



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



***O USO DE MARCADORES MICROSATÉLITES  
NO ESTUDO DE ACASALAMENTO EM  
MELIPONA SCUTELLARIS***

*Katiere Soares*

*Orientador: Warwick Estevam Kerr*

Uberlândia – MG

Março/2001

**SISBI/UFU**



1000201939



MON  
595.799-115  
56764  
TES/MEM

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

***O USO DE MARCADORES MICROSATÉLITES  
NO ESTUDO DE ACASALAMENTO EM  
MELIPONA SCUTELLARIS***

*Katiere Soares*

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

Uberlândia – MG

Março/2001

S676u Soares, Katiere, 1976-  
O uso de marcadores microsatélites no estudo de  
acasalamento em *Melipona scutellaris*  
/ Katiere Soares. - Uberlândia, 2001.  
49f. : il.  
Orientador: Warwick Estevam Kerr.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Uberlândia, Curso de Pós-Graduação em Genética e  
Bioquímica.  
Bibliografia: f. 43-47.  
1. Melipona - Genética - Teses. 2. Abelha - Genética -  
Teses. I. Universidade Federal de Uberlândia. Curso de  
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. II. Título.  
CDU: 595.799-115(043)

0070-66460

D SISBI/UFU  
201939 ex.1

Universidade Federal de Uberlândia  
BIBLIOTECA

FU-00012402-1

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais,*

Dirceu Soares e Ilda Fracarolli Soares que nunca pouparam esforços para que eu pudesse completar mais esta etapa da minha vida. Amo vocês.

*Ao prof. Dr. Kerr,*

exemplo de vida. Admirável pesquisador e ser humano. Espero que meu trabalho contribua modestamente na sua constante pesquisa com as abelhas.

*Aos amigos do laboratório,*

que ajudaram e participaram de todas as etapas da realização deste trabalho.

*Tu, te abeiraste da praia  
Não buscaste, nem sábios nem ricos  
Somente redes e meu trabalho...  
Senhor, tu me olhaste nos olhos  
E a sorrir, pronunciaste meu nome  
Lá na praia, eu deixei o meu barco  
Junto a Ti, buscarei outro mar...*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pai de infinita bondade, que caminha junto a mim em todos os dias da minha vida.

Ao Dr. Kerr por me permitir fazer parte da sua grande família de abelhudos.

À amiga Gislene Almeida Carvalho pelos ensinamentos científicos (foi quem primeiro me ensinou a fazer uma extração de DNA) e pelo companheirismo em toda a minha passagem pelo laboratório.

Ao Cícero Donizete Pereira que me orientou nos primeiros passos da minha vida científica. Amigo admirável.

À Rosana de Cássia Oliveira que sempre incentivou e foi quem me ensinou a montar uma placa de sequenciamento. Sempre disponível a ajudar. Agradeço pelas várias leituras e correções desta dissertação e pelas muitas sugestões.

À amiga Alcione Arruda da Silva que se disponibilizou a me acompanhar na minha primeira coleta de abelhas em Camaçari-BA. Amiga de todas as horas.

Agradeço especialmente aos amigos que me auxiliaram dando palpites e contribuições: Soraya Mattos Vasconcelos, fazendo correções e leituras: Ana Paula Soraggi Campos Lobato e Rosana de Cássia Oliveira, fazendo a configuração final no computador: Marcos Teixeira Marcolino, abrindo *eppendorfs*, fazendo reações, ajudando nas extrações: Alcione da Silva Arruda e Ana Paula Soraggi.

Ao amigo Maurício Machaim que fez considerações importantes na finalização deste trabalho e me ensinou a olhá-lo com mais otimismo.

À prof. Dra. Ana Maria Bonetti por ceder amostras que foram cruciais para a realização deste trabalho. Agradeço também pelas sugestões e disponibilidade.

Ao Dr. Luíz Ricardo Goulart Filho pela disponibilidade e valiosas sugestões na elaboração deste trabalho.

Ao professor Dr. Rodolpho Satrapa pela disposição e gentileza em participar da banca de defesa.

Aos demais amigos do laboratório que ajudam a fazer deste laboratório um lar: Vânia Alves Nascimento, Cristiano Fernandes, Maria Alice, Alexandre Colleto, Carlos Gustavo, Vanessa Spini, Tininha, Cristina Lima, Guilherme, Francisco Raimundo da Silva, Juliano, Carlos, Flávia, Brunno, Gerson Fraissat, Marlene e Cida.

Kleber por me ensinar a trabalhar com o Sequenciador e por todo o tempo disponível e paciência.

Ao meliponicultor Rogério que auxiliou na coleta e cedeu amostras de abelhas usadas neste trabalho.

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO   | 1  |
| 1.1. A espécie <i>Melipona scutellaris</i>                              | 3  |
| 1.2. Sistema de determinação sexual e monoginia em <i>M.scutellaris</i> | 7  |
| 1.3. Marcadores moleculares   | 10 |
| 1.4. Marcadores microsátélites  | 16 |
| 2. OBJETIVO   | 17 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS   | 19 |
| 3.1 Material biológico  | 20 |
| 3.2 Extração de DNA   | 23 |
| 3.3 Amplificação dos microsátélites                                     | 25 |
| 3.4 Análise dos dados   | 25 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO   | 40 |
| 5. CONCLUSÃO  | 41 |
| 6. RESUMO   | 42 |
| 7. SUMMARY  | 43 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS   | 48 |
| 9. ÍNDICE REMISSIVO   |    |

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

- Tabela 1:** Número de indivíduos amostrados em cada colônia de *M. scutellaris* e sua localização 18
- Tabela 2:** Sequência dos *primers* para cada *locus* microsatélite, tamanho dos fragmentos (pb) e origem dos *loci* 21
- Tabela 3:** Condições de temperatura usadas na amplificação dos microsatélites em *Melipona scutellaris* 22
- Tabela 4:** Temperatura de anelamento para os sete *primers* utilizados na amplificação dos microsatélites em *Melipona scutellaris* em comparação com *Melipona bicolor* 26
- Tabela 5:** Tamanho dos fragmentos amplificados em *M. scutellaris*, comparado aos obtidos por PETERS *et al.* (1998) para *M. bicolor* nas oito colônias estudadas 29
- Tabela 6:** Tamanho dos fragmentos amplificados, número de alelos e heterozigosidade em *M. scutellaris*, nas colônias de Uberlândia e nas colônias da Bahia 31
- Tabela 7:** Alelos encontrados para cada *locus* analisado e suas frequências alélicas totais obtidas das oito colônias de *Melipona scutellaris* 33
- Tabela 8:** Tamanho dos alelos (pb) das rainhas e sua prole, e tamanhos prováveis dos alelos dos machos que acasalaram com essas rainhas 35



**Figura 1:** Estrutura interna do ninho de *Melipona scutellaris* 3

**Figura 2:** Eletroforese em gel de agarose 2,5% dos produtos amplificados do locus Mbi213 em *Melipona scutellaris* 27

**Figura 3:** Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% desnaturante para o locus Mbi 13 na colônia 1 de *M. scutellaris* por análise no Sequenciador Automático ALFExpress II (Pharmacia) 28

## LISTA DE ABREVIATURAS

% - porcentagem

$\mu$ l - microlitro(s)

$\mu$ M - micromolar

BA - Bahia

MG - Minas Gerais

DNA - ácido desoxirribonucléico

2n - diplóide

n - haplóide

MgCl<sub>2</sub> - cloreto de magnésio

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

h - hora(s)

M - molar

Min. - minuto(s)

ml - mililitro(s)

mM - milimolar

ng - nanograma(s)

nm - nanômetro

pb - pares de base

pmol - picomol

rpm - rotação por minuto

NaCl - cloreto de sódio

°C - grau Celsius

P - probabilidade

PCR - reação em cadeia da polimerase

RFLP - polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição

SET - tampão tris sódio EDTA

*Taq* – enzima DNA polimerase de *Thermus aquaticus*

TE – tampão Tris-EDTA

UV - ultra-violeta

V - volts

mA - miliamper

W – watts

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 A espécie *Melipona scutellaris*

As abelhas são parte integrante da biodiversidade mundial. São responsáveis por 40 a 90% da polinização da flora nativa tropical brasileira, de acordo com o ecossistema de que fazem parte (KERR *et al.*, 1996). Há cerca de 20.000 espécies de abelhas diferentes no planeta, variando em tamanho, forma e hábitos de vida (VELTHUIS, 1997). Dentre todas, as abelhas sem ferrão juntamente com as melíferas atingem o mais alto grau de evolução social (KERR, 1972; VELTHUIS, 1997).

Entre as abelhas sociais, os meliponíneos ou abelhas sem ferrão formam um grupo importante, rico em espécies e variações comportamentais (VELTHUIS, 1997) além de constituírem um grupo muito isolado e especializado. O isolamento e especialização dos mesmos parece ser, em grande parte, decorrente de peculiaridades de seu comportamento (KERR *et al.*, 1996).

Recentemente, essas abelhas encontram-se espalhadas desde o Rio Grande do Sul até o Centro do México, além de África, Índia, Malásia e Austrália (KERR *et al.*, 1996).

Os meliponíneos diferem dos apíneos, abelhas com ferrão, por serem mais especializados e dependentes de características climáticas e florísticas de suas regiões de origem, além de serem menos defensivos e de fácil manejo (KERR *et al.*, 1996). Também possuem características particulares que os distinguem de outras abelhas, como a atrofia do ferrão, redução e fragilidade da venação alar e ausência de pêlos nos olhos, com exceção da *Trichotrigona extranea* (MOURE, 1961).

Um aspecto importante da biologia dos meliponíneos é a determinação de castas que ocorre pela combinação dos alelos dos genes determinantes de casta:  $X^a_1$  e  $X^a_2$ . Cada um deles possui dois alelos  $X^a_1$  e  $X^a_2$ ,  $X^b_1$ ,  $X^b_2$ . As larvas duplo heterozigotas são rainhas e as que estão em homozigose, em qualquer um dos dois alelos ou em ambos, são operárias. Em *M. scutellaris* os alvéolos de cria são todos do mesmo tamanho e, tanto operárias como rainhas, recebem a mesma quantidade de alimento (KERR, 1972).

Os meliponíneos são, particularmente, sensíveis à endogamia. Ocasionalmente, aparecem machos diplóides (duplo heterozigoto para os alelos sexuais) na colônia, considerados “estéreis”. A diminuição do número de alelos sexuais *xo* pode promover a ocorrência desses machos diplóides. Em algumas espécies de abelhas esses machos são eliminados pelas operárias que, também podem eliminar a rainha, podendo levar a colônia à morte. (KERR e VENCOVSKY, 1982).

Mais de 60% das espécies de meliponíneos estão nas florestas tropicais, o que torna evidente sua grande importância como polinizadores de muitas espécies frutíferas e como conseqüência, afetando, diretamente, a manutenção da fauna dependente dessas espécies. Isso mantém a estrutura e perenização das florestas. Além de sua importância como agentes polinizadores, há ainda sua importância na produção de mel e pólen. O mel e o pólen são fontes geradoras de renda para muitas famílias, principalmente no Norte e Nordeste do país e ainda são utilizados na elaboração de produtos medicinais (KERR, 1998).

