

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

**DETERMINAÇÃO DE POLIMORFISMO NOS GENES MITOCONDRIAIS
16S rRNA EM *Melipona quadrifasciata* LEP POR SSCP (SINGLE
STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM)**

Cristina Rodrigues de Lima

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

Uberlândia – MG
Janeiro -2000

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

DETERMINAÇÃO DE POLIMORFISMO NOS GENES MITOCONDRIAIS 16S
rRNA EM *Melipona quadrifasciata* LEP POR SSCP (SINGLE STRAND
CONFORMATION POLYMORPHISM)

Cristina Rodrigues de Lima
Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr

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

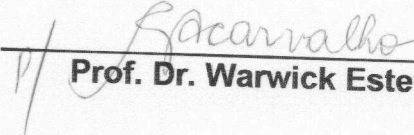
Uberlândia - MG
Janeiro -2000

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

DETERMINAÇÃO DE POLIMORFISMO NOS GENES MITOCONDRIAIS 16S
rRNA EM *Melipona quadrifasciata* LEP POR SSCP (SINGLE STRAND
CONFORMATION POLYMORPHISM)

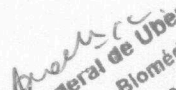
Cristina Rodrigues de Lima

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 11 / 01 / 2000 NOTA 100,00


Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr

MSc. Soraya Matos de Vasconcelos

MSc. Maurício Machaim Franco


Universidade Federal de Uberlândia
Centro de Ciências Biomédicas
Prof. Ana Maria Coelho Carvalho
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Uberlândia, 11 de janeiro de 2000

Não acrediteis em coisa alguma
Pelo fato de vos mostrarem o testemunho
escrito de algum sábio antigo;
Não acrediteis em coisa alguma
com base na autoridade de mestre e
sacerdotes.
Aquilo, porém, que se enquadrar na vossa
razão e depois de minucioso estudo
for confirmado pela vossa experiência
conduzindo ao vosso próprio bem e ao de
todas as outras coisas vivas
a isso acreditais como verdade;
Por isso, pautai vossa conduta.

SAKYA MUNI
(BUDA)

RESUMO

A espécie *Melipona quadrifasciata* se encontra distribuída ao longo de toda a costa brasileira da Paraíba até o Rio Grande do Sul apresentando duas subespécies, *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* Lepeletier. e *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier.. A identificação de mutações SSCP Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) desenvolvida como uma forma de detectar uma sequência que tenha sofrido mutação tem apresentado um grande potencial para estudos filogenéticos e evolutivos especialmente quando utilizada com mtDNA. A variação inter-regional nas taxas evolucionárias do mtDNA é particularmente útil pois facilita a escolha de genes apropriados para estudos de biogeografia ou filogenia. Amostras de indivíduos de colônias diferentes de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. provenientes do estado de São Paulo, Sul de Minas e amostras de *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* Lep. provenientes do Paraná foram analisadas para o gene mitocondrial 16S rRNA por SSCP. Para a população analisada de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. não foi encontrada divergência entre as amostras analisadas, mas em *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* Lep. ocorreram 3 haplótipos. Tais resultados demonstram que estas abelhas apresentam uma maior variabilidade genética por encontrarem-se em um ecossistema mais preservado que propicia a conservação de um maior número de colônias ou ainda erro nas informações sobre a procedência das colônias coletadas, que pode levar a um falso resultado e que deverá ser posteriormente verificado. Os híbridos amostrados em Pedreira-SP apresentaram o mesmo padrão de bandas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* o que pode ser explicado com base no fato de que na maioria animais, a progênie apresenta mitocôndrias somente do tipo materno.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática – SSCP.....	05
Figura 2	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> visitando flor.....	07
Figura 3	Padrão de variabilidade gerado por “primer” correspondente a região de 534 pb do gene mitocondrial 16S rRNA em gel PAGE 14%. Amostras correspondentes ao município de Curitiba-PR.....	14
Figura 4	Padrão de variabilidade gerado por “primer” correspondente a região de 534 pb do gene mitocondrial 16S rRNA em Gel acrilamida 14%. 1e2 Pedreira SP., 3, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 Itamonte MG., 9 Jacutinga MG. * Híbridos amostra 1 e 2.....	15

