



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

**Divergência Genética Interpopulacional em *Tetragonisca angustula*
Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**

Francis de Moraes Franco Nunes

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

Uberlândia - MG

Julho - 1999



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

**Divergência Genética Interpopulacional em *Tetragonisca angustula*
Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**

Francis de Moraes Franco Nunes

Orientador: Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr

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

Uberlândia - MG

Julho - 1999

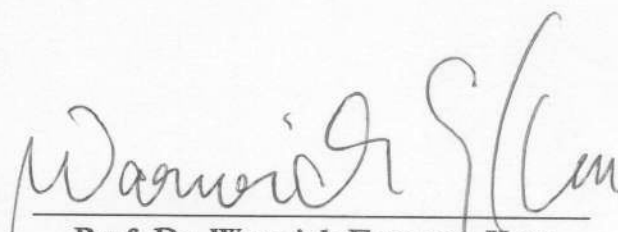
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Divergência Genética Interpopulacional em *Tetragonisca angustula*
Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)


Francis de Moraes Franco Nunes

Aprovada pela Banca Examinadora em 22/07/99

Nota 100.00



Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr
Orientador


Prof. MSc. Rosana de Cássia Oliveira
Orientadora


Prof. Dr.ª Ana Maria Bonetti
Co-orientadora


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

Uberlândia, 22 de julho de 1999.

Dedicatória

*Ao meu pai, José Antônio;
Aos meus irmãos, Francielle e Fernando;
Aos meus avós, João (in memoriam), Tereza,
Assunção, Maria Abadia e Inhá;
Aos meus tios e primos;*

Pela confiança depositada!

*Especialmente à minha mãe, Rosa Maria, pelo amor e
por aceitar e incentivar minhas escolhas.*

AGRADECIMENTOS

Não queria nesse momento ser injusto, esquecendo nomes que colaboraram comigo em minha formação profissional e da minha personalidade. No entanto, não posso deixar de agradecer aos nomes que agora vêm à minha mente! Desculpem-me ESQUECIDOS, porém MUITO OBRIGADO!!!

Ao amigo Carlos Gustavo Nunes Silva, por apresentar-me, em Santa Luzia do Itanhhy - SE, o fascinante mundo das abelhas.

À amiga e orientadora Rosana de Cássia Oliveira, pelos ensinamentos, apoio e constantes exemplos de boa conduta, determinação, responsabilidade, Você foi uma dádiva de Deus que cruzou o meu caminho. Todas as palavras seriam poucas para agradecer-lhe tudo que fez por mim até hoje.

Ao Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr, Cientista e Educador do século, pela formação político-científica, pelo modelo de cidadão, pelo irradiante amor à Ciência e ao Brasil e pela orientação desse trabalho. Obrigado pela paciência, por ter esperado tanto meu retorno, na qualidade de orientado.

À Profa. Dra. Ana Maria Bonetti, com quem convivi e aprendi muito em apenas 3 anos e 5 meses. A Senhora é realmente um exemplo a ser seguido. Honestidade, Ética, Sinceridade, Objetivos, Responsabilidade, (...) foram valores importantes que me foram transmitidos e que espero jamais esquecer. Por tudo isso, hoje sou muito feliz!

À Escola PÚBLICA que me ensinou desde a infância. À todos os meus professores, do pré-escolar à Universidade, por acreditarem na Educação como ferramenta transformadora da nossa (triste) realidade social. Persistam em seus ideais!

À família Bernardeli (Sr. Mauro, Da. Lúcia, Larissa, 'Mariinha' e Eduardo), por completarem o vazio de um estudante que mora longe de casa. Obrigado pela receptividade, simplicidade e horas de humor.

À amiga Kátia Bernardeli, meu braço direito desde o início do Curso. Fica difícil colocar aqui todos os sentimentos, sobretudo de gratidão, que lhe devo. Estivemos juntos dos momentos tristes aos mais felizes, enfrentamos obstáculos pessoais, mas nos aceitamos acima de tudo. Você é muito especial e que "DEUS LHE PAGUE" !

À amiga Ana Paula de Oliveira Ribeiro, pela convivência sadia, pela sinceridade constante, pelas experiências de vida... Obrigado por todas as lições (desculpe-me, nem sempre fui um bom aluno). Obrigado à Da. Eliana, pelos 'papos-cabeça'.

Ao amigo Rodrigo Lemes Martins... nossas diferenças nos completam, traduzindo-se em crescimento pessoal. Obrigado por muitas vezes ter contestado-me, o que me possibilitou enxergar novos paradigmas. Se hoje sou uma pessoa um pouco melhor, devo muito a você.

À CAPES, por ter inventado o Programa Especial de Treinamento, talvez a maior conquista de minha vida!

Ao PET/BIOLOGIA, minha PRIORIDADE NÚMERO 1. O que eu idealizei na Carta de Intenção apresentada ao Grupo, antes da seleção, foi muito pouco frente ao que este Programa pôde oferecer-me e as possibilidades que juntos pudemos criar.

Aos amigos do PET/BIOLOGIA, por terem que escutar alguém tão prolixo. Quantas histórias temos pra contar e lembrar! Obrigado: Bárbara, Fernando Biase, Elisângela, Luciana Paiva, Laiena, Braynner, Priscila, Cristiane, Kaila, Wilson, Raquel, Fernando Lourenço, Jaqueline, Carlos Roberto, Luciana Londe e Bruno. Vocês fazem parte de uma passagem muito especial da minha vida.

Aos amigos da 42ª Turma de Ciências Biológicas, especialmente à Tatyana, Andreia, Francislene e Fabiane Sebaio, pela amizade, infindáveis horas de estudo e humor.

A todos os amigos do Laboratório de Genética, pelo conhecimento transmitido e compartilhado. Ressalvo aqui as boas risadas que demos juntos, que acabaram minimizando meu *stress*. Ao Laboratório em si, pelo instrumental e aparelhagem necessários para a execução deste trabalho.

A todos os meus grandes amigos de ITUIUTABA-MG, especialmente André e Aziz, por entenderem minha ausência e pelos bons momentos que 'curtimos' juntos!

A DEUS, pela vida e por tudo isso que relatei acima. Obrigado pelo aperto de mão nas horas mais difíceis da minha caminhada!

Somente as lágrimas que escorreram, puderam traduzir silenciosamente a veracidade de minhas palavras. Obrigado a todos!