Diante da grande importância atribuída aos meliponíneos, torna-se evidente a necessidade de conhecer sua biologia, dominar a criação e a

multiplicação racional de colônias a fim de evitar sua extinção e, conseqüentemente, a de várias espécies vegetais (KERR *et al.*, 1999).

A urucu do Nordeste, assim como é conhecida popularmente a abelha sem ferrão *Melipona scutellaris*, está entre uma das mais de 300 espécies do grupo dos meliponíneos. Este grupo é constituído de 54 gêneros, dos quais dois são fósseis (KERR *et al.*, 1996).

Tem distribuição geográfica desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Norte, ocupando, principalmente, o bioma chamado de Zona da Mata (CARVALHO, 1996). As abelhas dessa espécie geralmente nidificam em ocos de árvores com até 40m de altura. Dentro desses ninhos (Figura 1) as operárias constroem favos de cria em forma de placas horizontais, com células de cria que se abrem para cima, a fim de que a rainha possa ovipositar. Essas placas são separadas por cera. O mel e o pólen são armazenados em potes de cera ovalados (KERR *et al.*, 1996).

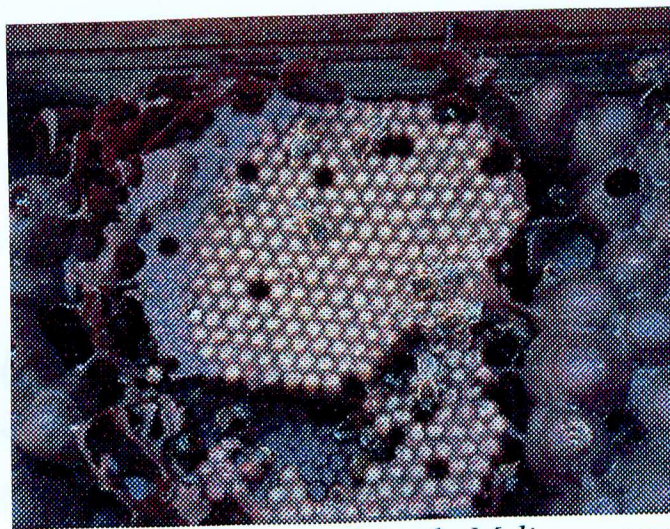


Figura 1: Estrutura interna do ninho de *Melipona scutellaris*

## 1.2 Sistema de determinação sexual e monoginia em *Melipona scutellaris*

O sistema de determinação sexual das abelhas é haplodiplóide no qual as fêmeas originam-se de ovos fecundados (número “2n” de cromossomos) sendo, portanto, diplóides e os machos, haplóides, originam-se de ovos não fecundados por meio de partenogênese arrenótoca, também chamada “haploidia masculina” ou “haplodiploidia” (KERR, 1972).

Em todos os himenópteros panmíticos em que a fêmea se acasale com um só macho, todas as operárias irmãs possuem  $\frac{3}{4}$  de genes idênticos, ao invés de  $\frac{1}{2}$  em organismos haplóides, o que favorece atos altruístas entre elas. Atos altruístas definidos como danos para o próprio organismo em benefício de outros indivíduos são comuns entre abelhas sociais e é uma característica limitada ao sexo feminino. Genes induzindo algumas peculiaridades em seus portadores serão selecionados positivamente se o receptor do altruísmo é bastante próximo à ele, assim seus genes usufruem do benefício (HAMILTON, 1964).

A maioria dos casos de altruísmo ocorre nos himenópteros devido à alta frequência de cuidado parental. Os provedores desse cuidado geralmente são fêmeas. Assim, um gene pode produzir cópias dele mesmo pela descendência familiar, aumentando o *fitness* de seus descendentes (*fitness* direto) ou aumentando o *fitness* de parentes que compartilham cópias do gene (*fitness* indireto) por meio do cuidado parental (QUELLER e STRASSMANN, 1998).

A grande relação de parentesco entre operárias irmãs ocorre pelo fato dos machos contribuírem com todo o seu genoma para cada operária, filha de sua prole contrário do que ocorre em organismos diplodiplóides.

Em colônias onde há múltiplos acasalamentos, como o que ocorre com *Apis mellifera* cuja rainha pode ser fecundada por 8 a 17 machos (KERR *et al.*, 1996) e em colônias com mais de uma rainha, como em

*Melipona bicolor*, ocorre diminuição da relação de parentesco entre as operárias (BLOWS e SCHWARZ, 1991) mas um aumento na variabilidade genética da colônia.

A haplodiploidia, típica de himenópteros, reduz a quantidade de variação genética em uma população e é favorecida pela seleção natural, pois genes deletérios recessivos são sempre eliminados quando presente em machos (ROUBIK, 1989).

A existência de poliandria, acasalamento da rainha com vários machos, em abelhas sem ferrão ainda é um assunto amplamente discutido entre os pesquisadores. Segundo PAGE e KERR (1990) a estrutura genética da colônia é amplamente influenciada pela poliandria. Com base em observações e dissecação da espermateca com contagem de espermatozoides KERR *et al.* (1962) e PAGE e KERR (1990) concluíram que rainhas de *Melipona* são monândricas, inseminadas apenas uma vez.

A poliandria proporciona uma maior diversidade genotípica e, conseqüentemente, favorece maior resistência genética à patógenos e parasitas, além de provocar um aumento no *fitness* da colônia. O alto grau de poliandria causa uma larga variância intracolônial, podendo causar diferenças no comportamento de grupos de abelhas e colônias (MORITZ *et al.*, 1991).

No modelo proposto por SHERMAN *et al.* 1988 (*apud* PAGE e KERR, 1990) a poliandria nos Himenópteros sociais desenvolveu-se em resposta à necessidade de diversidade fenotípica para proporcionar um maior nível de resistência. Segundo PAXTON *et al.* (1999) esse mecanismo, em menor grau, também existe entre os meliponíneos. Assim acasalamentos múltiplos constituem um fator adaptativo, pois além das colônias tornarem-se mais tolerantes à mudanças ambientais e à patógenos, eles podem



diminuir a possibilidade da rainha acasalar com um macho que possua o mesmo alelo sexual que ela (OLDROYD *et al.*, 1995).

As observações diretas dos comportamentos de acasalamento em abelhas são difíceis de serem realizadas porque os mesmos ocorrem fora da colônia. O cruzamento entre rainha e macho, naturalmente, ocorre com a saída da rainha da colônia em vôos nupciais, em diferentes distâncias (dependendo da espécie) tornando-se difícil fazer observações diretas do controle parental (CAMARGO, 1972). Por isso, análises genéticas são fundamentais para verificar a existência de poliandria em abelhas sociais (IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 1998).

KERR *et al.* (1962) relataram que durante o acasalamento dos meliponíneos os machos perdem sua genitália, podendo inseminar apenas uma fêmea e que rainhas virgens fazem apenas um único vôo de acasalamento. Como as rainhas retornavam de seu vôo nupcial com a genitália do macho presa a sua, concluiu-se que ela havia acasalado com apenas um macho. Observações comportamentais, dissecação da genitália (comparação do volume de espermatozoides ejaculado por um único macho, com o volume encontrado no oviduto da rainha após seu retorno do vôo nupcial) e razão de segregação a partir da análise da progênie levaram os autores à conclusão de que os meliponíneos são monândricos.

Portanto, até a década de 80 acreditava-se que as rainhas dos meliponíneos acasalassem com apenas um macho. Entretanto, o trabalho pioneiro de FALCÃO e CONTEL (1982) indicou claramente que ao redor de 13% dos acasalamentos de *Plebeia droryana* Friese, davam-se com dois machos.

A relação entre os indivíduos em uma colônia também torna-se um fator bastante intrigante. Em alguns organismos esta relação pode não ser

um problema mas em abelhas, onde a contribuição entre todos os indivíduos para a diversidade genética e estrutural é crucial, o conhecimento dessa relação torna-se imprescindível (HAIG, 1998).

Para estudos envolvendo parentesco deve-se levar em consideração dois diferentes níveis de resolução dependendo do tipo do marcador utilizado e a espécie de abelha em questão: exclusão ou designação de parentesco. Exclusão de parentesco de uma prole ocorre quando esta possui marcadores genéticos ausentes nos possíveis parentes analisados respondendo assim, se pode ou não haver parentesco entre eles. A designação de parentesco por sua vez, requer um nível de resolução maior, envolvendo a identificação de dois parentes do indivíduo em estudo, excluindo todos os outros possíveis parentes. Nesse caso toda a população deve ser amostrada (PARKER *et al.*, 1998) o que torna o estudo mais difícil, visto que nem sempre é possível obter todos os indivíduos na população.

Variáveis números de acasalamentos e de rainhas em uma colônia geram diferenças na relação entre seus indivíduos, bem como nas especializações das fêmeas e machos (QUELLER e STRASSMANN, 1998). A obtenção de informações genéticas podem indicar quais indivíduos estão se reproduzindo, possibilitando distinguir a progênie de diferentes pais. Portanto, estudos de parentesco são importantes em várias áreas da ecologia comportamental de abelhas, assim como para o estudo evolutivo, dinâmica de grupos e para a criação de colônias melhoradas.

### 1.3 Marcadores moleculares

Técnicas genéticas moleculares representam um poderoso instrumento para o estudo da biologia, ecologia e genética populacional de insetos.

Na década de 60 eram utilizados marcadores morfológicos associados a alguma característica de importância econômica e de fácil identificação visual. A revolução nesse quadro iniciou-se com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos usados em uma grande variedade de estudos de genética de populações. Por ser uma técnica relativamente barata e tecnicamente acessível, as isoenzimas continuam sendo marcadores muito úteis para análises genéticas que não requeiram uma ampla amostragem do genoma (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

Marcadores aloenzimáticos também têm sido usados em estudos de parentesco genético em insetos sociais (QUELLER *et al.*, 1993). CONTEL e MESTRINER (1974) foram os primeiros a publicar dados sobre a variabilidade alozímica em meliponíneos, entretanto, a baixa variabilidade genética fez com que essa técnica se tornasse imprópria para avaliação de parentesco ou determinação da relação intragrupo (STRASSMANN *et al.*, 1996). Por esta técnica não permitir uma cobertura completa de todo o genoma devido ao número restrito de *loci* que podem ser detectados, áreas de estudo com esses marcadores são limitadas. Os *loci* alozímicos polimórficos variam entre espécies mas, geralmente, são mais polimórficos em plantas do que em animais (PARKER *et al.*, 1998). Trabalhos com alozimas em *Parachartergus colobopterus* (STRASSMANN *et al.*, 1991 *apud* CHOUDHARY *et al.*, 1993) mostraram pouca variabilidade, típica de himenópteros haplodiplóides.

Para estudos envolvendo parentesco, uma variedade de marcadores genéticos têm sido usados: alozimas, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) minisatélites e outros. Entretanto, QUELLER *et al.* (1993) ressaltam que nenhum desses marcadores é ideal para esse tipo de análise.

Na década de 80, Kary Mullis desenvolveu a técnica da *Polymerase Chain Reaction* (PCR). A facilidade, rapidez e sensibilidade da PCR tornou-a um instrumento para estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

Com base na PCR várias técnicas foram desenvolvidas, como AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) RNA *display*, VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) que são instrumentos importantes para estudos de genética populacional, estudos evolutivos e outros.