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Localização geográfica dos pontos de coleta de amostras de
Melipona quadrifasciata quadrifasciata..... 08
- Tabela 2 Localização geográfica dos pontos de coleta de amostras de
Melipona quadrifasciata anthidioides..... 08
- Tabela 3 Localização geográfica dos pontos de coleta de amostras de
Híbridos

3.2.3.2 SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)	11
3.2.3.3 GEL DE POLIACRILAMIDA 49:1	11
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5 CONCLUSÕES	16
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

1.INTRODUÇÃO

1.1. Os meliponíneos:

Os meliponíneos são conhecidos popularmente como abelhas indígenas sem ferrão, são parte integrante do ecossistema da região em que vivem, responsáveis por realizarem de 40 a 90% de polinização de árvores nativas e, conseqüentemente pela produção de frutos (KERR *et al.*, 1996). Por isso torna-se importante o estudo da biologia destas abelhas, seu correto manejo e sua reprodução controlada

As abelhas nativas pertencem à superfamília Apoidea, família Apidae e subfamília Meliponinae, esta última dividida em duas tribos: Meliponini e Trigonini (KERR *et al.*, 1996). Na família Meliponinae se encontram mais de 300 espécies, dentre elas a *Melipona quadrifasciata* (KERR *et al.*, 1996).

1.2. A ESPÉCIE *Melipona quadrifasciata*:

A *Melipona quadrifasciata* Lepeletier é encontrada em muitas regiões do Brasil e se destaca no gênero *Melipona* pela intensa atividade das abelhas campeiras, mesmo em temperaturas baixas e horários matutinos quando outras espécies não forrageiam (IMPERATRIZ-FONSECA & KLEINERT-GIOVANNINI, 1983 *apud* AIDAR, 1996).

Há duas subespécies de *Melipona quadrifasciata* Lep:

- *Melipona quadrifasciata anthidioides*

Ocorre ao norte e nordeste de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro indo em direção ao nordeste do Brasil. É uma subespécie de regiões quentes. (KERR, 1951), (MELO & CAMPOS, 1987 *apud* AIDAR, 1996).

- *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*

Ocorre no sul de São Paulo seguindo para o sul do Brasil, em regiões mais altas e frias, ao sul de Minas Gerais ocorre em alturas acima de 1.500 m; na Serra de Bocaina, Serra do Mar, Litoral Norte de São Paulo e em alturas superiores a 1600 m (KERR, 1951 e MOURE, 1975 *apud* AIDAR, 1996).

A subespécie *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* difere morfologicamente da *Melipona quadrifasciata anthidioides*, pela primeira possuir bandas amarelas inteiras nos tergitos 3 a 6 (às vezes a banda do tergito 3 possui um espaço separando-a) e na segunda, as mesmas bandas da subespécie *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* possuem uma interrupção mediana nos tergitos 4 a 6 (KERR, 1951).

Segundo FUTUYMA (1992) uma explicação possível das causas da distribuição geográfica de um táxon é a de que o grupo deve sua presença na área atual a uma dispersão a partir da região na qual a linhagem evoluiu originalmente. A evolução das novas espécies ocorre juntamente com a evolução das barreiras para o fluxo gênico. As vezes é difícil avaliar se a variação que ocorre entre indivíduos de uma mesma localidade representa apenas uma espécie com variabilidade ou mais que uma simples espécie.

1.3. HÍBRIDOS

Na região de São Paulo e Minas Gerais há uma zona de hibridação onde são encontrados vários híbridos com diferentes padrões na distribuição das bandas amarelas dos tergitos abdominais (MOURE & KERR, 1950; KERR, 1951; MOURE, 1975). Atualmente devido a desmatamentos e a grande redução do

número de abelhas, a região da zona de hibridação pode ter desaparecido ou encontrar-se muito reduzida. Entretanto relatos de meliponicultores que adquirem colônias de localidades diferentes e colocando em contato as duas subespécies acabam por produzir híbrido como relatado por MOURE E KERR em 1950.