SUMÁRIO

ABREVIações.....	v
RESUMO.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 - Sobre abelhas.....	01
1.2 - <i>Tetragonisca angustula</i>	03
1.3 - Biologia molecular.....	07
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 - Material biológico.....	11
3.2 - Extração de DNA.....	13
3.3 - Qualificação e quantificação do DNA e preparação de soluções de trabalho.....	14
3.4 - Amplificação do DNA por RAPD.....	14
3.5 - Análise de dados.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5. CONCLUSÕES.....	25
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

ABREVIATÖES

%	por cento (porcentagem)
°C	grau(s) Celsius
µL	microlitro(s)
µM	micromolar
2n	diplóide
ABS	absorbância
MgCl ₂	cloreto de magnésio
cm	centímetro(s)
cM	centimorgan(s)
dATP	5'-desoxiadenosina trifosfato
dCTP	5'-desoxicitosina trifosfato
dGTP	5'-desoxiguanosina trifosfato
dNTP	5'-desoxinucleotídeo trifosfato
dTTP	5'-desoxitimidina trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etilenodiaminotetra acético sal dissódico
h	hora(s)
HCl	ácido clorídrico
KCl	cloreto de potássio
M	molar
Mers	bases em fitas simples
mg	miligrama(s)
min	minuto(s)
mL	mililitro(s)
mM	milimolar
mm	milímetro(s)
n	haplóide
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanograma(s)
nm	nanômetro(s)
pb	pares de base
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	pico-mol
RNAse A	ribonuclease-A
rpm	rotações por minuto
sec	segundo(s)
SDS	dodecilsulfato de sódio
U	unidade(s) de enzima
UV	ultra-violeta
UPGMA	unweighted pair-group method using arithmetic averages
V	volts
X	fator de concentração de solução

RESUMO

Tetragonisca angustula (jataí) apresenta uma das mais amplas distribuições entre os Meliponíneos, abrangendo praticamente toda a América do Sul, Central e México. A técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) tem sido utilizada na caracterização de populações, detecção de polimorfismos genéticos, análises filogenéticas e, inclusive, confirmação de taxonomia baseada em dados morfológicos. Esse trabalho objetivou-se estimar a diversidade genética entre populações de *T. angustula* de três regiões (Triângulo Mineiro/MG: Uberlândia 1, 2, 3, 4 e 5, Ituiutaba 1, 2 e 3 e Uberaba 1 e 2; Sul de Minas/MG: São Miguel do Anta 1, 2, 3, 4 e 5; Argentina: Aristóbulo del Valle e Posadas 1 e 2), usando *Tetragona clavipes* como *outgroup*. Foram feitos *bulks* com 5 indivíduos por local de amostragem, utilizando-se 15 *primers* (13 curtos e 2 longos) com as seguintes condições de reação: 10ng de DNA, 10pmoles de *primer*, 2mM de MgCl₂, 1.5U de *Taq* DNA polimerase, 100µM de cada dNTP, 50mM de KCl e 10mM de Tris-HCl pH 8.0. Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose 1.2% e fotografados. Os resultados foram analisados pelo método de porcentagem de desacordo e análise de *cluster* por UPGMA. Ao nível de 16.2%, as amostras de jataí foram divididas em duas clades: uma correspondente à região do Triângulo Mineiro e outra para as amostras da Argentina e Sul de Minas que, por sua vez, se divergiram em 2 grupos a 14.2%. As amostras do Triângulo Mineiro apresentaram divergência máxima de 6.5%, com 3 genótipos (dois de Uberlândia e um de Ituiutaba) que não apresentaram dissimilaridade genética. As amostras do Sul de Minas apresentaram divergência genética máxima de 4.4% e as da Argentina de 5.5%. *Tetragona clavipes* divergiu em 69% das amostras de *T. angustula*. Os valores encontrados para *T. angustula* foram similares aos encontrados na literatura dentro de uma mesma região (Triângulo Mineiro). No entanto, para regiões geograficamente distantes (Sul de Minas e Triângulo Mineiro), os valores encontrados foram superiores. Isto pode ser devido ao uso de DNA proveniente de *bulks* de cinco indivíduos, diferenças na *Taq* DNA polimerase e nos protocolos de extração. Novas estimativas da divergência para esta espécie usando-se *bulks* com maior número de indivíduos e maior número de *primers* forneceriam dados conclusivos sobre o número mínimo amostral por localidade e taxa de dissimilaridade genética padrão para a espécie.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Sobre abelhas

A grande preocupação com a preservação dos ambientes naturais leva, hoje, muitos pesquisadores a estudarem os sistemas biológicos de várias espécies, sejam elas animais, vegetais ou microorganismos, na tentativa de conhecê-las antes de uma possível extinção ou ainda fazer destes estudos ferramentas úteis para mantê-las presentes no planeta, assim como entender suas relações na natureza.

Entre as inúmeras espécies em questão, encontram-se os insetos que, apesar da abundância de populações e espécies, chegaram a um estado crítico de sobrevivência, colocando assim, outros organismos em risco, devido às várias interações dentro de comunidades e ecossistemas.

Pertencentes aos insetos (ordem Hymenoptera), as abelhas, cujos fósseis mais velhos datam do Cretáceo, estão intimamente relacionadas ao aparecimento das Angiospermas (CRUZ-LANDIM, 1960). Dentre essas, muitas espécies estão ameaçadas pela ação antrópica que altera os habitats naturais por meio de desmatamentos, uso indiscriminado de agrotóxicos e ação predatória de meleiros, além da concorrência com *Apis mellifera* (BALESTIERI, 1989; KERR *et al.*, 1996).

As abelhas sem ferrão brasileiras, classificam-se na subfamília Meliponinae. WILLE (1983) relata descobertas recentes de fósseis europeus por KELNER-PILLAULT, do início do Terciário, sugerindo que os Meliponíneos surgiram na África, portanto, não se restringindo às Américas. A hipótese que tem sido mais aceita é de KERR e MAULE (1964) que consideram a América do Sul como o centro de origem e dispersão das abelhas sem ferrão. Os motivos que sustentam essa hipótese são: o grande número de espécies encontradas nas Américas em comparação à Ásia e

África, presença das espécies mais primitivas (n=9) e também as mais especializadas, demonstrando que tiveram mais tempo para diversificação.

A situação é preocupante quando se refere à diminuição ou extinção de populações e espécies de Meliponíneos, responsáveis por 40 a 90% da polinização de regiões de vegetação nativa, dependendo do ecossistema. Um exemplo é a destruição, cada vez mais acelerada, das florestas nordestinas, em especial a Mata Atlântica e, na mesma medida, o fim das populações de tais abelhas (KERR *et al.*, 1996).

Nos meliponíneos, o comportamento classificado como eusocial, com relação ao tamanho de colônias, diferença entre rainha e operária, arquitetura do ninho, complexidade de códigos de comunicação, entre outros, é bem próximo ou semelhante ao de *Apis mellifera* (SAKAGAMI, 1971 *apud* BALESTIERI, 1989).

Os Meliponinae, há muitos anos, foram domesticados pelos povos pré-colombianos que lhes deram nomes ainda vigentes na cultura popular brasileira. Neste grupo de abelhas conhece-se mais de 300 espécies, das quais pelo menos 100 correm risco de extinção. A atual classificação zoológica sugere que esta subfamília subdivida-se em duas tribos: Meliponini e Trigonini (KERR *et al.*, 1996).

A haplodiploidia característica das abelhas é uma ferramenta valiosa para estudos de genética, sobretudo variabilidade e manutenção de polimorfismos, visto que a segregação alélica dos machos (haplóides) reflete o genótipo da fêmea (diplóide) que os originou (FALCÃO, 1984). Dados apontam para uma diminuição da heterozigosidade nos insetos haplodiplóides, quando comparados com os diplodiplóides (AIDAR, 1999)

1.2 - *Tetragonisca angustula*

Tetragonisca é um dos 53 gêneros atuais da tribo Trigonini que se destaca pela ampla distribuição geográfica, abrangendo praticamente toda a América do Sul, Central e México (BALESTIERI, 1989; FERREIRA, 1993; NOGUEIRA-NETO, 1970).