Marcadores RFLPs podem ser usados para estabelecer parentesco entre indivíduos, mas essa técnica possui algumas limitações como: bibliotecas de sondas adequadas que hibridam com o DNA, alto custo e a necessidade de DNA de alta qualidade (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

Marcadores minisatélites também podem ser utilizados como eficientes marcadores para exclusão de paternidade, pois podem projetar múltiplos *loci* simultaneamente e são altamente polimórficos.

Uma outra técnica usada para a exclusão de parentesco pode ser o DNA *fingerprinting*, entretanto ela não é apropriada para grandes grupos. Além disso, esta técnica requer uma melhor qualidade do DNA (STRASSMANN *et al.*, 1996). Ela proporciona mais informações por gel

porém, de menor qualidade, pois *loci* individuais não podem ser identificados, dificultando comparações (CHOUDHARY *et al.*, 1993). Problemas para comparar bandas entre géis, tornam esta técnica difícil para encontrar os pais em um amplo conjunto de candidatos.

A aplicação destas técnicas moleculares (RFLP, Isoenzimas, DNA *fingerprinting*, minisatélites) proporciona novas oportunidades para resolver questões fundamentais, improváveis de serem respondidas por observações diretas. Entretanto, QUELLER *et al.* (1993) relatam que os marcadores microsatélites são ideais para análises que requeiram a determinação da relação de parentesco dentro da colônia.

#### 1.4 Marcadores microsatélites

Segundo PARKER *et al.* (1998) a mais eficiente técnica descrita para exclusão de parentesco é a técnica de marcadores microsatélites, os quais estimam o número de acasalamentos e a relação de parentesco dentro da colônia e envolve um único *locus* polimórfico de marcadores baseados na PCR.

Uma considerável proporção do genoma é composta de sequências denominadas satélites. Regiões satélites são compostas de repetições sucessivas de sequências curtas denominadas “motivos”.

O termo DNA satélite refere-se ao ácido nucléico recuperado com uma densidade específica, diferente da composição média do DNA observada em gradientes de densidade de cloreto de cério (KIT, 1961 *apud* HAYMER, 1994 e PARKER *et al.*, 1998). Esta banda satélite seria resultado da composição na sequência de nucleotídeos. Estudos posteriores mostraram que essas bandas satélites eram compostas de sequências

altamente repetidas de DNA, que se concentravam nas regiões heterocromáticas ou centroméricas dos cromossomos (HAYMER, 1994 e PARKER *et al.*, 1998).

Regiões satélites DNA, também chamadas de VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) são divididas segundo seu comprimento, em regiões minisatélites e microsatélites (TOONEN, 1997 e PARKER *et al.*, 1998). Regiões de unidades repetidas, por volta de 65 pares de base, são conhecidas como minisatélites e estão espalhadas por todo o genoma. Regiões ainda menores, de unidades repetidas em *tandem* de um curto segmento de nucleotídeo de 1 a 6 pares de base, que raramente excedem 200 pares de base no comprimento total, são conhecidas como microsatélites (QUELLER *et al.*, 1993; TOONEN, 1997). Por exemplo, um *locus* microsatélite é uma extensão de DNA com a sequência CA repetida 17 vezes em sucessão (CA)<sub>17</sub> (QUELLER *et al.*, 1993). As unidades microsatélites podem ser repetidas de 8 a 60 vezes, embora esses números possam variar em percursos longos. Esse DNA repetido representa um grande reservatório de variação genética e nenhuma função conhecida está associada com estes tipos de sequências (QUELLER *et al.*, 1993).

Os primeiros microsatélites foram identificados a partir de análises de dados de sequências de genes clonados, assim como actina e mioglobina (ARMOUR e JEFFREYS 1992 *apud* QUELLER *et al.*, 1993).

*Locus* microsatélites são amplamente distribuídos em genomas eucariotos mas também podem ocorrer em procariotos, embora com menor frequência (SCHLÖTTERER, 1998).

Os marcadores microsatélites possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo. A ocorrência de mutações nas regiões microsatélites variam em níveis de  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$  (DIETRICK *et al.*, 1992 e

EDUARDES *et al.*, 1992, *apud* CHOUDHARY *et al.*, 1993). Possuem também uma expressão codominante, com ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto sendo visualizados, multialélicos e muito frequentes (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

Microsatélites podem também ser designados de SSR - *Simple Sequence Repeats*- ou STR - *Simple Tandem Repeats* (HUGHES e QUELLER, 1993) ou ainda SSLPs - *Simple Sequence Length Polymorphisms* (CHOUDHARY *et al.*, 1993).

As regiões microsatélites podem ser conservadas em espécies relacionadas tornando viável a transferência de marcadores entre elas ou até entre gêneros (MOORE *et al.*, 1991 *apud* FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996) ou ainda, entre espécies congênicas (TOONEN, 1997). Pesquisadores iniciaram seus estudos em novas espécies utilizando *primers* desenvolvidos para outras espécies proximamente relacionadas (PARKER *et al.*, 1998). Por exemplo, de 48 *primers* específicos e polimórficos identificados em bovinos, 20 eram variáveis em caprinos e nenhum era variável em equinos (STRASSMANN *et al.*, 1996). Assim, *primers* já avaliados para algumas espécies podem ser utilizados na análise de outras. Além disso, estudos revelaram que um pequeno número de marcadores microsatélites são requeridos em análises moleculares de parentesco (QUELLER *et al.*, 1993).

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos com marcadores microsatélites em abelhas. OLDROYD *et al.* (1995) observou que a rainha de *A. florea* acasalou com, no mínimo, cinco machos e, provavelmente, com vários mais, por meio da análise de cinco *loci* microsatélites em cinco colônias.

Análises, também usando esses marcadores, demonstraram que a rainha de *A. andreniformis* acasalou com cerca de 10 a 20 machos, similar à *A. mellifera*. Neste trabalho foram utilizados 11 *loci* microsatélite de *A. mellifera* e *Bombus terrestris*. Desses *loci*, 6 não foram suficientemente conservados para amplificação pela reação da PCR em *A. andreniformis*. Cinco desses *primers* amplificaram mas, apenas 4 evidenciaram variação alélica (OLDROYD *et al.*, 1997).

Em meliponíneos, PAXTON *et al.* (1999) observaram a frequência de acasalamentos em *Melipona beecheii* e *Scaptotrigona postica* analisando 7 *loci* microsatélites em 10 colônias de *M. beecheii* e 7 colônias de *Scaptotrigona postica*. Encontraram de 1 a 3 machos para *M. beecheii* e 1 a 6 para *S. postica*, representando o primeiro documentário de poliandria em meliponíneos com marcadores microsatélites.

PETERS *et al.* (1998) desenvolveram 25 pares de *primers* microsatélites para *Melipona bicolor*. Estes *loci* representam os primeiros marcadores microsatélites para abelhas sem ferrão e sugerem que estes marcadores possam ser usados em vários gêneros dos meliponíneos.

Os microsatélites requerem apenas a técnica de PCR e pouco tecido do organismo, ao contrário da maioria dos outros métodos (CHOUDHARY *et al.*, 1993). Também permite a análise de amostras degradadas, em que o DNA genômico pode ter passado por alguma agressão ambiental (TOONEN, 1997). A pequena quantidade de DNA requerido para análise de microsatélites tornou-se uma grande vantagem para pesquisadores que estudam pequenos organismos ou que visam a sobrevivência do organismo após a retirada do tecido (STRASSMANN *et al.*, 1996). Essa técnica pode ser usada sem qualquer conhecimento prévio da sequência particular de DNA ou de genes do organismo de interesse (HAYMER, 1994).



Eles diferem no número de unidades repetidas (HUGHES e QUELLER, 1993) são mais facilmente encontradas repetições diméricas, seguidas das triméricas. A abundância de repetições é inversamente proporcional ao comprimento da repetição, assim, quanto maior o comprimento da repetição, menos abundante ela é no genoma (HUGHES e QUELLER, 1993). O maior problema com dinucleotídeos repetidos é a ocorrência de bandas inespecíficas (ou expúrias) enquanto que com trinucleotídeos e tetranucleotídeos repetidos, há menor tendência para gerar tais bandas (SCHLÖTTERER, 1998). Geralmente os dinucleotídeos repetidos são mais variáveis que os trinucleotídeos, embora tenham sido encontrados *loci* trinucleotídeos altamente variáveis em humanos (EDUARDES *et al.*, 1991 *apud* CHOUDHARDY *et al.*, 1993) o que também foi observado em vespas sociais, como em *Polistes annularis* (CHOUDHARY *et al.*, 1993).

Marcadores microsatélites são ideais para mapeamento genético de genomas, devido a sua distribuição por todo o genoma (SCHLÖTTERER, 1998) identificação e discriminação de genótipos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996) estudos de genética de populações, designação de parentesco ou determinação da relação dentro do grupo (STRASSMANN *et al.*, 1996).

Outra vantagem que este marcador apresenta é a obtenção de informação a partir de *locus* individual, o que, conseqüentemente, facilita o cálculo de frequências alélicas (PARKER *et al.*, 1998).

Atualmente, a técnica de marcadores microsatélites tornou-se uma poderosa ferramenta para determinar o número de pais e a relação de parentesco dentro da colônia (BEYE *et al.*, 1998). Esta técnica usa o método de amplificação de fragmentos via PCR para produzir milhares de

cópias de segmentos particulares de DNA, a partir de um par de *primers* específicos.

## 2 - OBJETIVO

Verificar, por meio de marcadores hipervariáveis microsatélites, se, como em várias espécies de meliponíneos, apenas um único macho copula com a rainha de *Melipona scutellaris*.

### 3 - MATERIAL E METÓDOS

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética do Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB) da Universidade Federal de Uberlândia.

#### 3.1 Material Biológico

Amostras constituíram-se de operárias adultas coletadas de oito colônias de abelha *Melipona scutellaris*, quatro do Meliponário Uberlândia, situado em Uberlândia-Minas Gerais e quatro da região de Salvador-Bahia, provenientes do Meliponário Eymba Acuay.

As primeiras colônias que originaram o Meliponário Uberlândia vieram da região de Lençóis-BA (região da Chapada Diamantina). Em março de 1987 foram trazidas para Uberlândia 14 colônias. Outras 8 colônias foram trazidas também de Lençóis-BA para Uberlândia-MG, em 1990.

A partir dessas 22 colônias foram feitas várias divisões pelo método proposto por KERR *et al.* (1996) formando a população atual do Meliponário Uberlândia. A escolha da Chapada Diamantina deu-se devido à sua alta altitude e temperatura mais baixa, o que facilitou a adaptação das colônias ao clima de Uberlândia (CARVALHO, 1996).

Depois de formado o Meliponário Uberlândia, várias rainhas foram introduzidas e novas colônias foram trazidas: em 1992 foram introduzidas 13 rainhas fisogástricas trazidas de Lençóis; em 1993 foram trazidas três rainhas de Catu-BA; em 1994 mais 11 rainhas de Lençóis; em 1995 foram

trazidas 3 colônias de Lençóis e em 2000, mais 8 colônias de Alagoinhas-BA.