1.4 DNA MITOCONDRIAL

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

O mtDNA reúne características ideais para análises filogenéticas pois é uma molécula distinta e bem distribuída permitindo comparações entre uma grande variedade de organismos. Possui uma estrutura genética simples sem modelos complexos de DNA repetitivo, elementos de transposição, pseudogenes e introns exibindo um modo de transmissão genética direta, sem recombinações ou rearranjos (AVISE *et al.*, 1987). Inicialmente, o mtDNA animal foi considerado não somente um "exemplo de extrema economia genética" (ATTARDI, 1985) mas um paradigma de estabilidade estrutural. Essa percepção foi baseada na descoberta de grande similaridade entre o mtDNA de quatro vertebrados (humanos, ratos, bovinos e répteis) tanto no tamanho (16.5 a 17.6 Kb) como na ordem invariante dos genes. Uma pequena variação existe entre vertebrados restrita a região *D-Loop* (CLAYTON, 1984). Mais recentemente, essa visão de uniformidade estrutural tem sido desafiada por estudos de mtDNA em animais adicionais especialmente invertebrados.

A molécula de mtDNA em primatas apresenta como característica uma taxa de evolução da seqüência de nucleotídeos cerca de dez vezes mais rápida que a observada em uma cópia única de um gene nuclear (BROW *et al.*, 1979, 1982)

descoberta subsequente estendida a outros mamíferos (MIYATA *et al.*, 1982 *apud* MORITZ *et al.*, 1987).

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

1.5- A TÉCNICA DE SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

A técnica de Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) detecta com grande sensibilidade seqüências que tenham sofrido mutação por diferenças de mobilidade eletroforética em fita única de ácido nucléico em PAGE (ORITA *et al.*, 1989) (Fig.1). Comparações entre as subespécies podem ser informativas para estudos populacionais. A análise de fragmentos de um gene mitocondrial, altamente conservado, permite acesso a uma parte da história evolutiva da espécie. Esse procedimento tem sido usado por, HOSHINO *et al.*, 1992 e BANNAL, *et al.*, 1994 para tipificar alelos. A formamida age como agente desnaturante tornando instáveis as pontes de hidrogênio entre timina e adenina.