As espécies mais conhecidas são *Tetragonisca angustula* Latreille, *Tetragonisca buchwaldi* Friese e *Tetragonisca pfeifferi* Friese (MICHENER, 1990).

Com relação à *Tetragonisca angustula* conhecem-se as subespécies *Tetragonisca angustula angustula* Latreille e *Tetragonisca angustula fiebrigi* Schwarz, sendo que esta última restringe-se ao Estado de Santa Catarina, parte do Paraná, Argentina, Paraguai e Vale do Rio Paraná em São Paulo (NOGUEIRA-NETO, 1970).

A espécie *Tetragonisca angustula* possui comportamentos muito peculiares quanto à reprodução, enxameagem, principalmente com relação à fisiologia comportamental de operárias e rainhas virgens (FERREIRA, 1993).

NOGUEIRA-NETO (1997) observou um processo de enxameação em *Tetragonisca angustula* que durou cerca de 110 dias, tempo bastante longo quando comparado, por exemplo, a *Plebeia droryana*, em torno de 15 dias.

MELLO (1981) estudou a bionomia de *Tetragonisca angustula*, descrevendo relações simples entre as castas. A existência de corte das operárias à rainha foi observada e esta, por sua vez, não possui, na colméia, local preferencial de permanência. As operárias, mesmo em condições normais da colônia, também podem ovipor. A autora compara as características etológicas de *Tetragonisca angustula* com outros Trigonini estudados e verifica uma grande semelhança com *Tetragona* e *Cephalotrigona*.

GROSSO e BEGO (1992) estudaram divisão de trabalho entre operárias de *Tetragonisca angustula angustula*, considerando a relação idade do indivíduo e atividade por ele realizada. Verificou-se que o *grooming* é a atividade de maior frequência, estendendo-se dos primeiros dias de vida até cerca do 55º dia. Outras atividades apresentam duração variável: visitas aos potes de alimento – 50 dias, contato bucal – 49 dias, trabalho com cerume – 30 dias, trabalho com resina – 29 dias, trabalho com lixo – 29 dias, participação no processo de provisionamento e postura das células de cria (POP) – 15 dias. As operárias de *Tetragonisca angustula angustula* iniciam o trabalho de campo no 16º dia de vida, continuando até o 55º dia.

A longevidade média alcançada pelas operárias de *Tetragonisca angustula angustula* foi de 21.90 ± 10.97 dias.

AIDAR (1999) em experimentos de formação de colônias filhas, observou que as rainhas virgens de *Tetragonisca angustula angustula* levaram, em média, 20.9 dias para acasalarem-se e iniciarem a postura.

PIGNATA e STORT (1992) estudaram a quantidade relativa de coleta de polén em 4 espécies de *Melipona*, *Scaptotrigona postica* e *Tetragonisca angustula*. Entre as melíponas, o transporte de polén é equivalente a 15% do peso da abelha. A proporção nos Trigonini é maior, sendo 19.3% para *S. postica* e 33.7% para *Tetragonisca angustula*.

CORTOPASSI-LAURINO (1989) relata a produtividade de *Tetragonisca angustula* durante todo o ano. A autora observou a visita dessa abelha a 32.6% das 190 plantas melíferas estudadas em uma região do Estado de São Paulo. A atividade de jataí é tão intensa que freqüentemente pilha ninhos fracos de *Paratrigona subnuda* e *Melipona quadrifasciata*.

As populações de *Tetragonisca angustula* adaptam-se às mais variadas condições físicas e climáticas (BALESTIERI, 1989), com boa qualidade de regulação de temperatura na área da cria e expressiva faixa de tolerância térmica (-1 a 41°C), tanto no inverno quanto no verão (PRONI, 1987).

Segundo PRONI (1987), *Tetragonisca angustula* comporta-se como poiquilotérmicos típicos, aumentando a taxa respiratória com a elevação da temperatura. A termorregulação, no entanto, é diferente entre as duas subespécies: para *Tetragonisca angustula fiebrigi* a faixa ótima no inverno varia entre 15 a 25°C e no verão, 25 a 30°C, enquanto que, para *Tetragonisca angustula angustula*, o melhor ajustamento térmico situa-se na faixa de 25 a 30°C no inverno e 40°C no verão.

Alguns parâmetros climáticos influenciam a atividade externa destas abelhas, sendo a temperatura, a intensidade luminosa e umidade relativa os mais importantes na atividade de vôo. Os indivíduos de *Tetragonisca angustula* não saem das colméias a baixas temperaturas, mesmo com boa intensidade luminosa (IWAMA, 1977).

KNOLL (1985) destaca que condições meteorológicas, principalmente temperatura e pluviosidade, provocam a variação do número de indivíduos em atividade externa na colônia.

Jataí, como é conhecida popularmente a espécie, é uma das abelhas indígenas sem ferrão mais conhecidas e mais facilmente encontradas no território brasileiro, inclusive em centros urbanos, onde nidifica com alta frequência por possuir hábitos de nidificação pouco exigentes, bastando um lugar onde haja uma cavidade suficiente para construção de seu ninho (BALESTIERI, 1989; FERREIRA, 1993).

A estrutura interna do ninho de *Tetragonisca angustula* apresenta pequenos potes medindo cerca de 1.5 cm de altura, onde são estocados mel e pólen; favos de cria horizontais ou helicoidais e células reais na periferia. O ninho apresenta também um invólucro bastante desenvolvido e a entrada é constituída de um tubo de cerume maleável, amarelado (BALESTIERI, 1989).

Em estudos na região entre Piracicaba e Rio Claro / São Paulo, LINDAUER e KERR (1960) descreveram que as colônias são geralmente populosas, contendo de 2000 a 5000 indivíduos.

NOGUEIRA-NETO (1997) incentiva a criação de jataí, por ser uma abelha muito higiênica, resistente, fácil de manter e multiplicar, além de produzir um mel que praticamente dispensa pausterização.

O mel desta abelha é muito apreciado pelas populações rurais e é utilizado, empiricamente, no tratamento de doenças como glaucoma e catarata (IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 1984a).

BAZLEN (1997) *apud* AIDAR (1999) demonstrou ação bactericida do mel de *Tetragonisca angustula angustula* quando colocados em meios de cultura para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Em *Tetragonisca angustula*, o pH médio do mel é 4.2, possuindo coloração muito variada entre as colméias, de praticamente incolor a castanho-escuro, onde encontram-se presentes glicose, frutose, galactose, maltose, lactose, sacarose, melezitose e refinose (IWAMA, 1977), além de água, proteínas, enzimas e sais minerais.

KNOLL (1985) constatou que a proporção de indivíduos de *Tetragonisca angustula* encontrados com néctar foi maior no verão, com pólen no outono, sendo a coleta de resina, maior no inverno.

Em estudos realizados no *Campus* da Universidade de São Paulo (USP/SP), e na área urbana da cidade de São Paulo, foi comprovado que *Tetragonisca angustula*, segundo seus hábitos de coleta de mel e pólen, é a terceira espécie mais

abundante no local, atrás, apenas, de *Trigona spinipes* e *Apis mellifera* (IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 1984b; KNOLL, 1985, 1990).

RABELO (1997) estudando interação abelha-planta na Reserva Ecológica do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia-MG, considerou *Tetragonisca angustula*, entre outras espécies levantadas, como politróficas, por coletar néctar e/ou pólen em diversos recursos florais. Em seus dados, esta espécie aparece como o terceiro apídeo mais freqüente na Reserva (12.8%), atrás de *Apis mellifera* (56%) e *Trigona spinipes* (13.7%).