Foram coletadas amostras de três colônias de *M. scutellaris* do Meliponário Uberlândia e de uma colônia situada no campus da Universidade Federal de Uberlândia (Bloco 2E) usada como caixa de observação. As outras três amostras de colônias foram trazidas de Alagoinhas-BA e uma amostra foi trazida de Camaçari-BA, situadas no Meliponário Eymba Acuay (Tabela 1).

Tabela 1: Número de indivíduos amostrados em cada colônia de *Melipona scutellaris* e sua localização.

| Identidade da Colônia | Origem das amostras | Número de indivíduos amostrados |
|-----------------------|---------------------|---------------------------------|
| 1                     | Uberlândia-MG       | 21 (4 M + 17 O)                 |
| 2 (CO)                | Uberlândia-MG       | 23 (11 M+11 O)                  |
| 3                     | Uberlândia-MG       | 30(1 RF+29 O)                   |
| 4                     | Uberlândia-MG       | 30(1 RF + 29 O)                 |
| 5                     | Alagoinhas-BA       | 38(1 RF + 15 M + 22 O)          |
| 6                     | Camaçari-BA         | 34(1 RF + 04 M + 29 O)          |
| 7                     | Alagoinhas-BA       | 34(1 RF + 33 O)                 |
| 8                     | Alagoinhas-BA       | 35(1 RF +34 O)                  |

M – macho

O – operária

RF – rainha fisogástrica

CO – caixa de observação

Apenas nas colônias 1 e 2 não foram amostradas as rainhas fisogástricas.

O número de indivíduos amostrados foi baseado em alguns trabalhos já descritos. OLDROYD *et al.* (1995) analisaram cinco colônias de *A. florea* com, respectivamente, 71, 24, 24, 24 e 23 indivíduos de cada colônia. PAXTON *et al.* (1999) analisaram 10 colônias de *M. beecheii* com número de operárias variando de oito a 12 em cada colônia e em *S. postica* analisaram sete colônias, com seis a 38 indivíduos por colônia.

As rainhas fisogástricas das duas colônias do Meliponário Uberlândia foram marcadas no tórax para confirmar que os favos amostrados eram cria da mesma rainha. Após 30 dias da marcação da rainha fisogástrica um a dois favos de cria nascente foram coletados e mantidos em estufa a 30°C no Laboratório de Genética da Universidade Federal de Uberlândia, até a desoperculação das células e emergência das operárias. Nas duas outras colônias do Meliponário Uberlândia foram coletados apenas os favos de cria. Assim que as operárias nasciam, eram coletadas e mortas imediatamente por congelamento a -80°C, onde permaneciam até a extração do DNA. Em seis das oito colônias a rainha fisogástrica também foi coletada manualmente e transferida, imediatamente, para um tubo de vidro contendo álcool comercial, o qual foi mantido em freezer a -80°C. Nas amostras trazidas da Bahia o mesmo procedimento foi utilizado na coleta da rainha e incubação dos favos de cria nas colônias. Este tipo de amostragem foi utilizada a fim de se evitar riscos de coletas de abelhas que não fossem filhas da rainha marcada.

### 3.2 Extração de DNA

O DNA foi extraído do tórax de cada abelha adulta pelo protocolo de PAXTON *et al.* (1996). Colocou-se 1 tórax de abelha em 1 *ependorf*

de 1,5 ml e adicionou-se nitrogênio líquido por 5 minutos. Macerou-se o tórax com bastão e adicionou-se 500 µl de tampão SET (NaCl 0,15M, Tris 0,02M, EDTA 1mM pH 8) mais 18µl de proteinase K (10mg/ml) e 22µl de SDS (25%). Incubou-se a 55°C por 2 horas. Adicionou-se 430 µl de NaCl 5M e centrifugou-se por 10 minutos a 19.100g. Transferiu-se o sobrenadante (cerca de 700 µl) para novo tubo *ependorf* de 1,5 ml. Adicionou-se 215µl de Tris-HCl (0,01M pH 8,0). Completou-se o volume do tubo (300 µl) com etanol 100% (gelado -20°C). As amostras foram incubadas no freezer a -20°C (overnight). Centrifugou-se por 15 minutos a 13.700g e retirou-se o etanol, adicionando-se 500µl de etanol 70% (gelado -20°) ao *pellet*. Ao retirar o excesso de sais, descartou-se o etanol cuidadosamente e o *pellet* foi seco à vácuo ou estufa (37°C). O *pellet* foi ressuspensionado em 100µl de TE (Tris 1mM e EDTA) e estocado a -20°C.

### 3.3 Amplificação dos microsatélites

Amplificações dos *loci* microsatélites pela reação em cadeia da polimerase (PCR) foram feitas usando-se 10 pares de *primers*, sendo dois pares de *primers* de *A. mellifera* desenvolvidos por ESTOUP *et al.*, (1994) e oito pares de *primers* de *M. bicolor* desenvolvidos por PETERS *et al.* (1998). Os *primers* foram marcados com fluorescência Cy5 (Macromolecular Resources) para uso em sistema de eletroforese de DNA Automático ALFExpress II (Amersham Pharmacia Biotech). A sequência dos *primers*, o tamanho dos fragmentos e origem de cada *locus* podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2: Sequência dos *primers* para cada *locus* microsatélite, tamanho dos fragmentos (pb) e origem.

| <i>Loci</i> | <i>Primers</i> (5' – 3')                        | Tamanho do fragmento (pb) | Origem dos <i>loci</i>  |
|-------------|---|---------------------------|-------------------------|
| A 76        | GCCAATACTCTCGAACAATCG<br>GTCCAATTCACATGTCGACATC | 247                       | <i>Apis mellifera</i>   |
| A 107       | CCGTGGGAGGTTTATTGTCG<br>GGTTCGTAACGGATGACACC    | 175                       | <i>Apis mellifera</i>   |
| Mbi11CAC    | CGTTCGTTCTTCCCAAT<br>GATCGAATTTAACC GGC         | 152                       | <i>Melipona bicolor</i> |
| Mbi13GAC    | CCCCTAACAGCCAAAGCTAT<br>CGATGCCCACTTTCGAC       | 129                       | <i>Melipona bicolor</i> |
| Mbi28AAG    | TTTTATCGCTCCTATCCTCC<br>AATCCAACAGGACGGTGT      | 108                       | <i>Melipona bicolor</i> |
| Mbi32GAG    | CTTTATCCGGTGC GTCGAA<br>GAAGGCATTCCGGGTTGTT     | 154                       | <i>Melipona bicolor</i> |
| Mbi88AAAGA  | GCCGCCGTACGTTCTGA<br>GCGCTCGAGCAGCGTT           | 94                        | <i>Melipona bicolor</i> |
| Mbi103AAT   | CCCCACAGTGTAACCAGAAAG<br>TTATGGTGATAAACGGCGAAG  | 175                       | <i>Melipona bicolor</i> |
| Mbi36GAG    | GCATCGGCGTCAGCCAG<br>GCGTGTCAGGCGGTGAAG         | 125                       | <i>Melipona bicolor</i> |
| Mbi213AAG   | CCCTCATCCCTTCGTTTCTT<br>CGTGACAGGAAGTCCGTCTAA   | 123                       | <i>Melipona bicolor</i> |

pb-pares de base

Todos os *loci* microsatélites foram clonados para *M. bicolor*, exceto A76 e A107, que foram clonados de *Apis mellifera*. As sequências desses *primers* foram publicados por PETERS *et al.* (1998) e ESTOUP *et al.* (1994) respectivamente.

A reações da PCR foram realizadas em um volume total de 15µl, sendo testadas quantidades variáveis de Magnésio (1,5 a 2,5 mM), *Taq* DNA polimerase (1 a 2U) dNTP (200 a 400µM), *primers* (4 a 10pmol) e DNA (10 a 80 ng).



Sendo os *primers* heterólogos, as condições de amplificação e as temperaturas de anelamento de cada *primer* foram otimizadas até se obter um resultado satisfatório para cada *locus*.

As condições de temperatura foram otimizadas a partir do protocolo de ESTOUP *et al.* (1994). As amostras foram amplificadas sob várias condições de temperatura para cada *locus* a fim de fornecer o melhor resultado (Tabela 3).

Tabela 3: Condições de temperatura usadas na amplificação dos microsatélites em *Melipona scutellaris*.

| Passos | Tempo          | Temperatura         | Etapas       |
|--------|----------------|---------------------|--------------|
| 1      | 3 min.         | 94°C                | Desnaturação |
| 2      | 35 seg.        | 94°C                | Desnaturação |
| 3      | 35 seg.        | TA do <i>primer</i> | Anelamento   |
| 4      | 60 seg.        | 72°C                | Extensão     |
| 5      | 2-4 (30 vezes) | -                   | -            |
| 6      | 10 min.        | 70°C                | Extensão     |
| 7      | 30 min.        | 4°C                 |              |

TA – Temperatura de anelamento.

Os fragmentos amplificados foram definidos em gel de agarose 2,5% para verificar se houve amplificação e estabelecer o volume do produto de PCR a ser usado no gel de poliacrilamida. Em seguida os produtos de PCR foram aplicados em gel de sequenciamento poliacrilamida desnaturante 6% (Amersham Pharmacia Biotech) utilizando marcadores internos de 200pb e um marcador externo de 50 a 500pb, ambos utilizados como padrão de referência.

Foram utilizados os 5fmol/ $\mu$ l de marcador interno de 200pb (Pharmacia) em cada amostra de DNA, 2 $\mu$ l de TE, 3  $\mu$ l de *Loading Dye* (Pharmacia) e 1,8  $\mu$ l de STOP (Pharmacia) para cada 1 $\mu$ l de DNA amplificado. O marcador externo, usado como referência do tamanho dos fragmentos, foi preparado com 1 $\mu$ l de marcador externo de 50 a 500pb, 2 $\mu$ l de TE e 2 $\mu$ l de *Loading Dye*.

Em seguida, as amostras foram desnaturadas por 3 minutos a 94°C e imediatamente colocadas em gelo até a aplicação.

Um volume total de 6  $\mu$ l de cada amostra foi dispensado no gel de poliacrilamida, procedendo-se a separação dos fragmentos nas seguintes condições: 1500V, 25mA, 40°C de temperatura, 60W de potência em 120 minutos de corrida. Os resultados foram analisados no software AlleLinks versão 1.01 (Pharmacia).

### 3.4 Análise dos dados

*Loci* microsatélites foram analisados amplificando-se a região alvo e separando-se os fragmentos em gel desnaturante de poliacrilamida. Esse gel permite a resolução dos alelos por diferença no tamanho dos fragmentos de até dois pares de base. Portanto, os alelos microsatélites foram definidos como fragmentos de tamanhos diferentes para o mesmo *locus*.

A análise dos dados foi feita baseando-se no genótipo da rainha. Quando a rainha é homozigota seu alelo está presente em todas as operárias e o alelo diferente do alelo da rainha é o alelo do macho. Quando a rainha é heterozigota, os alelos que forem diferentes dos alelos da mãe serão do pai (ESTOUP *et al.*, 1994). Portanto, os indivíduos foram amostrados para estimar a presença de alelos da rainha e operárias. O índice de

heterozigozidade foi estimado pela fórmula proposta por AYALA e KIGER (1984):

$$H = \frac{\text{número de heterozigotos}}{\text{número de indivíduos analisados}}$$

Também foram calculados a heterozigosidade e as frequências alélicas em cada *locus*.

