-se que o tempo médio de vida de uma rainha de jataí é de dois anos, houve tempo suficiente para, 3 e 2 cruzamentos (respectivamente) até a data de coleta (agosto de 1997) entre estas e a população de Ribeirão Preto. Assim a amostra de Pilar do Sul (19) observada na Figura 8 pode não representar o genótipo natural da população local. Para elucidar esta observação, amostras naturais de Pilar do Sul deveriam ser testadas.

A espécie original de *T. angustula* em Ribeirão Preto tem sofrido constantes introduções de alelos raros, devido à importação de colônias de outros locais, por pesquisadores. Isto também foi observado em um estudo de

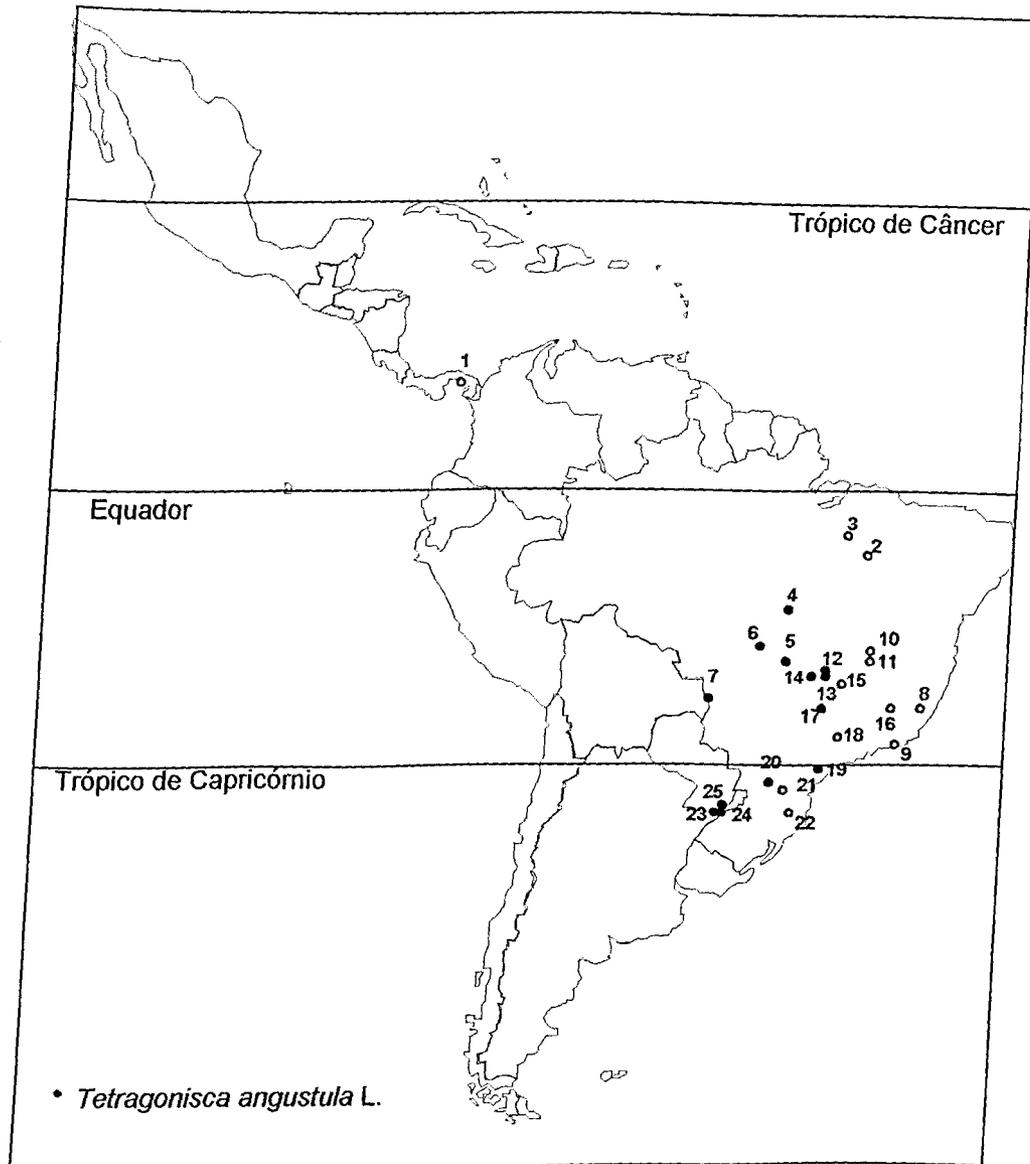


Figura 8: Localização geográfica dos dois “clusters” de *T. angustula* obtidos por 218 marcadores RAPD. **O grupo 1 (vermelho)** é constituído por (1) Panamá, (2) Mirador, (3) Barra do Corda, (10) São Francisco, (11) Bocaiúva, (15) Araxá, (8) Domingos Martins, (16) Canaã, (9) Maricá, (18) Pedreira, (21) Curitiba e (22) Blumenau. **O grupo 2 (preto)** : (4) Porangatu, (5) Rio Verde, (12) Grupiara, (13) Uberlândia 1 e 2, (14) Campina Verde, (17) Ribeirão Preto, (19) Pilar do Sul, (20) Prudentópolis, (6) Campinópolis, (7) Ladário, (23) Posadas, (25) Aristóbulo del Valle, e (24) Cerro Azul.

isozimas para esta espécie, por CASTANHEIRA (1995). Portanto, é importante tomar cuidado no ato de coleta de indivíduos destinados a estudos de biogeografia a fim de evitar erros advindos de análises que não correspondam a história natural das populações.

O grupo 2 na região amostrada, encontrou-se distribuído no nordeste da Argentina, oeste dos Estados do Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás e nos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Por falta de um número maior de amostras ao norte de Mato Grosso, Goiás e Tocantins e em toda a Amazônia, não foi possível estabelecer os limites entre os grupos, nesta área.