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

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

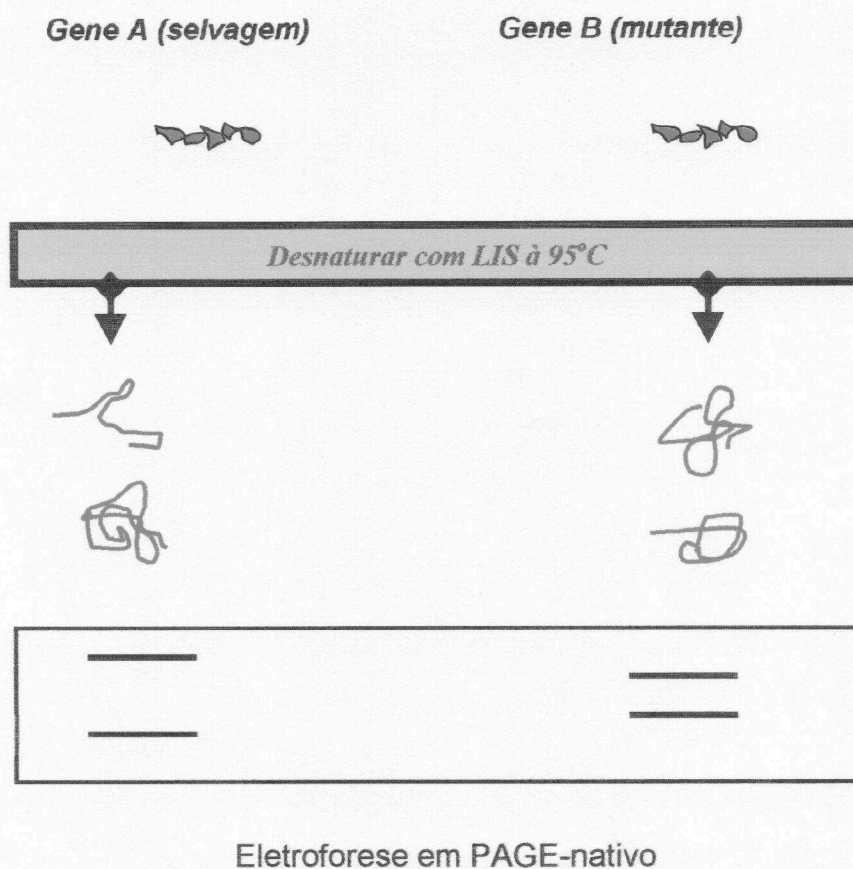


Figura 1 - Representação esquemática – SSCP

2. OBJETIVOS

Verificar prováveis variações da sequência 16S rRNA do mtDNA por análise do fragmento (534 pb) entre populações de duas subespécies de *Melipona quadrifasciata* e seu híbrido.

3. MATERIAL E MÉTODOS

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

3.1. Material Biológico



Figura2 - *Melipona quadrifasciata anthidioides* visitando flor

O material biológico deste trabalho foi a *Melipona quadrifasciata* (Apidae, Meliponini). Duas subespécies e um híbrido (tabela 3) foram

amostrados para análise: *M. quadrifasciata quadrifasciata*, provenientes do estado do Paraná (tabela1) e *M. quadrifasciata anthidióides* coletadas no Estados de São Paulo e Sul de Minas Gerais (tabela 2).

Tabela 1 Localização geográfica dos pontos de coleta de amostras de *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*

Pontos de Coleta	Nº de amostras	Longitude	Latitude
1 Curitiba-PR.	18	49° 12' O	25° 23' S

* As amostras de número 1 ao 10 são provenientes do Bairro Portão e as de número 11 ao 18 são do Bairro Santa Cândida da cidade de Curitiba.

Tabela 2 Localização geográfica dos pontos de coleta de amostras de *Melipona quadrifasciata anthidioides*

Pontos de Coleta	Nº de amostras	Longitude	Latitude
1 Itamonte-MG.	01	44° 39' O	22° 12' S
2 Jacutinga-SP.	10	46° 27'' O	22° 12' S

Tabela 3 Localização geográfica dos pontos de coleta de amostras de Híbridos.

Pontos de Coleta	Nº de amostras	Longitude	Latitude
1- Pedreira-SP	02	46° 55'O	21° 44'S

3.2 Análise Molecular

3.2.1 Extração de DNA

As amostras, constituídas por abelhas adultas, foram coletadas na entrada das colônias e colocadas diretamente em vidros com álcool comercial. As amostras de Curitiba foram coletadas pelo senhor Sebastião Gonzaga e as de Pedreira, Jacutinga e Itamonte pelo Engenheiro Agrônomo José Luciano, sendo enviadas pelo correio para a Universidade Federal de Uberlândia, onde foram armazenadas à -20°C

Inicialmente cada indivíduo foi retirado do álcool lavado em tampão (Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0; NaCl 0,1 M e MgCl_2 0,001 M) em três imersões sucessivas de 15 min e em seguida foram secos em papel de filtro.