É notável o sucesso de dispersão da jataí, sobretudo em áreas urbanas. Contando com um expressivo número de alelos sexuais, os efeitos da endogamia são menos prováveis de ocorrer. KERR (1994) relata que em Ribeirão Preto, o número de colméias de jataí é muito grande, facilitando a vida dos meliponicultores que criam essa abelha, bastando ter apenas uma colônia em suas casas, visto que a área de reprodução possui muito mais do que as 44 colônias de meliponíneos sugeridas por KERR e VENCOVSKY (1982).

KERR e SILVEIRA (1972) estudaram o cariótipo de várias espécies de meliponíneos, encontrando $2n=34$. POMPOLO (1992) refez análise citogenética em espécies de Meliponinae, confirmando tais dados, e acrescentou o predomínio de cromossomos submetacêntricos e metacêntricos para essa espécie.

O controle genético da glicerol-3-fosfato desidrogenase é feito, na maioria dos insetos, por dois *loci*: um gene que se expressa durante todo o desenvolvimento (G-3-PDH1) e outro, típico da fase adulta (G-3-PDH2). CONTEL *et al.* (1992) estudaram essa enzima em 21 espécimes pertencentes a 12 gêneros de meliponíneos detectando polimorfismo no *locus* G-3-PDH1 em *Tetragona clavipes* e *Tetragonisca angustula angustula*; polimorfismo do G-3-PDH2 foi detectado, também, em jataí.

FALCÃO (1984) encontrou homologia genética em *Tetragonisca angustula angustula* e *Tetragonisca angustula fiebrigi* para a enzima málica, alfa-glicerofosfato desidrogenase, fosfoglicomutase, superóxido dismutase, isocitrato desidrogenase, peptidases, leucina aminopeptidases e malato desidrogenase.

1.3 - Biologia molecular

BECKMANN (1988) *apud* FERREIRA e GRATTAPAGLIA (1998) enfoca a mudança de paradigma genético, da GENÉTICA MENDELIANA (análise de genótipos a partir de fenótipos) para a atual GENÉTICA GENÔMICA (análise direta das variações do DNA).

Com o advento da Biologia Molecular, as técnicas de trabalho com DNA constituem exímias ferramentas em estudos aprofundados de genética, além de diversidade e dinâmica de populações e estudos de evolução pela capacidade de inferir dados filogenéticos.

KARY MULLIS, na década de 80, desenvolveu a tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), que lhe valeu o Prêmio Nobel de Química em 1993. Tal técnica utiliza-se de uma polimerase termoestável (*Taq* DNA polimerase) que atua na amplificação de fragmentos de DNA.

Em 1990, em estudos independentes, WILLIAMS *et al.* e WELSH e McCLELLAND, utilizaram *primers* de seqüências arbitrárias, de poucos pares de base, que flanqueiam várias regiões complementares no DNA em estudo. A técnica foi denominada por DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*) ou AP – PCR (*Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction*).

A técnica de RAPD, baseada na amplificação de segmentos genômicos múltiplos ao acaso, a partir de *primers* arbitrários, tem sido muito utilizada devido à sua rapidez e facilidade. Ela tem sido empregada para caracterizar populações, análises de *pedigree*, estudos filogenéticos, mapeamento genético e melhoramento de plantas e animais domésticos (VALENTINI *et al.*, 1996).

WILLIAMS *et al.* (1990) relatam que diferenças de apenas um par de bases são suficientes para não haver anelamento dos *primers*.

Diz-se que a técnica RAPD apresenta dominância dos marcadores, ou seja, para um indivíduo homozigoto dominante para um determinado alelo, amplificam-se dois fragmentos de mesmo peso molecular, que se sobrepõem. Da mesma forma, para os heterozigotos, há amplificação de apenas um alelo, com o mesmo peso molecular, porém o fragmento gerado migrará como os do homozigoto. Neste caso, apenas os homozigotos recessivos podem ser diferenciados devido à não amplificação de nenhum dos alelos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Na literatura, diversos trabalhos com marcadores RAPD têm sido encontrados, sobretudo com relação à utilidade para confirmação da taxonomia baseada em caracteres morfológicos de muitas espécies. KAZAN *et al.* (1993) estudaram o parentesco genético e variação em *Stylosanthes guianensis* (LEGUMINOSAE), GONZÁLEZ e FERRER (1993) estudaram polimorfismos em *Hordeum* sp e HOWELL *et al.* (1994) utilizaram a técnica de RAPD para identificação e classificação de *Musa* sp .

HUNT e PAGE (1992) utilizaram amplificação ao acaso de fragmentos de DNA polimórficos (RAPD) a partir de cruzamentos artificiais de machos e rainhas de *Apis mellifera*. Eles definiram padrões de herança para insetos haplodiplóides, classificados em 4 tipos de polimorfismos: tamanho de fragmentos, manifestação de bandas diplóide-específicas, presença/ausência de banda e intensidade de bandas. Os dois últimos tipos são herdados de maneira dominante, observando segregação mendeliana na progênie haplóide e diplóide.

Marcadores RAPD mostram-se muito eficientes no mapeamento genético. No clássico de HUNT e PAGE (1995) foram mapeados 3110 cM do genoma de *Apis mellifera*, verificando grupos de marcadores ligados. Estimaram em aproximadamente 3450 cM o tamanho total do genoma e observaram uma taxa de recombinação muito alta para esta abelha.

STILES *et al.* (1993), estudando parentesco entre cultivares de mamão (*Carica papaya* L.) por RAPD, consideraram a técnica rápida, precisa e sensível para análises genômicas.

SCHIERWATER e ENDER (1993) utilizaram 13 marcas comerciais diferentes de DNA polimerase termoestável, encontrando diferenças quantitativas e qualitativas nos padrões de amplificação obtidos a partir das várias combinações testadas.

MEUNIER e GRIMONT (1993) testaram a reprodutibilidade da técnica utilizando dois termocicladores, três marcas de DNA polimerase termoestável, DNA de três espécies de bactérias e encontraram diferenças nos padrões de amplificação. Sugeriram que os dados resultantes de RAPD somente são confiáveis com a padronização da técnica, incluindo otimização das concentrações dos reagentes e utilização constante da mesma aparelhagem.

WEEDEN *et al.* (1992) analisaram a reprodutibilidade dos fenótipos RAPD em ervilhas e maçãs, variando as concentrações dos produtos de amplificação de DNA.

Concluíram que tais modificações produzem diferenças nos padrões de bandas, mas a técnica foi útil na identificação de variedades e construção de mapas genômicos.

Na agricultura, marcadores RAPD têm sido usados na caracterização de germoplasmas, facilitando a escolha dos indivíduos para cruzamento e a conseqüente expressão de bons híbridos.

O número de *primers* a serem usados numa análise de polimorfismo deve estar relacionado aos modos de reprodução, sistemas de cruzamento e níveis de variação genética das espécies estudadas. Isto porque, para espécies muito polimórficas talvez não haja necessidade da utilização de muitos *primers*, contrastando, porém, com o grande número de *primers* requeridos para análise de indivíduos resultantes de propagação vegetativa (LIU *et al.*, 1994). WILKIE *et al.* (1993) ressaltam que o perfil de bandas do RAPD não se torna mais complexo com o aumento de tamanho do genoma.