Estes dados conferem, parcialmente, com a distribuição geográfica de subespécies de *T. angustula* segundo caracteres morfológicos. Verificou-se, por marcadores RAPD, que o grupo 2 (correspondente à *T. a. fiebrigi*) encontrou-se mais disperso (alcançando o norte de Mato Grosso e Goiás) do que é relatado pela morfologia (NOGUEIRA-NETO, 1970). O grupo 1 (correspondente a *T. a. angustula*) por sua vez, encontrou-se distribuído em uma área cuja vegetação (de uma maneira geral) compreende florestas de clima úmido. Os genótipos, que são exceção a esta suposição, são os localizados na região de Cerrado do Norte de Minas Gerais (amostras de Bocaiúva e São Francisco). Ao norte desta região, sul da Bahia, esta espécie não é mais encontrada. A amostra de Araxá, que também localiza-se em vegetação de cerrado, poderia representar um genótipo limítrofe entre os dois grupos, uma vez que Uberlândia localizada a 160 km desta já apresenta o genótipo do grupo 2.

CASTANHEIRA (1995) estudou 228 colméias de *T. angustula* provenientes de 5 estados (Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Mato Grosso) para 6 sistemas enzimáticos. Foi observado variação no *locus* da hexoquinase, da glicerol-3-fosfato desidrogenase e malato desidrogenase. Uma análise de correlação significativa entre o grau de mistura racial (nas populações de São Paulo) e a frequência do alelo *Hk*⁸⁸ indicou que este poderia ser usado como marcador para a sub-espécie *T. a. fiebrigi*.

A rapidez dos marcadores RAPD em monitorar grandes populações, a quantidade "ilimitada" de *loci* polimórficos encontrados e a pequena quantidade

de material biológico exigida, fazem com que os marcadores RAPD sejam preferidos em estudos de populações (KAMBHAMPATI *et al.* 1992; CHAPCO *et al.* 1993; LU & HANK, 1996). Estas justificativas são de extrema importância ao considerar a enorme biodiversidade existente em Meliponíneos e o ritmo acelerado de devastação das florestas nativas. O monitoramento por marcadores RAPD em espécies endêmicas (como é o caso de *T. buchwaldi*), poderá fornecer informações com maior rapidez, permitindo que espécies em risco de extinção sejam caracterizadas geneticamente.