O DNA total foi extraído do tórax de uma única abelha/colônia segundo método desenvolvido por AZEREDO-ESPIN *et al.* (1991). A amostra foi triturada em N líquido adicionou-se em seguida 600 μl de solução *grinding* (10 mM Tris, 60 mM NaCl, 30 mM Sacarose, 10 mM EDTA, 2.700 μl Água) de acordo com o tamanho da amostra. Em seguida acrescentou-se a mesma quantidade de tampão de *lise*, (Tris 300 mM, 40 mM SDS, 20 mM EDTA, 0,7% DEPEC, 1,191 μl Água) permanecendo em gelo por 15 min. Adicionou-se 10 a 20 μl de proteinase K (10 mg/ml), incubando-a por 45 min 45°C . Acrescentou-se 20 μl de RNase incubando a 37°C por 1 h e 30 min. O volume foi dobrado com fenol e centrifugando a 10.000 rpm por 5 min. Retirou-se a fase superior para um novo tubo e novamente dobrou-se o volume com fenol: clorofórmio: álcool isoamil (25:24:1) centrifugando a 10.000 rpm por 5 min. Realizou-se uma terceira lavagem somente com clorofórmio semelhante às duas anteriores. Adicionou-se à fase superior dois volumes de etanol gelado e 1/10 do volume total de NaCl 2M As amostras foram mantidas a -20°C *overnight*. O DNA foi precipitado por centrifugação a 13000 rpm por 15 min e a fase aquosa foi descartada. Procedeu-se a lavagem do *pellet* com 500 μl de etanol 70%. Pipetou-se

para fora todo o etanol do tubo. Após o *pellet* se encontrar completamente seco este foi ressuspendido em 70 µl de H₂O dd. As amostras estoque foram armazenadas à - 80°C.

3.2.2 Quantificação do DNA em espectrofotômetro

O DNA foi quantificado por leitura de absorbância a 260 nm. Alíquotas de 10 µl diluídas 100 vezes em água ultra pura foram submetidas a leitura em espectrofotômetro e a concentração calculado com o auxílio da seguinte fórmula.

$$[\text{DNA}] = \text{ABS}(260) \times f_c \times f_d,$$

Onde:

[DNA]- concentração de DNA

ABS(260)- leitura da absorbância a 260nm

f_c- fator de conversão da cuveta

f_d- fator de diluição da amostra

Após a quantificação a amostra foi diluída em água ultrapura para a concentração de trabalho de 10ng/µl. As amostras de trabalho já diluídas foram armazenadas a - 20 °C.

3.2.3 CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMO DO GENE 16S rRNA DO DNA MITOCONDRIAL POR SSCP

3.2.3.1 AMPLIFICAÇÃO DO Gene 16S RrNA do mt DNA

A PCR (Polymerase Chain Reaction) é uma técnica que envolve a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima *Taq* DNA polimerase. A reação está baseada em ciclos de anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos chamados iniciadores ou "primers" que delimitam a sequência de DNA de fita dupla alvo da amplificação (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Com o auxílio desta técnica foi feita a amplificação da região 16S rRNA do mtDNA do genoma mitocondrial utilizando-se 60 ng de DNA, 400uM de dNTPs, 3 mM de $MgCl_2$ e 1,5U de *Taq* polimerase, e 8 pmols do par de "primer" RCO1/RCO2 específico para esta região, desenvolvido a partir de sequências de *A. mellifera* descrito por CAMERON *et al.* (1992).

No 1º ciclo ocorre a desnaturação da dupla fita de DNA, a temperatura é mantida à 94° por 2 min, o 2º ciclo ocorre à 94° C por 5 min. Na fase de anelamento a temperatura é reduzida à 48° C durante 1 min. a qual posteriormente é elevada à 70° C por 4 min. para que ocorra a extensão da fita. Os ciclos são repetidos 35 vezes para que a quantidade de DNA da sequência alvo dobre a cada ciclo, de modo que depois de 20 ciclos são produzidos mais de um milhão de cópias da quantidade inicial da sequência alvo. A temperatura final é de 4° C.

3.2.3.2 SSCP (single strand conformation polymorphism)

Foram adicionados 2 a 6 µl do produto da purificação a 18 ou 14 µl de solução de LIS (sacarose 10%, azul de bromofenol 0,01%, xileno cianol 0,01%). Tal mistura foi incubada a 95°C por 5 minutos e 20 µl foram aplicados em PAGE 14% (Acrilamida-bisacrilamida 49:1) com espaçadores 0,7 mm. A eletroforese foi realizada à 10 mA por um período de 17h.