Em Meliponinae, encontram-se poucos estudos sobre variabilidade por marcadores RAPD. OLIVEIRA (1998) em estudo sobre divergência genética por marcadores RAPD em *Tetragonisca angustula*, provenientes de 3 países (Brasil, Argentina e Panamá), estimou a distância genética entre populações de diferentes locais. A 13% de dissimilaridade genética houve a formação de duas clades (entituladas de grupos 1 e 2). Encontrou-se uma distribuição geográfica mais abrangente para o grupo 2, correspondente a *Tetragonisca angustula fiebrigi*, do que o relatado pela literatura, além de marcadores moleculares que discriminam estes 2 grupos.

2. OBJETIVOS

Estimar a divergência genética, por marcadores RAPD, em populações de *Tetragonisca angustula* e correlacionar as taxas encontradas com outros dados de polimorfismo já descritos para a espécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material biológico

Coletou-se operárias campeiras, na entrada das colônias, utilizando-se puçá. As amostras foram fixadas imediatamente em álcool absoluto, ou levadas diretamente ao freezer - 80°C. No total, trabalhou-se com 18 colônias de *Tetragonisca angustula* e uma de *Tetragona clavipes*, esta última funcionando como *outgroup*. As amostras da Argentina correspondem à *Tetragonisca angustula fiebrigi*, enquanto as amostras do Estado de Minas Gerais (Sul e Triângulo) são *Tetragonisca angustula angustula*. A tabela 1 resume os dados das colônias.

TABELA 1: Localidade e identificação das amostras de *Tetragonisca angustula* e *Tetragona clavipes* utilizadas no estudo.

AMOSTRA	LOCALIDADE	COLETOR	CÓDIGO
<i>Tetragonisca angustula</i>	Uberlândia (MG)	Bloco 2H Campus Umuarama/UFU	Franco-Nunes, F. M. Uberlândia 1
		Horta experimental Campus Umuarama/UFU	Nunes-Silva, C. G. Uberlândia 2
		Bairro Umuarama	Antunes, L. Uberlândia 3
		Orelhão Bloco 2B Campus Umuarama/UFU	Franco-Nunes, F. M. Uberlândia 4
		Almoxarifado Campus Umuarama/UFU	Franco-Nunes, F. M. Uberlândia 5
	Ituiutaba (MG)	Bairro Marta Helena	Muniz, C. Ituiutaba 1
		Bairro Marta Helena	Muniz, C. Ituiutaba 2
		Fazenda UEMG	Muniz, C. Ituiutaba 3
	Uberaba (MG)	*	Grissom, R. A. Uberaba 1
		*	Grissom, R. A. Uberaba 2
	São Miguel do Anta (MG)	20°43'666" S/42°44'862" W	Bezerra, J. M. D. São Miguel do Anta 1
		20°41'104" S/42°43'441" W	Bezerra, J. M. D. São Miguel do Anta 2
		20°42'535" S/42°43'297" W	Bezerra, J. M. D. São Miguel do Anta 3
		20°43'066" S/42°44'862" W	Bezerra, J. M. D. São Miguel do Anta 4
		20°40'104" S/42°43'441" W	Bezerra, J. M. D. São Miguel do Anta 5
Aristóbulo del Valle (Argentina)	*	Pascual, N. A. Aristóbulo de Valle	
Posadas (Argentina)	*	Pascual, N. A. Posadas 1	
	*	Pascual, N. A. Posadas 2	
<i>Tetragona clavipes</i>	Bloco 2D Campus Umuarama/UFU	Franco-Nunes, F. M. <i>Tetragona clavipes</i>	

* - localidade desconhecida

3.2 - Extração de DNA

Antes de iniciar a extração, utilizou-se lupa para análise das patas posteriores de cada abelha, afim de confirmar, pela morfologia da unha, não-bifurcadas, se os indivíduos eram operárias. Os machos apresentam unhas bífidas. Cada colônia foi representada por um *bulk* de 5 abelhas operárias. Os indivíduos conservados em álcool, foram reidratados em tampão (TrisCl 0.01M, pH 8.0, NaCl 0.1M e MgCl₂ 0.001M), para retirar o excesso de álcool.

Para extração de DNA genômico dos *bulks*, utilizou-se o protocolo de PAXTON *et al.* (1996), com modificações:

- 1 - Cinco abelhas foram colocadas em cadinhos de porcelana, adicionando-se nitrogênio líquido e maceradas em seguida;
- 2 - Adicionou-se 500µL de Tampão SET (NaCl 0.15M, Tris-HCl 0.02M, EDTA 1mM pH 8.0), transferindo o material para microtubo estéril de 1.5mL;
- 3 - Adicionou-se em cada microtubo 18µL de proteinase K (10mg/mL) e 22µL de SDS 25%, homogenizando a solução em vórtex, e incubando-a por 2h a 55°C;
- 4 - Adicionou-se 15µL de RNase por microtubo e incubou-se por 1h a 37°C;
- 5 - Adicionou-se 430µL de NaCl 5M por microtubo, centrifugando o material em seguida, por 10min a 13000rpm;
- 6 - O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1.5mL, adicionando-se 215µL de Tris-HCl (0.01M pH 8.0) por microtubo;
- 7 - Completou-se o volume dos microtubos com etanol 99.5% (-20°C), estocando o material em freezer -20°C por 2h ou *overnight*;
- 8 - Centrifugou-se os microtubos por 15min a 13000rpm; retirando-se em seguida o etanol 99.5% e acrescentando-se 500µL de Tris-HCl (0.01M pH 8.0) para ressuspender o *pellet* e completando o volume do tubo com fenol, homogeneizando o material em vórtex e centrifugando-se, em seguida, por 5min a 10000rpm;
- 9 - O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o volume completado com clorofil (clorofórmio/álcool isoamil, 24:1, respectivamente), homogeneizando o material em vórtex e centrifugando-se, em seguida, por 5min a 10000rpm;
- 10 - Transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo, repetindo-se o passo 7;

11 - Retirou-se o etanol 99.5% e adicionou-se etanol 70% (-20%), invertendo-se os microtubos para lavar bem o *pellet* e centrifugando-se, em seguida, por 15min a 13000rpm;

12 - Retirou-se cuidadosamente o etanol 70% afim de não deslocar o *pellet*, deixando o material secar a vácuo por, no mínimo, 3h ;

13 - Redissolveu-se o *pellet* em 100 μ L de Tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM).

3.3 - Qualificação e quantificação do DNA e preparação de soluções de trabalho

Confirmou-se a qualidade das amostras em gel de agarose 0.8%. A quantificação do DNA foi feita em espectrofotômetro para leitura de absorbância a 260nm, utilizando-se 10 μ L de cada amostra diluídos 100 vezes em água ultra-pura. Calculou-se a concentração de DNA a partir da fórmula:

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

Em seguida as amostras de DNA foram diluídas para uma concentração de 5ng/ μ L e constituíram as soluções de trabalho.