4. CONCLUSÕES

- A análise de 218 marcadores RAPD permitiu a separação das populações de *T. angustula* em dois grupos a nível de 0.139 de distância genética. O grupo 1 constituiu-se de: Panamá, Mirador, Barra do Corda, Bocaiúva, São Francisco, Maricá, Domingos Martins, Araxá, Canaã, Pedreira, Curitiba e Blumenau. O grupo 2, foi constituído pelas populações de Porangatu, Rio Verde, Uberlândia 1 e 2, Ribeirão Preto, Prudentópolis, Campinápolis, Ladário, Campina Verde, Grupiara, Posadas, Cerro Azul, Aristóbulo del Valle e Pilar do Sul.
- O Panamá foi o genótipo mais externo do grupo 1 com uma distância genética de 0.121, enquanto que a distância genética máxima do grupo 2 foi de 0.072, para o grupo Argentino (Posadas, Aristóbulo del Valle e Cerro Azul).
- Os "primers" longos foram eficientes na distinção de grupos mais distantes não sendo, porém, para os genótipos mais similares. Os "primers" curtos, por sua vez, foram mais eficientes na distinção de genótipos mais próximos. Estes resultados sugerem que a distância genética por marcadores RAPD, em uma população que se apresenta distribuída em uma grande área geográfica, tornam-se factíveis se forem usados "primers" curtos (10pb) e longos (mais de 20pb).
- O grau de distância genética entre *T. angustula* e *T. buchwaldi* (0.519) foi muito alto, considerando que pertencem ao mesmo gênero de *T. angustula* se comparado com *T. angustula* e *A. mellifera* (0.525) que são de sub-famílias

diferentes. Quatro suposições foram levantadas: 1). O número de amostras de *A. mellifera* e *T. buchwaldi*, usadas neste trabalho, foi pequeno. 2). O número de "primers" longos (separa "clusters" mais altos) usados, também, foi pequeno. 3). A eficiência da técnica de RAPD seja comprometida em grupos hierárquicos mais altos. 4). *T. buchwaldi* esteja mais distante de *T. angustula* do que é observado pela morfologia. Para elucidar esta questão, novos experimentos RAPD usando mais amostras de *T. buchwaldi* e "primers" longos, além de trabalhos de biologia e revisão sistemática do grupo, seriam importantes.

- Foram descritos 5 marcadores moleculares (provenientes de 2 "primers") para os dois "clusters" de *T. angustula* (**grupo 2:** ~650 e 500 pb - "primer" MAU-B2 e ~1700 pb - "primer" OPL11; **grupo 1:** ~470 pb - "primer" MAU-B2 e ~1100 pb - "primer" OPL11).
- Pelos resultados com marcadores RAPD e distribuição geográfica, obteve-se um padrão mais abrangente de distribuição para o grupo 2 (correspondente à *T. a. fiebrigi*). Ele encontrou-se distribuído no nordeste da Argentina, oeste dos Estados do Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás e nos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. O grupo 1 (correspondente à *T. a. angustula*) por sua vez, encontrou-se distribuído no Panamá, Maranhão, Norte de Minas Gerais e, pela Mata Atlântica, alcançou o Estado de Santa Catarina. Exceto para as amostras do Norte de Minas (Bocaiúva e São Francisco) e Araxá, o grupo 1, de uma maneira geral, encontrou-se distribuído em florestas úmidas.
- Os resultados obtidos com o genótipo de Pilar do Sul sugerem a sua não inclusão ao grupo 2, como o observado pela análise de "cluster", mas sim ao grupo 1. Isto ressalta a importância do momento de amostragem, para não incorrer em erros em estudos de biogeografia e história natural das populações.

- Não foi possível estabelecer os limites entre os grupos ao Norte de Mato Grosso, Goiás, Tocantins e Amazônia, por falta de coleta nestes locais. Um trabalho complementar, com a mesma técnica, iria enriquecer os dados obtidos.
- Marcadores RAPD constituem-se em eficiente ferramenta molecular para estudos de populações de Meliponíneos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYALA, F.J. 1983. Genetic polymorphism: from electrophoresis to DNA sequences. *Experientia* 39:813-823.
- BALESTIERI, J.B.P. 1989. Toxicidade de inseticidas e efeitos respiratórios em duas espécies de meliponíneos *Tetragonisca angustula angustula* (Latreille, 1807) e *Nannotrigona testaceicornis testaceicornis* (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera - Apidae). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista - Campus Rio Claro, 116p.
- BELELE, C.L. 1997. Análise Bioquímica e Molecular da Diversidade Genética entre Cultivares Mesoamericanas e Andinas de feijoeiro Comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Tese de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 68p.
- BORGES, M. 1997. Marcadores moleculares e seus efeitos sobre características quantitativas em bovinos de corte. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 119p.
- BORROR, D. J. & DELONG, D.M. 1988. *Introdução ao estudo dos insetos*. Trad. CORREA, D.D.; FROELICH, C.G.; RODRIGUES, S.A.; SCHLENZ, E. & FANTA, E., 1ª ed., Ed. Edgard Blucher Ltda., São Paulo, p.1
- 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.

- CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B.J. & GRESSHOFF, P.M. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Biotechniques**, **9**:553-556.
- 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.
- CAMARGO, J.M.F. & POSEY, D.A. 1990. O conhecimento dos Kayapó sobre as abelhas sociais sem ferrão (Meliponinae, Apidae, Hymenoptera): Notas adicionais. **Bol. Mus. Para Emílio Goeldi, ser. Zool.** **6**(1):17-42.
- CAMARGO, J.M.F. 1989. Comentários sobre a sistemática de Meliponinae (Hymenoptera: Apidae). **An. XIV Simp. Anual da ACIESP.** **68** (suppl.):41-61.
- CAMERON, S.A. 1993. Multiple origins of advanced eusociality in bees inferred from mitochondrial DNA sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **90**:8687-8691.
- 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 - UFU, 21p.
- 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). **J. of Econ. Entomol.** **89**(6):1345-1353.
- CASTANHEIRA, E.B. 1995. **Marcadores genéticos e sua utilização em estudos populacionais em *Tetragonisca angustula* e *Plebeia droryana* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae).** Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, 86p.
- CHALMERS, K.J., WAUGH, R.; SPRENT, J.I.; SIMONS, A.J. & POWELL, W. 1992. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. **Heredity** **69**:465-472.
- CHAPCO, W.; ASHTON, N.W.; MARTEL, R.K.B.; ANTONISHYN, N. & CROSBY, W.L. 1992. A feasibility study of the use of random amplified polymorphic

- DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers. **Genome** **35**:569-574.
- CLARK, A.G. & LANIGAN, C.M.S. 1993. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. **Mol. Biol. Evol.** **10**:1096-1111.
- CONTEL, E.P.B. & KERR, W.E. 1976. Origin of males in *Melipona subnitida* estimated from data of an isozymic polymorphic system. **Genética** **46**:271-277.
- CONTEL, E.P.B. & MESTRINER, M.A. 1974. Esterase polymorphisms at two loci in the social bee. **J. Hered.** **65**:349-352.
- CONTEL, E.P.B. & MESTRINER, M.A. 1975. Developmental protein patterns in two species of stingless bees: *Melipona quadrifasciata anthidioides* and *Melipona subnitida*. **Ciê. e Cult.** **27**:1221-1224.
- 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.
- CURSINO, J.R. 1993. **Estudo comparativo dos padrões isoenzimáticos e de proteínas não catalíticas em espécies de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae)**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, 152p.
- DAWSON, I.K.; CHALMERS, K.J.; WAUGH, R. & POWELL, W. 1993. Detection and analysis of genetic variation in *Hordeum spontaneum* populations from Israel using RAPD markers. **Mol. Ecol.** **2**:151-159.
- 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.
- FALCÃO, T.M.M.A & CONTEL, E.P.B 1990. Genetic variability in natural populations of Brazilian social bees: I. Isozyme patterns and polymorphism for esterases and total protein. **Rev. Bras. Genet.** **13**:731-754.
- FALCÃO, T.M.M.A & CONTEL, E.P.B 1991a. Genetic variability in natural populations of Brazilian social bees: I. Electrophoretic data for PGM and MDH give evidence for multiple fertilizations in stingless bees. **Rev. Bras. Genet.** **14**:47-59.