3.2.3.3 GEL DE POLIACRILAMIDA (49:1)

Os fragmentos gerados por ampliações e submetidos à desnaturação em lis-SSCP foram aplicados em gel de poliacrilamida : bis-acrilamida na proporção de 49:1, na concentração de 14% durante 17h a 10mA em tampão tris-borato EDTA (TBE 1,0 x) conforme SAMBROOK *et al.* (1989). Foi corado com prata e revelado com carbonato de sódio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise Molecular do Gene 16S rRNA do DNA Mitocondrial por SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

4.1 *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*

A comparação das bandas por análise de migração diferencial de fragmentos amplificados (SSCP) em *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* revelou 3 haplótipos diferentes na cidade de Curitiba-PR em 2 bairros analisados.

Uma possível consideração para tal variabilidade pode estar relacionada a fatores ambientais como bosques de mata nativa preservada, que podem abrigar um maior número de colônias proporcionando a esta população uma maior variabilidade genética.

Outra hipótese a ser considerada é a procedência destas amostras. O meliponicultor que as cedeu informou que as colônias são provenientes do município de Curitiba, mas a prática comum entre alguns meliponicultores de troca de rainhas e/ou colônias, pode justificar a variabilidade genética aumentada. Tal resultado precisa ser verificado para se definir as variações da sequência 16S rRNA do mtDNA.

Esse problema ressalta a importância da coleta das amostras preferencialmente nos troncos originais. Muitas vezes a grande dificuldade de localizar colônias naturais levam os pesquisadores a amostrarem colônias de meliponários. O controle rigoroso da substituição de rainhas nem sempre é feito e análises de biogeografia e evolução podem ser comprometidas.

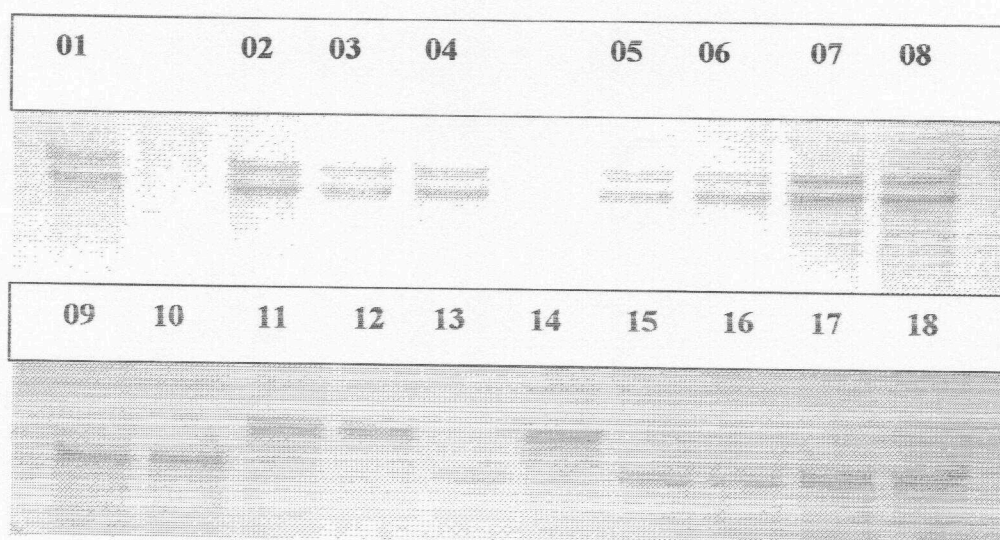


Figura 03. Padrão de variabilidade gerado por primer correspondente a região de 534 pb do gene mitocondrial 16S rRNA em gel PAGE 14%. Amostras correspondentes ao município de Curitiba PR.