3.4 - Amplificação do DNA por RAPD

Por meio de uma bateria de reações, utilizando-se duas amostras de localidades diferentes, selecionou-se *primers* longos e curtos (10 Mers, da Operon Technologies). Assim, utilizou-se 15 *primers* informativos, ou seja, que denotaram um bom padrão de bandas para posterior análise. Os *primers* utilizados e suas respectivas seqüências estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2: *Primers* utilizados e suas respectivas seqüências de nucleotídeos.

	<i>Primers</i>	Seqüência (5' → 3')
CURTOS	OPC 12	TGTCATCCCC
	OPC13	AAGCCTCGTC
	OPC 14	TGCGTGCTTG
	OPC18	TGAGTGGGTG
	OPF 09	CCAAGCTTCC
	OPL 04	GACTGCACAC
	OPM 08	TCTGTTCCCC
	OPT 11	TTCCCCGCGA
	OPU 01	ACGGACGTCA
	OPU 05	GGGTTTGGCA
	OPV 02	AGTCACTCCC
	OPV 03	CTCCCTGCAA
	OPZ 13	GACTAAGCCC
LONGOS	MAU B2	GCCAGGCAGCAAGTTCTCAGTAAT
	MAU 502	CAGCATTTCAGGGCTAACATC

Cada reação de amplificação continha um volume final de 20 μ L, com:

Mix para cada reação da PCR

10.2 μ L de água ultrapura,

2 μ L de Tampão (Taq) 10X

2 μ L de dNTPs 4mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

1 μ L de MgCl₂ 10mM/ μ L

2.5 μ L de primer 4pmol/ μ L

0.3 μ L de Taq DNA polimerase 5U/ μ L

2 μ L de DNA 5ng/ μ L

Acrescentou-se uma gota de óleo mineral (~20µL) para evitar a evaporação da solução.

Foram feitas amplificações do material em termociclador M. J. Research Inc., modelo PTC 100, por meio dos seguintes passos:

3 ciclos	DESNATURAÇÃO: 94°C/1min ANELAMENTO DOS <i>PRIMERS</i> : 35°C/1min EXTENSÃO DAS FITAS: 72°C/2min
34 ciclos	DESNATURAÇÃO: 94°C/10sec ANELAMENTO DOS <i>PRIMERS</i> : 40°C/20sec EXTENSÃO DAS FITAS: 72°C/2min
Fase final	EXTENSÃO FINAL DAS FITAS: 72°C/5min

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1.2% com tampão Tris-borato EDTA (TBE) 0.5X. O corante de DNA foi brometo de etídio, adicionando-se 1µL em cada 100mL de gel. Os resultados foram visualizados após 2 horas de corrida a 150V, em transiluminador UV e fotografados em VDS Image System – Pharmacia.

As reações contiveram um controle negativo com todos os produtos das reações, exceto DNA, para verificar se os reagentes não estavam contaminados com DNA exógeno.

Repetiu-se as amplificações afim de comprovar os padrões de bandas.

3.5 - Análise de dados

A partir das bandas obtidas foi montada uma matriz binária (1 – presença de banda e 0 – ausência de banda) para análise de distância genética pelo método de Porcentagem de Desacordo e análise de *cluster* pelo Método Não-ponderado de Agrupamento aos Pares (UPGMA), com o auxílio do programa STATISTICA 4.5A. Estimou-se a divergência genética entre as 18 colônias de *Tetragonisca angustula angustula* e de *Tetragona clavipes*, esquematizando-a por meio de dendrograma:

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo de extração de DNA seguido ___ PAXTON *et al.* (1996)___ é rápido e não utiliza produtos tóxicos. No entanto, a qualidade do DNA observada por meio do *pellet* nos *bulks* não foi comum, apresentando-se "sujo", quando deveria ser transparente. Observou-se dificuldade em ressuspender o *pellet*, notando-se muitos fragmentos compactados. A quantidade de DNA extraída também foi relativamente inferior, comparada com dados obtidos com o uso de outros protocolos em etapas preliminares. As modificações feitas no protocolo foram as inclusões de RNase, fenol e clorofil (passos 4, 8 e 9, respectivamente), comuns em outros protocolos e ausente neste. Feitas as modificações, o presente protocolo tornou-se eficiente na extração de DNA das amostras estudadas.

Vários trabalhos têm ressaltado a dificuldade na análise das bandas polimórficas e monomórficas produzidas por RAPD, visto que dois fragmentos de mesmo peso molecular, comum entre duas ou mais amostras, podem significar um alelo homólogo (herdado do ancestral) ou homoplásico (aparecimento independente na população). Assim como em outras classes de marcadores moleculares, encontra-se dificuldade na análise e interpretação das bandas geradas. Na análise de RAPD deve haver flexibilidade do pesquisador em selecionar os marcadores mais informativos, ou seja, que apresentam melhor nitidez (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Dessa forma, considerando apenas bandas intensas, pode-se verificar uma alta taxa de polimorfismo em *Tetragonisca angustula* e *Tetragona clavipes*, para cada *primer* analisado. Os 15 *primers* utilizados geraram 142 posições de bandas informativas (Tabela 3), uma média de 9.46 posições de bandas por *primer*, das quais 125 (88.03%) evidenciaram polimorfismos. Desconsiderando o *outgroup*,

foram detectadas 101 posições de bandas para *T. angustula*, com 49.5% de polimorfismo.

TABELA 3: Relação do número de posições de bandas amplificadas para cada um dos *primers* utilizados.

PRIMERS	POSIÇÕES DE BANDAS		
	TOTAL	POLIMÓRFICAS	MONOMÓRFICAS
OPC 12	12	12	0
OPC13	10	9	1
OPC 14	7	6	1
OPC18	8	7	1
OPF 09	10	9	1
OPL 04	9	7	2
OPM 08	8	8	0
OPT 11	15	14	1
OPU 01	8	5	3
OPU 05	10	7	3
OPV 02	9	8	1
OPV 03	11	11	0
OPZ 13	7	6	1
MAU B2	7	7	0
MAU 502	11	9	2
TOTAL	142	125 (88.03%)	17 (11.97%)

LU e RANK (1996) encontraram alta taxa polimórfica em *Megachile rotundata*, sugerindo que a técnica de RAPD é mais eficiente na detecção de variabilidade genética quando comparada aos níveis obtidos por análise de aloenzimas. Os polimorfismos genéticos encontrados em *Tetragonisca angustula* têm sido mais representativos para estudos de variabilidade que os descritos por FALCÃO (1984) estudando oito sistemas enzimáticos.

CHALMERS *et al.* (1992) afirmam que RAPD é uma ótima ferramenta para detectar diversidade máxima e pode ser usada para estimar níveis de variabilidade genética em populações.

Essa diferenças de valores de divergência encontrados podem ser decorrentes de diferenças no número amostral e também da metodologia empregada. As seguintes observações podem ser feitas:

1 - Enquanto OLIVEIRA (1998) utilizou *Taq* DNA polimerase proveniente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CENBIOT/RS), neste estudo a mesma enzima foi adquirida da empresa Pharmacia.

2 - As amostras utilizadas por OLIVEIRA (1998) foram representadas por apenas um indivíduo de cada localidade. Aqui, utilizou-se *bulk* de 5 indivíduos para representar cada colônia amostrada, resultando numa maior diversidade genômica. No entanto, OLIVEIRA (1998) estudou uma extensão geográfica mais ampla e contínua, ao passo que neste trabalho analisou-se apenas 3 localidades, separadas geograficamente e com número amostral diferente entre elas (dez do Triângulo Mineiro, cinco do Sul de Minas e três da Argentina).