- FALCÃO, T.M.M.A & CONTEL, E.P.B 1991b. Genetic variability in natural populations of Brazilian social bees: II. Electrophoretic data for ME, GPD, SOD and IDH. *Rev. Bras. Genet.* 14:61-72.
- FALCÃO, T.M.M.A. 1984. **Polimorfismos protéicos em populações naturais de abelhas brasileiras.** Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, 231p.
- FERREIRA, F.H.N. 1993. **Aspectos da estratégia reprodutiva em *Tetragonisca angustula angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae).** Tese de Mestrado, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, 105p.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1996. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 2ª. Ed., EMBRAPA-CENARGEM, Brasília, p.16-23.
- FIRMINO, N. 1966. **As abelhas.** Ed. H. Antunes, Rio de Janeiro. 136p.
- FOWLER, H.G. 1979. Responses by a stingless bee to a subtropical environment. *Rev. Biol. Trop.* 27(1):111-118.
- FUTUYMA, D.J. 1992. **Biologia Evolutiva.** Trad. Mario de Vivo e Coord. de Fábio de Melo Sene. 2ª ed. Ribeirão Preto, Societ. Brasil. de Genética/CNPq, 646p.
- GONZÁLEZ, J.M. & FERRER, E. 1993. Random amplified polymorphic DNA analysis in *Hordeum* species. *Genome:* 36:1029-1031.
- GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P. & SAMBROOK, J. 1974. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. Cold Spring Harbor Symp. *Quant. Biol.*39:439-446.
- GROSSO, A.F. 1993. **Estudos bionômicos em *Tetragonisca angustula angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae).** Tese de Mestrado, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, 176p.
- HARRIS, H. 1966. Enzyme polymorphisms in man. *Proc. Roy. Soc. Ser. B.*, 164:298-310.

- HU, J. & QUIROS, C.F. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. **Plant Cell Report**. **10**:505-511.
- HUBBY, J.L. & LEWONTIN, R.C. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The Number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, **54**:577-594.
- HUNT, G.J. & 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, G.J. & PAGE, R.E. Jr. 1992b. Linkage analysis of sex determination in the honey bee (*Apis mellifera*). **Mol. Gen. Genet.** **244**:512-518.
- HUNT, G.J. & PAGE, R.E. Jr. 1995. Linkage Map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. **Genetics** **139**:1371-1382.
- HUNT, G.J.; PAGE, R.E. Jr.; FONDRK, M.K. & DULLUM, C.J. 1995. Major quantitative trait loci affecting honey bee foraging behavior. **Genetics** **141**(4):1537-1545.
- HUNTER, R.L. & MARKERT, C.L. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. **Science** **125**:1294-1295.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. & AGUILAR, J.B.V. 1984. Atividade externa de jataí (*Tetragonisca angustula fiebrigi*) Schwarz. **Ciência e Cultura**, **36**(7):597.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; KLEINERT-GIOVANNINI, A.; CORTOPASSI-LAURINO, M. & RAMALHO, M. 1984. Hábitos de coleta de *Tetragonisca angustula*, Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Bol. Zool. Univ. São Paulo**, **8**:115-131, 1984.
- IOIRICK, N. 1981. **As abelhas farmacêuticas com asas**. Trad. por MARQUES, J.A. Ed. Mir Moscovo, URSS, Cap. 3.
- IWAMA, S. & MELHEM, T.S. 1979. The pollen spectrum of the honey of *Tetragonisca angustula angustula*, Latreille (Apidae, Meliponinae). **Apidol.** **10**(3):275-295.
- KAMBHAMPATI, S., BLACK, W.C. & RAI, K.S. 1992. Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae):