#### 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 8 *loci* de *M. bicolor* e 2 *loci* de *A. mellifera* utilizados para a análise dos possíveis machos que copulam com a rainha de *M. scutellaris* 7 foram otimizados. Dois *primers* de *Apis mellifera* (A76 e A107) e um *primer* de *M. bicolor* (Mbi 103) apresentaram bandas inespecíficas detectadas em gel de agarose 2,5%, não permitindo identificar o *locus* de interesse.

Sete *loci* de *M. bicolor* produziram bandas fortes em *M. scutellaris* representando 87,5% de sucesso no uso de *primers* heterólogos. Ocorreram muitas bandas inespecíficas e várias bandas de pouca intensidade, dificultando a análise do *locus* de interesse. Isso pode ser um indício de que marcadores microsatélites são mais adequados entre grupos mais próximos do que entre subfamílias. MORITZ *et al.* (1995) também encontraram que *loci* microsatélites clonados de *A. mellifera* oferecem excelentes resultados quando amplificados pela PCR para revelar variabilidade intracolônial em *A. dorsata*. Os 7 pares de *primers* de *M. bicolor* com boa amplificação em *M. scutellaris* pela PCR sugerem uma grande homologia na seqüência de DNA entre essas espécies.

Otimizou-se o protocolo da reação de amplificação com diferentes quantidades de magnésio, dNTPs, *Taq* DNA polimerase, *primer* e DNA, além de diferentes temperaturas de anelamento, definindo-se como mais adequado:

- Tampão da enzima 1X (Pharmacia)
- 1U *Taq* DNA polimerase (Pharmacia)
- 5 pmol de *primers*
- 250  $\mu$ M de dNTP total

- 2 mM de MgCl<sub>2</sub>
- 50 ng de DNA genômico

Para melhorar a qualidade e uniformidade das amplificações, foi adicionado à reação 20µM de cloreto tetrametil amônia (TMAC) agente desnaturante comumente utilizado como um estabilizador das atividades enzimáticas. Esse reagente melhorou o padrão de bandas, facilitando a leitura dos perfis microsatélites.

O produto amplificado pela PCR foi visualizado em gel de agarose claramente, isto é, sem bandas inespecíficas, apresentando o tamanho semelhante ao esperado para *M. bicolor*. De acordo com cada *primer*, foram feitas variações na temperatura de anelamento de 50 à 62,5°C. A partir da temperatura inicial sugerida na literatura, as temperaturas de anelamento sofreram variações de até 8,5°C, a fim de eliminar bandas inespecíficas e permitir o melhor anelamento do *primer*. A temperatura ideal para cada *locus* foi estabelecida, a partir dos resultados visualizados em gel de agarose 2,5% (Tabela 4).

Tabela 4: Temperaturas de anelamento para os sete *primers* utilizados na amplificação dos microsatélites em *M. scutellaris* em comparação com *M. bicolor*.

| <i>Primers</i> | Temperatura de anelamento para <i>M. scutellaris</i> | Temperatura de anelamento de <i>M. bicolor</i> |
|----------------|--|--|
| Mbi 11         | 54°C   | 55°C   |
| Mbi 13         | 57°C   | 57,5°C   |
| Mbi 28         | 58°C   | 57,5°C   |
| Mbi 32         | 59,5°C   | 57,5°C   |
| Mbi 36         | 59°C   | 60°C   |
| Mbi 88         | 57°C   | 60°C   |
| Mbi 213        | 54°C   | 62,5°C   |

Na colônia 2 (caixa de observação) observou-se que todos os machos analisados eram heterozigotos, apresentaram dois alelos, indicando a presença de machos diplóides nesta colônia. A ocorrência de machos diplóides é consequência de acasalamentos endogâmicos, pelo fato dessa colônia estar isolada de todas as outras.

Um padrão de amplificação dos fragmentos em gel de agarose 2,5% pode ser visualizado na Figura 2 e dos fragmentos em gel de poliacrilamida 6% na Figura 3.

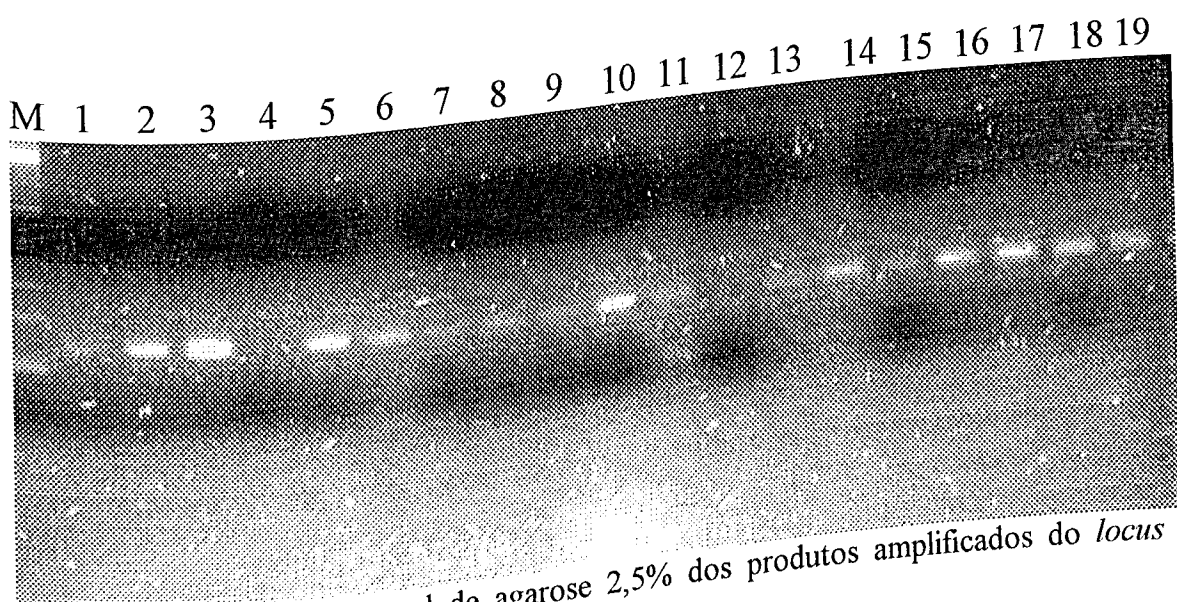
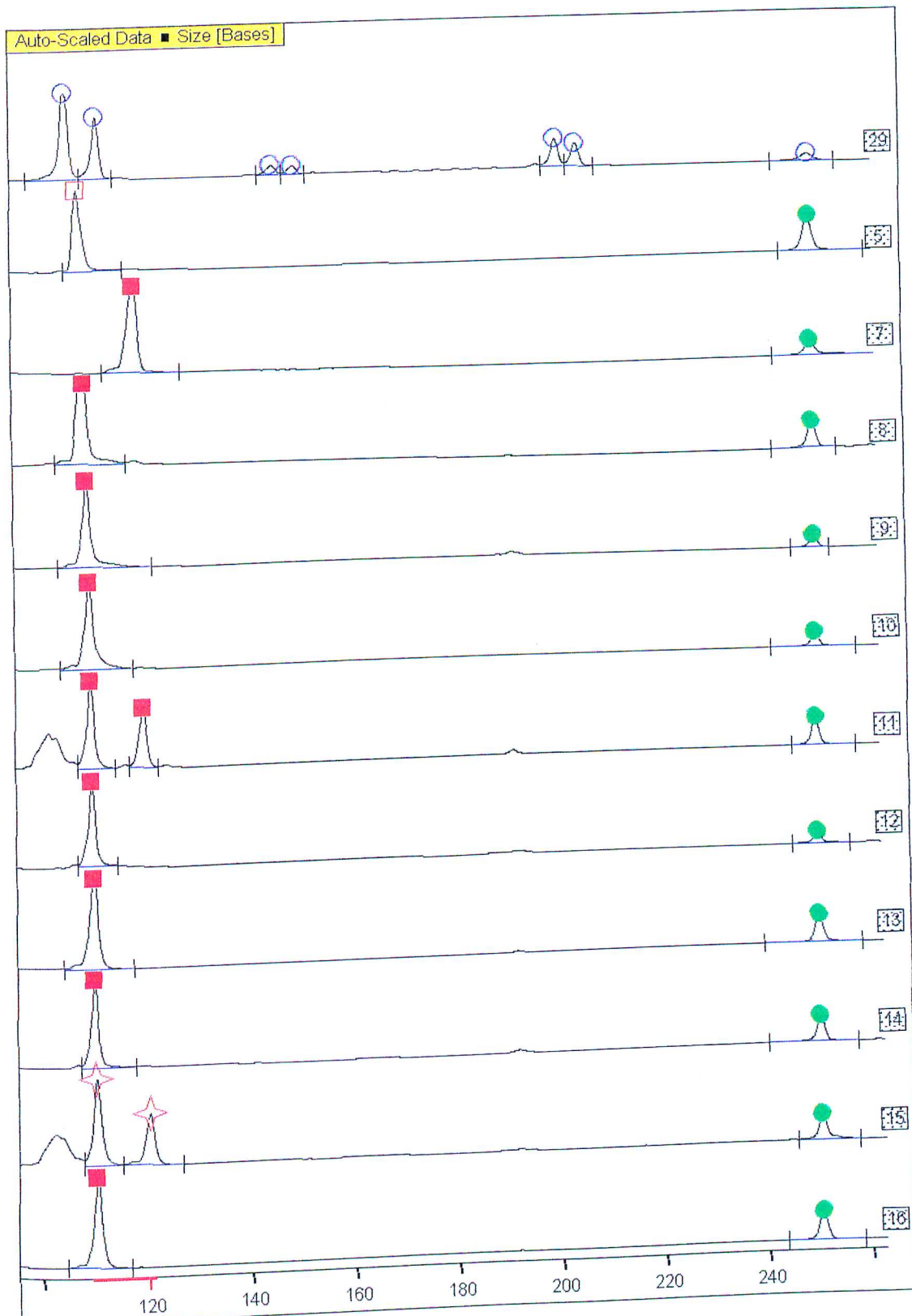


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 2,5% dos produtos amplificados do locus Mbi213 em *Melipona scutellaris*.

M – marcador de peso molecular de 100pb (Pharmacia).  
1 – rainha fisogástrica da colônia 3.  
2 ao 18 – operárias da colônia 3 (prole da rainha).



For research use only.

Figura 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% desnaturante para o locus Mbi 13 na colônia 1 de *M. scutellaris* por análise no Sequenciador Automático ALFExpress II (Pharmacia).  
 picos marcados em vermelho – alelos; picos verdes - marcadores internos; picos azuis - marcadores externos.

Alguns *loci*, como o Mbi 11, Mbi 13 e Mbi 32, apresentaram fragmentos menores que o tamanho dos fragmentos encontrados em *M. bicolor* (PETERS *et al.* 1998) enquanto outros, como os *loci* Mbi 28 e Mbi 32, apresentaram fragmentos maiores quando amplificados em *M. scutellaris*. Esse resultado era esperado, já que os *primers* são heterólogos e por isso podem estar amplificando regiões com seqüências diferentes em tamanho ou composição de bases entre as duas espécies, além disso esses *primers* amplificam regiões hipervariáveis entre espécies, com alta taxa de mutação. Foram calculados o número de alelos em cada *locus*, os tamanhos dos fragmentos amplificados e a heterozigidade para *M. scutellaris* comparando-se com *M. bicolor* (PETERS *et al.*, 1998) (Tabela 5).