4.2 *Melipona quadrifasciata anthidioides*

As amostras coletadas das cidades de Pedreira SP, Jacutinga MG e Itamonte MG, não apresentaram diferenças entre si na comparação de bandas por análise de migração diferencial dos fragmentos, mesmo entre os híbridos (Figura 4 amostras 1 e 2). Segundo informações do meliponicultor que cedeu as amostras, os híbridos se originaram devido a presença de *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* de um meliponicultor vizinho, em um bosque distante cerca de 1.5

Km de seu meliponário. O haplótipo dos híbridos não diferiu do haplótipo encontrado para as outras amostras, isto indica que o padrão de bandas no abdome, referencial usado neste trabalho para identificação das subespécies e híbridos, não está relacionado ao mtDNA. Seria, então, interessante análises do DNA nuclear para se inferir a formação dos híbridos. Em alguns animais mesmo que as mitocôndrias dos gameta masculino penetrem no óvulo no momento da fertilização, a progênie apresenta mitocôndrias somente do tipo materno. Há duas explicações para esse fato: diferença na taxa de replicação entre mtDNA materno e paterno e maior quantidade no zigoto, de mt DNA materno em relação ao paterno (HECHT *et al.*,) *apud* Arias 1992.

Foi descrito em *MYTILUS* resultados revelando contribuição paterna na herança do mtDNA (HOEH *et al.* 1991 *apud* ARIAS 1992). A transmissão paterna e a mutação podem ser um dos mecanismos responsáveis pela heteroplasma, a qual consiste da coexistência de mais de um tipo de mtDNA numa mesma célula ou indivíduo (ARIAS, 1992).

Um único tipo de haplótipo observado dá indícios de inexistência ou de uma pequena taxa de mitocôndrias de origem paterna na fertilização do ovo. Não se pode afirmar com certeza a inexistência da heteroplasma em *M. quadrifasciata* por não se conhecer previamente o haplótipo de origem paternal.

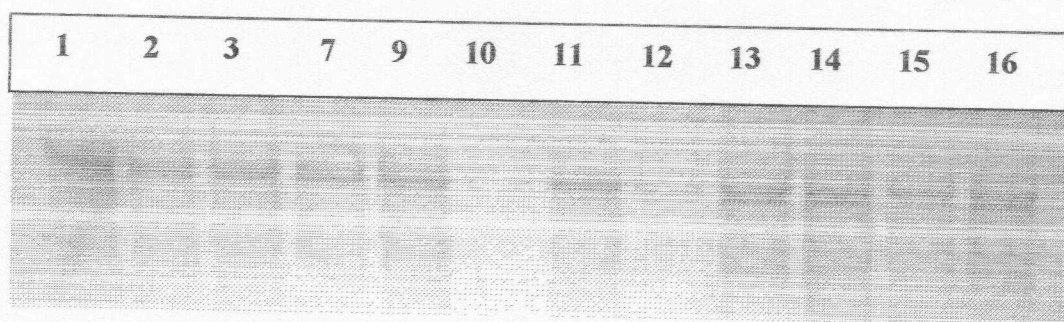


Figura 4. Padrão de variabilidade gerado por "primer" correspondente a região de 534 pb do gene mitocondrial 16S rRNA. Gel acrilamida 14%. 1e2 Pedreira SP., 3, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 Itamonte MG., 9 Jacutinga MG. * Híbridos amostra 1 e 2.

5. CONCLUSÕES

Os 3 haplótipos obtidos em 18 populações de *M. quadrifasciata quadrifasciata* indicam um provável intercâmbio de colônias ou rainhas ou variações climáticas e geográficas com diferentes adaptações