- techniques, statistical analysis, and applications. *J. Med. Entomol.* **29(6)**:939-945.
- KELBER, A. & ZEIL, J. 1990. A robust procedure for visual stabilisation of hovering flight position in guard bees of *Trigona (Tetragonisca) angustula* (Apidae, Meliponinae). *J. Comp. Physiol.* **167**:145-148.
- KERR, W.E. 1969. Some aspects of the evolution of social bees (Apidae). *Evolutionary Biology* **3**: 119-175. T. DOBZHANSKY, M.K. HECHT & W.E. STERRE (Eds.), Columbia Univ. Press, New York.
- KERR, W.E.; CARVALHO, G.A. & NASCIMENTO, V.A. 1996. *Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação*. Ed. Fundação Acangaú, p.14
- KERR, W.E.; ZUCCHI, R.; NAKADAIRA, J.T. & BUTOLO, J.E. 1962. Reproduction in the social bees (Hymenoptera: Apidae). *J. N. Y. Entomol. Soc.* **70(4)**:265-276.
- KNOLL, F.R.N. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. 1987. Abundance and resources visited by individuals of *Tetragonisca angustula*. In: EDER, J. & REMBOLD, H. Eds. *Chemistry and Biology of Social Insects*, Verlag J. Peperny, Munchen, p.704-705.
- LEWONTIN, R.C. & HUBBY, J.L. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, **54**:595-609.
- LI, W.H.; GRAUR, D. 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution*. 1st ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA; 284p.
- 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.
- LINDAUER, M. & KERR, W.E. 1960. Communication between the workers of stingless bees. *Bee World* **41(2)**:29-41, 65-71.
- LOWE, T.; SHAREFKIN, J.; YANG, S.Q. & DIEFFENBACH, C.W.A. 1990. A computer program for selection of oligonucleotides for polymerase chain reaction. *Nuc. Ac. Res.* **18(7)**: 1757-1761.

- LU, R. & RANK, G.H. 1996. Use of RAPD analyses to estimate population genetic parameters in the alfalfa leaf-cutting bee, *Megachile rotundata*. **Genome** 39:655-663.
- MACHADO, M.F.P.S. & CONTEL, E.P.B. 1989. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G-3-PDH, E.C.1.1.1.8) variation in adult *Plebeia droryana* bees (Apidae, Hymenoptera). **Biochem. Genet.** 27:481-486.
- MACHADO, M.F.P.S. & CONTEL, E.P.B. 1991a. A Glycerol-3-phosphate dehydrogenase variation in Brazilian stingless bees and wasp species. **Biochem. Genet.** 29:255-260.
- MACHADO, M.F.P.S. & CONTEL, E.P.B. 1991b. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase isozyme variation in adult meliponids (Hymenoptera, Apidae). **Biochem. Genet.** 29:593-600.
- 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.
- MACHADO, M.F.P.S.; CONTEL, E.P.B. & KERR, W.E. 1984. Proportion of males sons of the queen and sons of workers in *Plebeia droryana* (Hymenoptera, Apidae) estimated from data of an MDH isozymic polymorphic system. **Genetics.** 65:193-198.
- MARIANNO FILHO, J. 1911 **Ensaio sobre os meliponidas do Brasil**. Edição do autor. 140p.
- MEUNIER, J.R. & GRIMONT, P.A.D. 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Res. Microbiol.** 144:373-379.
- MICHENER, C.D. 1990. Classification of the Apidae (Hymenoptera). **Univ. Kansas Sci. Bull.** 54(4):75-164.
- MOURE, J.M. 1961. A preliminary supra-specific classification of the old world Meliponinae bees (Hymenoptera, Apoidea). **Studia Entomol.** 4 (1-4):181-242.
- MURALIDHARAN, K. & WAKELAND, E.K. 1993. Concentration of primer and template qualitatively affects products in random amplified polymorphic DNA PCR. **Bio Techniques,** 14:362-364.