3 - Os protocolos de extração de DNA nos dois trabalhos foram distintos.

4 - OLIVEIRA (1998) utilizou 18 *primers* (11 curtos e 7 longos) enquanto que, para este estudo, foram utilizados 15 (13 curtos e 2 longos). Apenas dois dos *primers* utilizados em ambos os trabalhos foram correspondentes, sendo um longo (MAU B2) e um curto (OPL 04).

O número amostral para cada localidade não foi padronizado devido a pouca disponibilidade de exemplares fora do Triângulo Mineiro. Preferiu-se utilizar muitas amostras dessa região, visando estimar a divergência genética para esta espécie de forma precisa, a fim de fornecer subsídios para estudos posteriores.

De qualquer forma, ambos trabalhos detectaram polimorfismos genéticos significativos para *Tetragonisca angustula*, indicando diversidade biológica dessa espécie, seja ecológica, comportamental, metabólica e ocorrência geográfica, que acabam favorecendo a aclimação das populações em seus nichos. As variações genotípicas encontradas dentro de uma espécie, expressa pelo fenótipo, favorece a melhoria na adaptação das populações em seus habitats.

DOBZHANSKY (1970) *apud* FALCÃO (1984) enfatiza que as modificações ambientais poderiam ser desastrosas para populações homozigóticas, por não possuírem uma variabilidade alélica suficiente para adequar-se às mudanças.

Apesar de pertencerem à mesma tribo, os dados obtidos mostraram pouca homologia entre *Tetragonisca angustula* e *Tetragona clavipes*: 69% de dissimilaridade genética. Dados similares foram obtidos por OLIVEIRA (1998) entre

o cluster *Tetragonisca. angustula* com *Apis mellifera* (51%) e *Tetragonisca buchwaldi* (51.9%).

A técnica de RAPD permite uma análise mais acurada em investigações de parentesco entre populações de uma mesma espécie, ao invés de espécies menos relacionadas (GONZÁLEZ e FERRER, 1993).

Um exemplo de polimorfismo genético pode ser comprovado pelo padrão de posições de bandas na Figura 2, resultado da amplificação das 18 amostras de populações de *Tetragonisca angustula* e 1 amostra de população de *Tetragona clavipes* por meio do primer curto OPM 08. Para este primer foram analisadas 8 posições de bandas de forte intensidade. A técnica eletroforética possibilita a detecção de variantes alélicas, possibilitando o estudo de loci polimórficos e monomórficos (FALCÃO, 1984). HARTL (1980) apud FALCÃO (1984) considera a eletroforese como a técnica mais útil já idealizada para revelar variação genética.

A variabilidade genética é importante à adaptação e/ou à processos de especiação e, dependendo da amplitude, denota oportunidade para alterações evolutivas (DOBZHANSKY et al., 1977 apud FALCÃO, 1984).

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com Brometo de Etídio, dos produtos amplificadas obtidos pelo primer OPM 08 – M (marcador), U1 (Uberlândia 1), U2 (Uberlândia 2), U3 (Uberlândia 3), U4 (Uberlândia 4), U5 (Uberlândia 5), I1 (Itumbeta 1), I2 (Itumbeta 2), I3 (Itumbeta 3), R1 (Uberaba 1), R2 (Uberaba 2), S1 (São Miguel do Anta 1), S2 (São Miguel do Anta 2), S3 (São Miguel do Anta 3), S4 (São Miguel do Anta 4), S5 (São Miguel do Anta 5), AI (Araçuaia do Vale), PI (Piedade), TT (Tupacatiara), BR (Bom Retiro do Sul).

5. CONCLUSÕES

⇨ A técnica de marcadores RAPD mostrou-se eficiente para estimar divergência entre populações de *Tetragonisca angustula* e destas com *Tetragona clavipes*.

⇨ O protocolo de extração de DNA usado (PAXTON *et al.*, 1996) foi eficiente para o uso em *bulks* quando modificado, com acréscimo de RNase, fenol e clorofil.

⇨ Obteve-se alta taxa de polimorfismo (88.03%) entre as amostras de *Tetragonisca angustula* e *Tetragona clavipes*, correspondente a 69% de divergência genética.

Ao nível de 16.2% de divergência genética, as amostras de jataí foram divididas em duas clades: 1 - Triângulo Mineiro e 2 – Sul de Minas e Argentina.

⇨ Três amostras do Triângulo Mineiro (Uberlândia 1, Uberlândia 3 e Ituiutaba 2) não apresentaram dissimilaridade genética.

⇨ Os valores de divergência máxima para a região do Triângulo foram similares aos encontrados na literatura. No entanto, os dados foram superiores quando comparados os graus de divergência entre as três localidades estudadas, sugerindo que as diferenças encontradas sejam devido a distinção na metodologia empregada.

⇨ Novas estimativas da divergência para esta espécie usando-se *bulks* com maior número de indivíduos e maior número de *primers*, forneceriam dados conclusivos sobre o número mínimo amostral por localidade e taxa de dissimilaridade genética padrão para a espécie.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDAR, D. S. 1999. Variabilidade genética em populações de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier e *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Tese de Doutorado**. FFCLRP/USP. Ribeirão Preto-SP, 67p.
- BALESTIERI, J. B. P. 1989. Toxicidade de inseticidas e efeitos respiratórios em duas espécies de meliponíneos *Tetragonisca angustula angustula* (Latreille, 1807) e *Nannotrigona testaceicornis testaceicornis* (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera-Apidae). **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biociências, UNESP - Rio Claro, 116p.
- CHALMERS, K. J.; WAUGH, R.; SPRENT, J. I.; SIMONS, A. J. e POWELL, W. 1992. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. **Heredity** **69**: 465-472.
- CONTEL, E. P. B.; MACHADO, M. F. S.; FALCÃO, T. M. M. A.; SANTOS, J. R. C.; CASTANHEIRA, E. B.; MESTRINER, M. A.; BARRETO-BEIRA, E. M. S. e FRANCO DE CAMARGO, J. M. 1992. Variabilidade genética em Meliponíneos estimada através do estudo de alozimas. **Naturalia**. Edição Especial. UNESP, Rio Claro: 51-55.
- CORTOPASSI-LAURINO, M. 1989. The stingless bee *Tetragonisca angustula* in blossoms. **XXXIInd International Congress of Apiculture, Apimondia**. Programme and Abstracts of Reports. Rio de Janeiro, RJ. Brazil: 72-73.