Tabela 5: Tamanho dos fragmentos amplificados em *M. scutellaris*, comparado aos obtidos por PETERS *et al.* (1998) para *M. bicolor* nas oito colônias estudadas.

| <i>Loci</i> | Tamanho dos fragmentos (pb) observados em <i>M. scutellaris</i> (n° alelos) | Tamanho dos fragmentos (pb) obtidos para <i>M. bicolor</i> (n° alelos) |
|-------------|---|--|
| Mbi 11      | 128 137 140 (3)<br>H= 0,09  | 152 (5)<br>H= 0,63   |
| Mbi 13      | 111 120 (2)<br>H= 0,09  | 129 (4)<br>H= 0,88   |
| Mbi 28      | 113 116 119 122 127 130 (6)<br>H= 0,65                                      | 108 (3)<br>H= 0,25   |
| Mbi 32      | 125 129 (2)<br>H= 0,0   | 154 (4)<br>H=0,63  |
| Mbi 36      | 98 100 122 133(4)<br>H= 0,06  | 125 (5)<br>H=0,75  |
| Mbi 88      | 84 91 94 97 100 106 (6)<br>H= 0,58  | 94 (2)<br>H=0,25   |
| Mbi 213     | 119 129 132 135 (4)<br>H= 0,4   | 123 (6)<br>H= 0,75   |

( ) = número de alelos H = heterozigidade pb = pares de base



Os resultados mostraram que vários fragmentos amplificados em *M. scutellaris* foram de tamanhos diferentes, bem como o número de alelos e o índice de heteroziguidade quando comparados aos valores obtidos para *M. bicolor*. Os índices de heteroziguidade foram menores que os encontrados para *M. bicolor*, com exceção dos *loci* Mbi 28 e Mbi 88, os quais apresentaram índices maiores. O *locus* Mbi 32 não apresentou indivíduos heterozigotos tendo, então, índice de heteroziguidade igual a zero. Essas variações quanto ao número de alelos e índices de heteroziguidade entre espécies também foi observado por PETERS *et al.* (1998) usando *primers* desenvolvidos em *M. bicolor* para amplificação de DNA de *M. quadrifasciata*, *Tetragona clavipes* e *Scaptotrigona postica*.

CARVALHO (2001) obteve o valor de 0,39 como índice médio de heteroziguidade entre 29 populações de *M. scutellaris*.

No presente trabalho, o índice médio de heteroziguidade foi de 0,27 para os mesmos sete *loci* microsatélites estudados anteriormente. Essa diferença pode ser justificada pelo fato de nesse trabalho ter sido analisado colônias do Meliponário Uberlândia (além das colônias da Bahia) que estão geograficamente isoladas da região de ocorrência natural dessa espécie há mais de dez anos, apesar da introdução de novas rainhas e colônias no decorrer dos anos. Isso implica em aumento da homoziguidade na população.

Entretanto, analisando-se o número de alelos e a heteroziguidade das amostras coletadas no Meliponário Uberlândia e comparando-se com as amostras coletadas na Bahia obteve-se índices de heteroziguidade e número de alelos bastante próximos (Tabela 6).

Tabela 6: Tamanho dos fragmentos amplificados, número de alelos e heteroziguidade em *M. scutellaris*, nas colônias de Uberlândia e nas colônias da Bahia.

| <i>Loci</i> | Tamanho dos fragmentos (pb) observados em <i>M. scutellaris</i> nas colônias de Uberlândia (n° alelos) | Tamanho dos fragmentos (pb) observados em <i>M. scutellaris</i> nas colônias da Bahia (n° alelos) |
|-------------|--|---|
| Mbi 11      | 137 140 (2)<br>H= 0,00   | 128 137 (2)<br>H= 0,02  |
| Mbi 13      | 111 120 (2)<br>H= 0,06   | 111 120 (2)<br>H= 0,11  |
| Mbi 28      | 119 122 (2)<br>H= 0,6  | 113 116 119 122 127 130 (6)<br>H= 0,7   |
| Mbi 32      | 125 129 (2)<br>H= 0,0  | 125 (1)<br>H=0,0  |
| Mbi 36      | 98 122 133 (3)<br>H= 0,2   | 100 122 (2)<br>H=0,2  |
| Mbi 88      | 84 91 97 106 (4)<br>H= 0,6   | 91 94 97 100(4)<br>H=0,6  |
| Mbi 213     | 129 132 135 (3)<br>H= 0,4  | 119 129 132 (3)<br>H= 0,4   |

( ) = número de alelos H = heteroziguidade pb = pares de base

Apenas para o *locus* Mbi 28 houve uma diferença maior quanto ao número de alelos encontrados. Enquanto as amostras de Uberlândia apresentaram dois alelos, as amostras da Bahia apresentaram seis alelos para este mesmo *locus*. Já para os *loci* Mbi 11, Mbi 13 e Mbi 28 houve um aumento na heteroziguidade das colônias da Bahia.

A heteroziguidade média desses 7 *loci* microsatélites para *M. bicolor* é de 0,56, sendo maior do que o de *M. scutellaris*. Essa diferença, certamente, é consequência de existir até cinco rainhas fisogástricas ativas numa mesma colônia de *M. bicolor* o que não ocorre em *M. scutellaris*.

Portanto, a variabilidade genética é maior em *M. bicolor* do que em *M. scutellaris*.

Os dados de ESTOUP *et al.* (1994) mostraram uma heterozigosidade média de 0,69 para os *loci* microsatélites de *A. mellifera mellifera*. Esse valor é ainda maior do que os obtidos para *M. scutellaris* e *M. bicolor*, o que reflete a variabilidade decorrente dos acasalamentos múltiplos da rainha (até 19 machos segundo ADAMS *et al.*, 1997).

Em meliponíneos, PAXTON (1999) observou valores de heterozigosidade para *M. beecheii* entre 0,2 e 0,9, valores próximos aos encontrados para *M. scutellaris*, e encontrou três machos diferentes que acasalaram com a rainha.

Os alelos encontrados e suas frequências em cada *locus* para as oito colônias estudadas encontram-se na Tabela 7. As frequências alélicas encontradas para *M. scutellaris* não puderam ser comparadas com as frequências alélicas de *M. bicolor*, pois essas não foram fornecidas.

Quando variações alélicas bruscas ocorrem no tamanho dos microsatélites, seria um indicativo de que novos eventos de recombinação desigual estariam ocorrendo. Isto é, quanto menor o número de microsatélites observado e quanto mais distante é o tamanho (menos uniforme) mais novo é o microsatélite e o evento em si, por exemplo Mbi28 e Mbi 13.

Tabela 7: Alelos encontrados para cada *locus* analisado e suas frequências alélicas totais obtidas das oito colônias de *Melipona scutellaris*.

| <i>Loci</i> | Alelos encontrados (pb) | Frequências alélicas observadas |
|-------------|-------------------------|---------------------------------|
| Mbi 11      | 128                     | 0,04                            |
|             | 137                     | 0,85                            |
|             | 140                     | 0,10                            |
| Mbi 13      | 111                     | 0,95                            |
|             | 120                     | 0,05                            |
| Mbi 28      | 113                     | 0,03                            |
|             | 116                     | 0,1                             |
|             | 119                     | 0,3                             |
|             | 122                     | 0,2                             |
|             | 127                     | 0,08                            |
|             | 130                     | 0,3                             |
| Mbi 32      | 125                     | 0,92                            |
|             | 129                     | 0,08                            |
| Mbi 36      | 98                      | 0,18                            |
|             | 100                     | 0,24                            |
|             | 122                     | 0,54                            |
|             | 133                     | 0,03                            |
| Mbi 88      | 84                      | 0,075                           |
|             | 91                      | 0,41                            |
|             | 94                      | 0,039                           |
|             | 97                      | 0,26                            |
|             | 100                     | 0,18                            |
|             | 106                     | 0,036                           |
| Mbi 213     | 119                     | 0,28                            |
|             | 129                     | 0,32                            |
|             | 132                     | 0,31                            |
|             | 135                     | 0,09                            |

Devido à alta frequência de alguns alelos, podem existir alguns machos com o mesmo haplótipo. Assim, a rainha pode ter copulado com mais de um macho que tenha o mesmo alelo que ela. Os cruzamentos podem não estar sendo ao acaso, devido à falta ou diminuição da quantidade de machos e, conseqüentemente, de alelos ou à indução de cruzamentos preferenciais devido à maior proximidade entre as colônias amostradas no Meliponário Uberlândia. Também pode ser decorrente de acasalamentos

endogâmicos e à introdução de novos alelos (por meio da adição de novas colméias) o que acarretaria na introdução de um alelo numa razão maior que outro, afetando as frequências alélicas.

A criação de abelhas em Meliponários com número de colônias restritos, como no caso do Meliponário Uberlândia, pode levar a cruzamentos entre indivíduos irmãos ou com os mesmos alelos sexuais, podendo levar à diminuição da heterozigosidade. Também a multiplicação racional das colônias favorecendo a seleção para alguma característica desejável, como produção de mel, leva a alterações nas frequências alélicas pois, selecionando-se uma rainha para a formação de colônias filhas, leva-se a um conseqüente aumento do seus alelos na população.

Os *loci* e os tamanhos dos fragmentos encontradas da rainha e das operárias e machos, filhos da rainha, para cada colônia analisada estão dispostos na Tabela 8. O tamanho dos fragmentos dos machos que acasalaram com a rainha foi deduzido a partir dos alelos da rainha e sua prole. A análise onde encontrou-se mais de um alelo para o macho que acasalou com a rainha está em evidência. Nos demais obteve-se a presença de apenas um alelo, portanto, apenas um macho.