A não variação entre *Melipona quadrifasciata anthidioides* e o híbrido revelam a não correlação entre a característica listras abdominais e mtDNA. Também revalam possível ausência de heteroplasma. O que pode ser esclarecido, posteriormente, realizando-se o cruzamento controlado para se conhecer o perfil mitocondrial do híbrido e analisar se houve heteroplasma.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDAR, D. S., 1996. A mandaçaia: biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de *Melipona quadrifasciata*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética pp. 104
- ARIAS, M. C. (1992). Estudos sobre o mtDNA das abelhas *Apis mellifera* (Hymenoptera): Apoidea-Apidae. Tese de Doutorado., Ribeirão Preto SP. pp. 114.
- ATTARDI, G. (1985). Animal mitochondrial DNA: Na extreme example of genetic economy. **Int. Rev. Cytol.** **93**:93-145.
- AVISE, J. C. (1986). Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. **Phil. Trans. R. Soc. London B** **312**: 325-42.
- AVISE, J.C., ARNOLD, J., BALL, R. M., BERMIGHAM, E., LAMB, T., NIEGEL, J. E., REEB, C. A, SAUNDERS, N. C., (1987). Intraespecific phylogeographic: The mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics. **Ann. Ver. Ecol. Syst.**, **18**: 489-522.
- AZEREDO-ESPIN, A.M. L., SCHRODER, R. F. W., HUETEL, M. D., & SHEPARD, W. S. (1991). Mitochondrial DNA variation in geographic populations of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera; Chrysomelidae). **Experientia** **47**:483-485.
- BANNAI, M., TOKUNAGA, K., LIN, L., KUWATA, S., MAZDA, T., AMAKI, I., FUJIKAWA, K., & JUJI, T. (1994). Discrimination of human HLA-DRB1 alleles by PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) method. **Eur. J. Immunogenet.** **21**:1-9.

- BROWN, WM & WILSON, AC.(1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 1967-1971
- CAMERON, S. A , DERR, J. N., AUSTIN, A D., WOLLEY and WHARTON, R. A. (1992). The application of nucleotide sequence data to phylogeny of the hymenoptera: A Review. *J. Hym. Res.* **1** (1): 13-16.
- CLAYTON, D. A.(1984). Transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Ann. Rev. Biochem.* **53**: 573-94.
- FERREIRA, E. M., & GRATTAPAGLIA, D. (1998) **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3º ed. EMPRAPA-CENARGEM Brasília pp. 220.
- FUTUYMA, D. J., (1992) **Biologia Evolutiva**. 2ª ed. Sociedade Brasileira de Genética Ribeirão Preto pp. 646.
- GRAY, M. W. (1989). Origin and Evolution of Mitochondrial DNA. *Ann. Rev.Cell Biol.* **5**:25-50.
- HOSHINO, S., KIMURA, A., FUKUDA, Y., DOHI, K. and SASAZUKI, T.(1992). PCR-SSCP analysis of polymorphism in DPA1 and DPB1 genes: Simple and rapid method for histocompatibility test. *Human. Immunol.* **33**: 98-108.
- KERR, W. E., (1951). Bases para o estudo da genética de populações dos *hymenoptera* em geral e dos *Apinae* sociais em particular. **Tese de Livre Docência**. Piracicaba SP.
- KERR, W.E.; CARVALHO, G.A E NASCIMENTO, V.^a 1996. Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação. Ed. Fundação Acangaú, BH.-MG, 144 pp
- MARUYA, E., SAJI, H., & YOKOYAMA, S. (1996). PCR-LIS-SSCP (Low Ionic Strength Single-stranded Conformation Polymorphism) A simple method for high-resolution allele typing of HLA-DRB1, DQB1 and DPB1. *Genome Research* **6**: 51-57.
- MORITZ, C., DOWLING, T. E., BROWN, W. M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: Revelance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 269-92.
- MOURE, J. S. & KERR, W. E., 1950. Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apoidea) *Dusenía* **1** (2): 125-129.

- MOURE, J. S. (1975) Notas sobre as espécies de *Melipona* descritos por Lepeletier em 1836 (Hymenoptera, Apidae). **Rev. Brasil. Biol.**, **35**(4): 615-23.
- ORITA, M., IWAHANA, H., KANAZAWA, H., HAYASHI, & SEKIYA, T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **86**: 2766-2770.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. E., & MANIATS, T. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press-N.Y.
- WILSON, A. C., CANN, R. L., CARR, S. M., GEORGE, M., GYLLENSTEIN, U. B. (1985). Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biol. J. Linn. Soc.** **26**: 375-400.