- MUXFELDT, H. 1986. **Criação de abelhas**. 1a. Ed., Ed. Sagra, Porto Alegre, p.167-168
- NOGUEIRA-NETO, P.N. 1954. Notas bionômicas sobre Meliponinae III - Sobre a enxameagem. **Arquivos do Museu Nacional - RJ.** 42:419-451.
- NOGUEIRA-NETO, P.N. 1970. **A criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae)**. 2ª. ed., Ed. Chácaras e Quintais, São Paulo, p.74-76.
- NOGUEIRA-NETO, P.N. 1997. **A vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo, Ed. Nogueirapis, 445p.
- POST, R.J.; FLOOK, P.K. & MILLEST, A.L.. 1993. Methods for the preservation of insects for DNA studies. **Bioch. System. and Ecology** 21(1):85-92.
- RESENDE, S.H.M. 1997. **Padrão de esterases durante o desenvolvimento embrionário de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Meliponinae)**. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 51p.
- ROUBIK, D.W. 1983. Nest and colony characteristics of stingless bees from Panamá (Hymenoptera: Apidae). **J. Kansas Entomol. Soc.** 56(3):327-355.
- ROUBIK, D.W. 1989. **Ecology and natural history os tropical bees**. 1st. ed., Cambridge University Press, Cambridge, 514p.
- ROUX, K. 1995. Optimization and troubleshooting in PCR. **PCR Methods and Applications** 4(5):S185-S194.
- RUTTNER, F. 1987. The evolution of honeybees. In: MENZEL, R. & MERCER, A. **Neurobiology and Behavior of Honeybees**. Springer Verlag, Berlin, 8-20p.
- SAIKI, R.D.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A. & ARNHEIN, N. 1985. Enzymatic Amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** 230:1350-1354.
- SAKAGAMI, S.F. 1982. Stingless bees. In HERMANN, H.R. **Social Insects**. New York, Academic Press. 3(4):361-423.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd. Edn. 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 - USP, 148p.
- SCHIERWATER, B. & ENDER, A. 1993. Different thermostable DNA polymerases 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.
- SCHWARZ, H.F. 1948. Stingless bees (Meliponinae) of the Western Hemisphere. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* **90**. I-XVIII + 1-546.
- SHUSTER, D.E.; KEHRLI, M.E.; ACKERMANN, M.R. & GILBERT, R.O. 1992. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Hostein cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:9225-9229.
- SMITHIES, O. 1955. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.* **61**:629-641.
- SOLLER, M. 1990. Genetic mapping of the bovine genome using deoxyribonucleic acid-level markers to identify loci affecting quantitative traits of economic importance. *J. of Dairy Science* **73**:2628-2646.
- SOUTHERN, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. of Molec. Biol.* **98**:503-517.
- TABERNER, A.; DOPAZO, J & CASTANERA, P. 1997. Genetic characterization of populations of a de novo arisen sugar beet pest, *Aubeonymus mariaefranciscae* (Coleoptera, Curculionidae), by RAPD analysis. *J. Mol. Evol.* **45**(1):24-31.
- THORMANN, C.E. & OSBORN, T.C. 1992. Use of RAPD & RFLP markers for germoplasm evaluation. *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*, Minneapolis, p.9-11.
- WAGNER, A.E. & BRISCOE, D.A. 1983. An absence of enzyme variability within two species of *Trigona* (Hymenoptera). *Heredity* **50**:97-103.

- WANG, H.; FLIEGEL, L.; CASS, C.E.; PENN, A.M.W.; MICHALAK, M.; WEINER, J.H. & LEMIRE, B.D. 1994. Primers are decisive for sensibility of PCR. **BioTechniques** 17(1):82-87.
- WEEDEN, N.F.; TIMMERMAN, G.M.; HEMMAT, M.; KNEEN, B.E. & LODHI, M.A. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers. **Applications of RAPD Technology to Plant Breeding**, Minneapolis, p.12-17.
- WELSH, J. & MACCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucl. Acid. Res.** 18:7213-7218.
- WHITE, T.J.; ARNHEIM, N. & ERLICH, H.A. 1989. The polymerase chain reaction. **Technical Focus** 5(6):185-188.
- WILLE, A. 1983. Biology of the stingless bees. **Ann. Rev. Entomol.** 28:41-64.
- 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. **Nucl. Acid. Res.** 18:6531-6535.
- WITTMANN, D. 1985. Aerial defense of the nest by workers of the stingless bee *Trigona (Tetragonisca) angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). **Behav. Ecol. Sociobiol.** 16:111-114.
- WITTWER, C.T. & GARLING, D.J. 1991. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. **BioTechniques** 10(1):76-83.
- YONG, H.S. 1991. Biochemical genetic differentiation in the *Trigona atripes* species group of Malaysian stingless bees (Insecta, Hymenoptera, Apidae), **Comp. Biochem. Physiol.** 99B:625-628.
- ZEIL, J. & WITTMANN, D. 1989. Visually controlled station-keeping by hovering guard bees of *Trigona (Tetragonisca) angustula* (Apidae, Meliponinae). **J. Comp. Physiol.** 165:711-718.
- ZEIL, J. & WITTMANN, D. 1993. Landmark orientation during the approach to the nest in the stingless bee *Trigona (Tetragonisca) angustula* (Apidae, Meliponinae). **Insect. Soc.** 40:381-389.