- CRUZ-LANDIM, C. C. 1960. Contribuição ao estudo da evolução das abelhas (Hymenoptera, Apidae): **Tese de Professor Catedrático da Cadeira de História Natural**. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Rio Claro, 75p.
- FALCÃO, T. M. M. A. 1984. Polimorfismos protéicos em populações naturais de abelhas brasileiras. **Tese de Doutorado**. FMRP/USP, Ribeirão Preto-SP, 231p.
- FERREIRA, M. E. e GRATTAPAGLIA, D. 1998. **Introdução no uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed.; Brasília, DF, EMBRAPA, 220p.
- FUTUYMA, D. J. 1992. **Biologia Evolutiva**. (Trad. Mario de Vivo e Fábio M. Sene), 2 ed., Ribeirão Preto-SP, Soc. Bras. Genética/CNPq: 87-157.
- GONZÁLEZ, J. M. e FERRER, E. 1993. Random amplified polymorphic DNA analysis in *Hordeum* species. **Genome** **36**: 1029-1031.
- GROSSO, A. F. e BEGO, L. R. 1992. Divisão de trabalho entre operárias de *Tetragonisca angustula angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae). **Naturalia**. Edição Especial: UNESP, Rio Claro: 238p.
- HOWELL, E. C.; NEWBURY, H. J.; SWENNEN, R. L.; WITHERS, L. A. e FORD-LIQUOR, B. V. 1994. The use of RAPD for identifying and classifying *Musa* germoplasm. **Genome** **37**: 328-332.
- HUNT, G. J e PAGE, R. E. Jr. 1992. Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. **Theor. Appl. Genet.** **85**: 15-20.
- HUNT, G. J e PAGE, R. E. Jr. 1995. Linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. **Genetics** **139**: 1371-1382.

- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; KLEINERT-GIOVANINI, A.; CORTAPASSI-LAURINO, M. e RAMALHO, M. 1984a. Hábitos de coleta de *Tetragonisca angustula*, Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Bol. Zool. Univ. São Paulo** **8**:115-131.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; BEGO, L. R. e KNOLL, F. R. N. 1984b. Abundância relativa dos Apoidea no *Campus* da Universidade de São Paulo. **Ciência e Cultura** **36** (7): 635p.
- IWAMA, S. 1977. Coleta de alimento e qualidade do mel de *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Apidae, Meliponinae). **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, Instituto de Biologia, 134p.
- KAZAN, K.; MANNERS, J. M. e CAMERON, D. F. 1993. Genetic relationships and variation in the *Stylosanthes guianensis* species complex assessed by random amplified polymorphic DNA. **Genome** **36**: 43-49.
- KERR, W. E. e MAULE, V. 1964. Geographical distribution of stingless bees and their implications. **Jour. of N. Y. Ent. Society** **72**(1): 2-17.
- KERR, W. E. e SILVEIRA, Z. V. 1972. Karyotypic evolution of bees and corresponding taxonomic implications. **Evolution** **26**(2): 197-202.
- KERR, W. E. e VENCOVSKY, R. 1982. Melhoramento genético em abelhas. I Efeito do número de colônias sobre o melhoramento. **Brazilian Journal of Genetics** **5**: 279-285.
- KERR, W. E. 1994. Progresso na genética de abelhas. **Anais do X Congresso Brasileiro de Apicultura**, Pousada do Rio Quente-GO: 264 -277.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A. e NASCIMENTO, V. A. 1996. **Abelha Uruçu: biologia, manejo e conservação**. Belo Horizonte-MG, Fundação Acangau, 13-19.

- KNOLL, F. R. N. 1985. Abundância relativa das abelhas no *Campus* da Universidade de São Paulo (23°33'S; 46°43'W) com especial referência à de *Tetragonisca angustula*, Latreille. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, Instituto de Biologia, 78p.
- KNOLL, F. R. N. 1990. Abundância relativa, sazonalidade e preferências florais de Apidae (Hymenoptera) em uma área urbana (23°33'S; 46°43'W). **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, Instituto de Biologia, 127p.
- LINDAUER, M. e KERR, W. E. 1960. Communication between the workers of stingless bees. **Bee World** 41: 29-71.
- LIU, Z. W.; JARRET, R. L.; DUNCAN, R. R. e KRESOVICHI, S. 1994. Genetic relationships and variation among ecotypes of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum*) determined by random amplified polymorphic DNA markers. **Genome** 37: 1011-1017.
- LU, R. e RANK, G. H. 1996. Use of RAPD analyses to estimate population genetic parameters in the alfalfa leaf-cutting bee, *Megachile rotundata*. **Genome** 39: 655-663.
- MELLO, M. O. A. M. 1981. Aspectos da bionomia de *Tetragonisca angustula*, Latreille com especial referência ao comportamento de postura das células (Hymenoptera, Apidae). **Monografia**. FMRP/USP, Ribeirão Preto-SP, 29p.
- MEUNIER, J. R. e GRIMONT, P. A. D. 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Res. Microbiol.** 144: 373-379.
- NOGUEIRA-FERREIRA, F. H. 1993. Aspectos da estratégia reprodutiva em *Tetragonisca angustula angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Tese de Mestrado**. FFCLRP/USP, Ribeirão Preto-SP, 105p.
- NOGUEIRA-NETO, P. 1970. **A criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae)**. 2 ed. Chácaras e Quintais, São Paulo-SP, 365p.

- NOGUEIRA-NETO, P. 1997. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**. Ed. Nogueirapis, São Paulo-SP, 445p.
- OLIVEIRA, R. C. 1998. Divergência genética por marcadores RAPD em *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Tese de Mestrado**. Universidade Federal de Uberlândia, 50p.
- PAXTON, R. J.; THRÉN, P. A.; TENGO, J.; ESTOUPA, P. A. e PAMILO, P. 1996. Mating structure and nestmate relatedness in a communal bee, *Adrena jacobii* (Hymenoptera: Adrenidae) using microsatellite. **Molecular Ecology** 5: 511-519.
- PIGNATA, M. I. B. e STORT, A. C. 1992. Coleta de pólen por Meliponíneos (Hymenoptera, Apidae). **Naturalia**. Edição Especial. UNESP, Rio Claro: 255p.
- POMPOLO, S. G. 1992. Estudos citogenéticos em Meliponinae. **Naturalia**. Edição Especial. UNESP, Rio Claro: 62-66.
- PRONI, E. A. 1987. Capacidade de termorregulação e metabolismo respiratório de *Tetragonisca angustula fiebrigi* Schwarz, 1938 e *Tetragonisca angustula angustula* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biociências, UNESP - Rio Claro, 117p.
- RABELO, L. F. G. 1997. Interação abelha-planta na Reserva Ecológica do Clube Caça e Pesca Itororó (Uberlândia-MG), com ênfase em Apidae. **Monografia**. Universidade Federal de Uberlândia, 29p.
- SCHIERWATER, B. e ENDER, A. 1993. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. **Nucl. Acid. Res.** 21: 4647-4648.
- STILES, J. I.; LEMME, C.; SONBUR, S.; MORSHIDI, M. B. e MANSARDT, R. 1993. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. **Theor. Appl. Genet.** 85: 697-701.

- VALENTINI, A.; TIMPERIO, A. M.; CAPPUCCHIO, I. e ZOLLA, L. 1996. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) interpretation requires a sensitive method for the detection of amplified DNA. **Electrophoresis** **17**: 1553-1554.
- WEEDEN, N. F.; TIMMERMAN, G. M.; HEMMAT, M.; KNEEN, B. E. e LODHI, M. A. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers. **Applications of RAPD Technology to Plant Breeding**, Minneapolis: 12-17.
- WELSH, J. e McCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucl. Acid. Res.** **18**: 7213-7218.
- WILKIE, S. E.; ISAAC, P. G. e SLATER, R. J. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. **Theor. Appl. Genet.** **86**: 497-504.
- WILLE, A. 1983. Biology of the stingless bees. **Ann. Rev. Entomol.** **28**: 41-64.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. e TINGEY, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acid. Res.** **18**: 6531-6535.