Tabela 8: Tamanho dos alelos (pb) das rainhas e sua prole, e tamanhos prováveis dos alelos dos machos que acasalaram com essas rainhas.

| Loci           | Colônia 1                    |  |   | Colônia 2                    |                                       |   |
|----------------|------------------------------|--|---|------------------------------|---------------------------------------|---|
|                | Tamanho dos alelos da Rainha | Tamanho dos alelos da Prole da rainha        | Tamanho dos Prováveis alelos dos machos | Tamanho dos alelos da Rainha | Tamanho dos alelos da Prole da rainha | Tamanho dos Prováveis alelos dos machos |
| <b>Mbi 11</b>  | 140                          | 140(M)<br>140/140 (O)                        | 140                                     | 137                          | 137/137(O)                            | 137                                     |
| <b>Mbi 13</b>  | 111/120                      | 111(M)<br>111/111(O)<br>111/120(O)<br>120(M) | 111<br>120                              | 111                          | 111/11(O)                             | 111                                     |
| <b>Mbi 28</b>  | -                            | -  | -                                       |                              | 119/122                               |   |
| <b>Mbi 32</b>  | 129                          | 129(M)<br>129/129 (O)                        | 129                                     | 125                          | 125/125(O)                            | 125                                     |
| <b>Mbi 36</b>  | -                            | -  | -                                       | 122                          | 122/122(O)<br>122/133(O)              | 122                                     |
| <b>Mbi 88</b>  | 84/91                        | 84(M)<br>84/84(O)<br>84/91(O)<br>91/91(O)    | 84<br>91                                | 91                           | 91/91(O)<br>91/106(O)                 | 91                                      |
| <b>Mbi 213</b> | 132                          | 132/132 (O)<br>132 (M)                       | 132                                     | 132                          | 132 /132(O)<br>132/135(O)             | 132                                     |

M – Macho

O – Operária

| Loci           | Colônia 3                    |                                       |   | Colônia 4                    |                                       |   |
|----------------|------------------------------|---------------------------------------|---|------------------------------|---------------------------------------|---|
|                | Tamanho dos alelos da Rainha | Tamanho dos alelos da Prole da rainha | Tamanho dos Prováveis alelos dos machos | Tamanho dos alelos da Rainha | Tamanho dos alelos da Prole da rainha | Tamanho dos Prováveis alelos dos machos |
| <b>Mbi 11</b>  | 137                          | 137 (O)                               | 137                                     | 137                          | 137(O)                                | 137                                     |
| <b>Mbi 13</b>  | 111                          | 111(O)                                | 111                                     | 111                          | 111(O)                                | 111                                     |
| <b>Mbi 28</b>  | 119/122-                     | 119/122(O)                            | 119<br>122                              | 119/122                      | 119/122                               | 119<br>122                              |
| <b>Mbi 32</b>  | 125                          | 125(O)                                | 125                                     | 125                          | 125(O)                                | 125                                     |
| <b>Mbi 36</b>  | -                            | -                                     | -                                       | 98                           | 98(O)                                 | 98                                      |
| <b>Mbi 88</b>  | 91/97                        | 91/97(O)<br>91/91(O)<br>97/97(O)      | 91<br><br>97                            | -                            | -                                     | -                                       |
| <b>Mbi 213</b> | 135                          | 129/135 (O)                           | 129                                     | 129/132                      | 129(O)                                | 129                                     |

M – Macho

O – Operária

| <i>Loci</i>    | Colônia 5                    |  |   | Colônia 6                    |                                       |   |
|----------------|------------------------------|--|---|------------------------------|---------------------------------------|---|
|                | Tamanho dos alelos da Rainha | Tamanho dos alelos da Prole da rainha        | Tamanho dos Prováveis alelos dos machos | Tamanho dos alelos da Rainha | Tamanho dos alelos da Prole da rainha | Tamanho dos Prováveis alelos dos machos |
| <b>Mbi 11</b>  | 137                          | 137 (O)                                      | 137                                     | 137                          | 137(O)<br>137 (M)                     | 137                                     |
| <b>Mbi 13</b>  | 111                          | 111(O)                                       | 111                                     | 111                          | 111(O)<br>111 (M)                     | 111                                     |
| <b>Mbi 28</b>  | 116/119                      | 116/119(O)<br>119/122(O)                     | 116 - 119<br>122                        | 113/116                      | 116/119(O)<br>113/116(O)              | 119<br>113 - 116                        |
| <b>Mbi 32</b>  | 125                          | 125(O)                                       | 125                                     | 125                          | 125(O)                                | 125                                     |
| <b>Mbi 36</b>  | 100                          | 100(O)                                       | 100                                     | 122                          | 122(O)                                | 122                                     |
| <b>Mbi 88</b>  | 100                          | 100(O)                                       | 100                                     | 94                           | 94 (O)                                | 94                                      |
| <b>Mbi 213</b> | 129/132                      | 132(M)<br>129(M)<br>119/132(O)<br>119/129(O) | 119                                     | 119/132                      | 119(O)<br>119(M)<br>119/132(O)        | 119                                     |

M – Macho

O – Operária



| <i>Loci</i>    | Colônia 7                    |                                       |   | Colônia 8                    |                                       |   |
|----------------|------------------------------|---------------------------------------|---|------------------------------|---------------------------------------|---|
|                | Tamanho dos alelos da Rainha | Tamanho dos alelos da Prole da rainha | Tamanho dos Prováveis alelos dos machos | Tamanho dos alelos da Rainha | Tamanho dos alelos da Prole da rainha | Tamanho dos Prováveis alelos dos machos |
| <b>Mbi 11</b>  | 128/137                      | 137 (O)<br>128/137(O)                 | 137                                     | 137                          | 137(O)                                | 137                                     |
| <b>Mbi 13</b>  | 111                          | 111(O)                                | 111                                     | 111/120                      | 111(O)<br>111/120 (O)                 | 111                                     |
| <b>Mbi 28</b>  | 130                          | 127/130(O)                            | 127                                     | 130                          | 130(O)                                | 130                                     |
| <b>Mbi 32</b>  | 125                          | 125(O)                                | 125                                     | 125                          | 125(O)                                | 125                                     |
| <b>Mbi 36</b>  | 122                          | 122(O)                                | 122                                     | 122                          | 122(O)                                | 122                                     |
| <b>Mbi 88</b>  | 91/97                        | 91(O)<br>91/97(O)                     | 91                                      | 91/97                        | 91/97(O)                              | 91                                      |
| <b>Mbi 213</b> | 119                          | 119                                   | 119                                     | 129/132                      | 129(O)<br>129/132(O)                  | 129                                     |

M – Macho

O – Operária

Os alelos dos *loci* Mbi 88 e Mbi 28 observados na análise das colônias 1, 3, 5 e 6 evidenciaram que a rainha acasalou com mais de um macho. Esses dados são contrários aos obtidos por PAGE e KERR (1990). Esses autores relataram que o volume de espermatozoides encontrados no oviduto da rainha após a cópula, era próximo ao volume ejaculado por um

único macho. KERR *et al.* (1962) relataram que durante o acasalamento dos meliponíneos os machos perdem sua genitália, ficando esta presa à genitália da rainha. Assim, ela não pode ser inseminada novamente. Nesse trabalho, para as colônias 1 e 3 a segregação dos alelos do *locus* Mbi 88 da progênie mostrou que a rainha, heterozigota, acasalou com, no mínimo, dois machos que possuíam os mesmos alelos que ela. Entretanto, para o *locus* Mbi 28 nas colônias 5 e 6, a segregação observada na progênie sugere, no mínimo, dois acasalamentos, embora pelo menos um macho tenha o mesmo alelo que ela e outro, um alelo diferente. Essa análise foi possível por meio da segregação desses alelos na progênie (machos e operárias) das referidas rainhas. Como exemplo, observa-se os alelos do *locus* Mbi 88 na colônia 1. Tendo na prole operárias homozigotas para os alelos 84 e 91, sendo a rainha heterozigota, um desses alelos é de um macho e o outro seria do outro macho.

Os resultados de todos os *loci* em todas as colônias analisadas indicam que cerca de 50% dos acasalamentos de rainha de *M. scutellaris* ocorrem com mais de um macho.

O fato de mais de um macho copular com a rainha, leva ao aumento na variabilidade, proporcionando maior diversidade genotípica. Com isso, as colônias apresentariam patrimônio genético mais diversificado para ação da seleção natural, podendo ocorrer seleção de colônias mais tolerantes à mudanças ambientais, aumento de tolerância a patógenos como observado em *A. florea* por OLDROYD *et al.* (1995) influenciando diretamente no aumento do *fitness* da colônia.

A poliandria aumenta a variabilidade genética intracolônia, conferindo vantagens para a colônia, como a redução na produção de machos diplóides, a resistência a patógenos e diminui a possibilidade da rainha acasalar com um macho que possua o mesmo alelo que ela.

## 5 - CONCLUSÃO

Este trabalho evidenciou, por meio de marcadores hipervariáveis microsatélites, que mais de um macho acasala com uma rainha de *Melipona scutellaris*.

Os primers Mbi 28 e Mbi 88 apresentaram maior índice de heterozigidade e maior número de alelos, sendo esses os mais informativos para a presente análise.

O número de machos no acasalamento pode ter sido subestimado, nos casos onde rainhas heterozigotas acasalaram com machos carregando um alelo idêntico ao seu.

## 6 - RESUMO

Os meliponíneos são de importância fundamental na polinização das flores. Cerca de 60% das espécies de abelhas sem ferrão estão nas florestas tropicais contribuindo para sua manutenção e perenização. Dentre os meliponíneos, a abelha *Melipona scutellaris*, conhecida popularmente como uruçú, tornou-se objeto de estudo desse trabalho. Até o momento era conhecido que essa espécie, como em várias espécies de meliponíneos, era monândrica, acasalando apenas uma vez em sua vida. Alguns autores, fazendo análises com marcadores microsatélites, relataram que entre os meliponíneos algumas espécies são poliândricas. Marcadores microsatélites possuem uma característica fundamental que torna possível a análise da relação de parentesco dentro da espécie: possuem o mais elevado conteúdo de polimorfismo. São marcadores com expressão codominante, multialélicos e muito frequentes. Assim, analisando-se colônias de *Melipona scutellaris*, este trabalho teve como objetivo confirmar se há apenas um macho copulando com a rainha dessa espécie, por meio de marcadores hipervariáveis microsatélites. Foram usados sete *loci* microsatélites de *Melipona bicolor* para a análise de oito colônias de *Melipona scutellaris*. Estas amostras foram amplificadas pela PCR e os alelos detectados em gel de poliacrilamida desnaturante 6% em Sequenciador Automático. Os sete *loci* microsatélites apresentaram variação quanto ao número e frequência de alelos, comparando-se com *M. bicolor*, espécie a partir da qual foram desenvolvidos os *primers*. A partir da análise dos alelos da rainha e sua prole observou-se que em quatro das oito colônias analisadas as rainhas acasalaram com, no mínimo, dois machos, aumentando a variabilidade genética da colônia.

## 7 - SUMMARY

The stingless bees are of fundamental importance in the flower's pollination. About 60% of the stingless bees's species are at tropical forests, where they contribute to its maintenance and conservation. Among the stingless bees, the *Melipona scutellaris* – known popularly as “uruçu” – became object of study of this work. Such bee, so far, was characterized as being monandry, coupling just once in its lifetime, as in several stingless bees' cases. However, some authors, making analysis, using microsatellites markers, related that among the stingless bees some are polyandry. Microsatellite markers have a fundamental characteristic, which allows the analysis of the kinship within the species: they possess the highest polymorphism content. These markers are multialleles, very frequent, with codominant expression. Thus, through the analysis of the *Melipona scutellaris*, the aim of this work is to confirm whether there is a single male copulating with the queen of this species, by means of the hypervariable microsatellites markers. Seven microsatellites loci of bicolor *Melipona* were used for the analysis of eight *Melipona scutellaris*' colonies. PCR products were run on standard 6% polyacrylamide sequencing gels. Microsatellite alleles were scored as fragment lengths on base pairs. All seven microsatellite loci presented variation as to the alleles' number and frequency, comparing with *Melipona bicolor*, species from which the primers were developed. From the analysis of the queen's alleles and its offspring was observed that in four, out of eight, analyzed colonies the queens coupled with at least, two males, increasing the colony's genetic variability.

## 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J.; ROTHMAN, E.D.; KERR, W.E. e PAULINO, Z. L. 1977 Estimation of number of sex allele and queen matings from diploid male frequencies in a population of *Apis mellifera*. **Genetics** vol. 86: 583-596
- AYALA, F. J.; KIGER, J. A 1984 **Modern Genetics**. Second Edition. University of California, Davis. Pp: 749-751.
- BEYE, M.; NEUMANN, P.; FELDER, M.; MORITZ, R. F. A. 1998 A simple, non-radioactive DNA fingerprinting method for identifying patrilines in honeybees colonies. **Apidologie** vol. 29: 255-263.
- BLOWS, M. W.; SCHWARZ, M. P.; 1991 Spatial distribution of a primitively social bee: does genetic population structure facilitate altruism? **Evolution** vol. 45 (3): 680-693.
- CAMARGO, J. M. F.; 1972 **Técnicas de controle de cruzamentos**. In: Manual de Apicultura. Editora Agronômica Ceres. São Paulo, SP. pp 59-93.
- CARVALHO, G. A, 1996 **Monitoramento dos alelos sexuais *xo* em uma população finita de *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini)**. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 51p.
- CARVALHO, G. A, 2001 **Number of *xo* sexual alleles (CSD) in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae) and its consequence**. (no prelo).
- CHOUDHARY, M., STRASSMANN, J. E., SOLÍS, C. R., QUELLER, D. C., 1993 Microsatellite variation in a social insect. **Biochemical Genetics** vol. 31 Nos. ½.: 87 a 96.

- CONTEL, E. P. B.; MESTRINER, M. A.; 1974 Esterase polymorphism at two loci in the social bee. **J. Hered.** vol. **65**: 349-352
- ESTOUP, A.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J-M.; 1994 Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in honeybee colonies. **Proc. R. Soc. Lond. B.** vol. **258**: 1-7.
- FALCÃO, T. M. M. A.; CONTEL, E. P. B. 1982 Polimorfismos protéicos em populações naturais de abelhas brasileiras. **Ciência e Cultura** vol. **34 (7)**: 743.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. 1996 **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, pp. 32-60.
- HAMILTON, W.D. 1964 The genetical theory of social behaviour I and II. **J. Theor. Biol.** vol. **7**: 1-52.
- HAIG, S. M., 1998 Molecular contributions to conservation. **Ecology** vol. **79 (2)**: 413-425.
- HAYMER, D. S.; 1994 Random amplified polymorphic DNAs and microsatellite: what are they, and can they tell us anything we don't already know?. **Rev. entomological society of America** vol. **87 (6)**: 717-722.
- HUGHES, C. R.; QUELLER, D. C.; 1993 Loci microsatellite detection highly polymorphic in a specie with low allozymic polymorphism. **Molecular ecology** vol **2**: 131-137.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; MATOS, E. T.; FERREIRA, F. ; VELTHUIS, H. H. W.; 1998 A case of multiple mating in stingless bees (Meliponinae). **Insectes sociaux**, vol. **42 (2)**: 231-233.

- KERR W. E, ZUCCHI R, NAKADAIRA J T, BUTOLO J E, 1962  
Reproduction in the social bees (Hymenoptera: Apidae). **J. N. Y. Ent.  
Soc. vol. 70:265-276**
- KERR W. E, 1972 Genética e biologia de abelhas. **Ciência e cultura vol.  
25 (10): 927-934.**
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A.; 1996 **Abelha  
uruçu: biologia, manejo e conservação.** Ed. Fund. Acangáú, Belo  
Horizonte – MG, 144p.
- KERR, W. E.; VENCOVSKY, R. 1982 Melhoria genética em abelhas  
I. Efeito do número de colônias sobre o melhoramento. **Brazilian  
Journal of Genetics vol. 5: 279-285.**
- KERR, W. E. 1998 As abelhas e o meio ambiente (1). **Anais do XII  
Congresso Brasileiro de Apicultura.** Feira Nacional Apícola.  
Salvador-BA. 27-30p.
- KERR, W. E.; NASCIMENTO, V. A; CARVALHO, G. A; 1999  
Preservation of native Brazilian bees: a question of historical and  
ecological conscience. **Ciência e Cultura vol. 51(5-6): 390-393.**
- MORITZ R. F. A; MEUSEL, M. S.; HABERL, M. 1991 Oligonucleotide  
DNA fingerprinting discriminates super – and half – sisters in honey  
bee colonies (*Apis mellifera* L.). **Naturwissenschaften vol. 78: 422 -424**
- MOURE, J. M. 1961 A preliminary supra-specific classification of the old  
world Meliponinae bees (Hymenoptera, Apoidea). **Studia Entomol.  
vol. 4 (1-4): 181-242.**
- OLDROYD B. P.; SMOLENSKI A. J; CORNUET J-M.; WONGSIRI S.;  
ESTOUP A ; RINDERER T. E.; CROZIER R. H. 1995 Levels of  
polyandry and intracolony genetic relationships in *Apis florea*. **Behav.  
Ecol. Sociobiol vol. 35: 329-335.**



- OLDROYD B. P.; CLIFTON M. J. ; WONGSIRI S.; RINDERER, T. E.; SYLVESTER, H. A; CROZIER R. H.; 1997 Polyandry in the genus *Apis*, particularly *Apis andreniformis*. **Behav. Ecol. Sociobiol. vol. 40:** 17-26
- PAGE R. E, KERR W. E, 1990 The evolution of monandry and queen replacement in *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). **Rev. Brasil. Genet. vol. 13: 209-229**
- PARKER, P. G.; SNOW, A. A.; SCHUG, D. M.; BOOTON, G. C.; FUERST, P. A.; 1998 What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology vol. 72 (2): 361-382.**
- PAXTON, R. J.; WEIBSCHUH, N.; ENGELS, W.; HARTFELDER, K.; 1999 Not only single mating in stingless bees. **Naturwissenschaften, vol. 86: 143-146.**
- PETERS, J. M.; QUELLER D. C.; IMPERATRIZ-FONSECA V. L.; STRASSMANN J. E; 1998 Microsatellite loci for stingless bees. **Molecular Ecology vol. 7: 783-792**
- QUELLER, D.; STRASSMANN, J. E.; HUGHES, C. R.; 1993 Microsatellites and kinship. **Tree vol. 8 (8): 285-288.**
- QUELLER, D.; STRASSMANN, J. E. 1998. Kin selection and social insects. **Bioscience vol. 48 (3): 165-173**
- ROIG-ALSINA A ; MICHENER C. D. 1993 Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). The university of Kansas. **Science Bulletin vol. 55, Nos. 4 and 5: 123-173**
- ROUBIK, D. W.; 1989 **Ecology and natural history of tropical bees.** Cambridge University Press, Cambridge. pp 1-15.

- ROWE, D. J.; RINDERER, T. E.; STELZER, J. A.; ALDROYD, B. P.; CROZIER, R. H.; 1997 Seven polymorphic microsatellite loci in honeybees (*Apis mellifera*). **Insectes sociaux vol. 44: 85-93.**
- SCHLÖTTERER, C.; 1998 **Microsatellites.** In: Molecular genetic analysis of populations. 2 ed. Editado por A. R. Hoelzel. University of Durham, pp 237-260.
- STRASSMANN, J. E.; SOLÍS, C. R.; PETERS, J. M.; QUELLER, D. C.; 1996 **Strategies for finding and using highly polymorphic DNA microsatellite loci for studies of genetic relatedness and pedigrees.** In: Molecular zoology: advances, strategies, and protocols. Chapter 8, pp 163-549.
- TRIVERS, R. L.; HARE, H.; 1976 Haplodiploidy and the evolution of the social insects. **Science, vol. 191 (4224): 249-263.**
- TOONEN, R. 1997 **Microsatellites for ecologists: non-radioactive isolation and amplification protocols for microsatellite markers.** Section of Evolution and Ecology, Center for Population Biology. University of California, Davis, CA. Page 1 for 78.
- VELTHUIS, H. H. W.; 1997 **Biologia das abelhas sem ferrão.** Faculdade de Biologia, Universidade de Utrecht, Holanda.

## 9 – ÍNDICE REMISSIVO

- A**
- A. andreniformis*, 15  
*A. dorsata*, 27  
*A. florea*, 15  
abelhas sem ferrão, 1  
abelhas sociais, 7  
acasalamentos endogâmicos, 29  
acasalamentos múltiplos, 7, 35  
AFLP, 11  
agente desnaturante, 28  
alelo, 7  
alelos sexuais, 37  
alozimas, 10  
altruistas, 5  
amplificação, 24  
apíneos, 1  
*Apis mellifera*, 6
- B**
- Bombus terrestris*, 15
- C**
- centroméricas, 13  
clonados, 27  
cloreto tetrametil amônia, 28  
codominante, 14  
cromossomos, 13
- D**
- designação, 8  
determinação de castas, 3  
dinucleotídeos, 16  
diplóides, 5  
DNA, 25  
DNA *fingerprinting*, 12  
DNA genômico, 28  
dNTP, 23
- E**
- endogamia, 3  
exclusão, 8  
extinção, 4
- F**
- favos de cria, 4  
frequências alélicas, 17
- G**
- gel de agarose, 27  
gel de sequenciamento, 24  
genitália, 7  
genoma, 10
- H**
- haplodiplóide, 5  
haplóides, 5  
haplótipo, 36  
heterocromáticas, 13  
heterozigoto, 14  
himenópteros, 5  
hipervariáveis, 18  
homologia, 27
- I**
- índice de heterozigozidade, 26  
intracolônial, 42  
isoenzimas, 10
- L**
- Loading Dye*, 25  
*loci*, 10  
*locus*, 12
- M**
- M. quadrifasciata*, 33  
machos, 15  
machos diplóides, 3  
magnési, 27  
marcador interno, 25  
marcadores, 10  
Marcadores aloenzimáticos, 10  
marcadores genéticos, 8  
marcadores microsatélites, 12  
marcadores morfológicos, 10  
*Melipona beecheii*, 15  
*Melipona bicolor*, 6  
*Melipona scutellaris*. Consulte

Meliponário, 19  
 meliponíneos, 1  
 minisatélites, 11  
 monândricas, 6  
 multialélicos, 14  
 multiplicação racional, 37  
 mutações, 14

## N

NaCl, 22

## O

otimizados, 27

## P

*Parachartergus colobopterus*, 10  
 parentesco, 8, 17  
 partenogênese arrenótoca, 5  
 patógenos, 6  
 PCR, 11  
*Plebeia droryana Friese*, 8  
 poliacrilamida, 24  
 poliandria, 6  
 polimórficos, 12  
 polimorfismo, 14  
 polinização, 1  
*Polistes annularis*, 17  
 primers, 14  
 primers heterólogos, 24  
 primers microsatélites, 15  
 proteinase K, 22

## R

rainhas fisogástricas., 20

RAPD, 11  
 relação de parentesco, 5  
 repetições diméricas, 16  
 RFLP, 11  
 RNA *display*, 11

## S

*Scaptotrigona postica*, 15  
 segregação dos alelos, 42  
 Sequenciador Automático, 31  
 SSLPs, 14  
 SSR, 14  
 STOP, 25  
 STR, 14  
 subestimado, 44

## T

tampão SET, 22  
*Taq* DNA polimerase, 23  
 TE, 22  
 temperaturas de anelamento, 27  
*Tetragona clavipes*, 33  
 tórax, 21  
 triméricas, 16  
 trinucleotídeos, 16

## U

uruçu, 4

## V

variabilidade, 35  
 VNTR, 11