POLIMORFISMO ISSR EM ABELHAS SEM FERRÃO *Nannotrigona testaceicornis* E *Scaptotrigona bipunctata*

Andressa Santoro (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Talita Aparecida Todora (Coorientadora), Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki (Orientador), e-mail: andressasantoro12@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas - Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular – DBC / Maringá, PR

Área e subárea: Genética / Genética Molecular e de Microorganismos

Palavras-chave: Iraí, Tubuna, marcadores moleculares

Resumo:
Este estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética e estrutura de populações de *Nannotrigona testaceicornis* e *Scaptotrigona bipunctata* por meio dos marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). O estudo foi realizado com operárias adultas de *N. testaceicornis* provenientes de duas localidades de Maringá-PR e, com *S. bipunctata* de três localidades (Maringá e Cambé, PR). Após o isolamento do DNA foram realizadas as amplificações do DNA via PCR utilizando quatro primers ISSR (ISSR 15, ISSR 17898B, ISSR HB10 e ISSR HB12). Os resultados obtidos indicam que essas duas espécies de abelhas sem ferrão têm baixa diversidade genética, considerando o marcador ISSR utilizado. As operárias de *S. bipunctata* da FEI-UEM apresentaram maior identidade genética com as abelhas coletadas em Cambé1. Esse marcador molecular possibilitou verificar que após cinco anos de isolamento geográfico essas abelhas mantêm características genéticas próximas. Apesar do pequeno número de ninhos analisados, o marcador molecular ISSR foi eficiente para estudos de diversidade genética e estrutura de populações das duas espécies de abelhas sem ferrão avaliadas. Assim, é necessário realizar novos estudos aumentando o número de populações para o melhor entendimento da estrutura de populações de *N. testaceiconis* e *S. bipunctata.*

Introdução

Os meliponíneos, ou abelhas “sem ferrão” são fundamentais para o ecossistema brasileiro, sendo responsáveis pela polinização da maioria das espécies vegetais presentes no Brasil, além disso seus produtos como mel, geoprópolis são bastante utilizados pela população rural em medicamentos (FREITAS, 2003). Entre os Meliponíneos, destacamos *Nannotrigona testaceicornis* (Lepeletier, 1836) e *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier, 1836), popularmente denominadas como iraí e tubuna, respectivamente. Apesar de diversas pesquisas envolvendo essas espécies, há poucas informações sobre a variabilidade genética e estrutura populacional dessas

abelhas. Sendo assim, esse estudo teve como objetivo identificar polimorfismos e estudar a estrutura de populações das abelhas sem ferrão *N.testaceicornis* e *S. bipunctata* utilizando marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*).

Materiais e métodos

Operárias adultas de *N. testaceicornis* foram coletadas em: 05 caixas comerciais do meliponário FEI-UEM e, em 06 ninhos naturais no *campus* da UEM, totalizando 11 ninhos. Os espécimes de *S. bipunctata* foram coletados em caixas comerciais: 07 no Meliponário FEI-UEM, 04 em cambé1 e 06 em Cambé2, totalizando 17 ninhos. A análise ISSR foi realizada com uma operária de cada ninho, resultando na análise de 28 indivíduos. As abelhas coletadas foram armazenadas em etanol 90% e mantidas em freezer -20°C até o momento do isolamento de DNA total. A extração de DNA genômico individualizado foi realizada de acordo com descrito por Yu et al. (1993) com modificações. A quantificação do DNA foi realizada com NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific™). Posteriormente, foi realizada diluição para a concentração final de 10 ng/ µL. Do total de 10 primers ISSR testados foram selecionados quatro de acordo com a resolução e a quantidade de bandas obtidas: ISSR 15, ISSR 17898B, ISSR HB10 e ISSR HB12. Também foram testadas a concentração de $MgCl_2$ (2,5 mM e 1,5 mM), a quantidade de DNA (1,0 µL e 1,5 µL) e a temperatura de anelamento dos *primers* (50°C a 52°C). A amplificação do DNA via PCR foi realizada em termociclador Applied Biosystems, utilizando o programa descrito por Nascimento et al. (2010), com modificações para a temperatura de anelamento. Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,7% a 60 V. O marcador de peso molecular utilizado foi de 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). Os géis foram corados em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL e as imagens foram capturadas em transiluminador L-PIX HE, Loccus Biotecnologia. Para a análise dos produtos amplificados por cada *primer* ISSR e para cada amostra analisada, os fragmentos foram lidos como presentes (1) ou ausentes (0) e foi construída uma matriz binária. Posteriormente, foi utilizado o programa POPGENE 1.32 para calcular os índices de variação genética e para a construção de um dendrograma e uma matriz de identidade e distância genética de Nei (1978), usando o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Avarages). Também foi utilizado o programa GeneAIEx 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012) para a Análise de Variância Molecular (AMOVA).

Resultados e Discussão

Por meio dos marcadores moleculares ISSR 15, ISSR 17898B, ISSR HB10 e ISSR HB12 foi possível analisar o polimorfismo médio estimado para as duas espécies de abelhas sem ferrão, obtendo um percentual de 38,89% para a espécie *N. testaceicornes* e de 43,21% para *S. bipunctata*. Estes resultados indicam que os *primers* utilizados foram eficientes na detecção de polimorfismo nas populações das duas espécies analisadas.

O valor da diversidade genética de Nei (h) (1973) foi 0,1721 para *N. testaceicornes* e 0,1773 para *S. bipunctata*. Os índices de diversidade genética de Shannon (1949) foi de 0,2710 para *N. testaceicornes* e 0,2895 para *S. bipunctata*. Esses resultados demonstram baixa diversidade genética para as abelhas analisadas de cada espécie, mesmo havendo amostras de diferentes localidades.

Um dendrograma foi construído pelo método UPGMA, a partir dos valores de distância genética de Nei (1978), dando origem a dois grupos principais, um composto pelas duas populações de *N. testaceicornes* e o outro composto pelas populações de *S. bipunctata* (Figura 1). É possível verificar também que, no primeiro grupo, as duas populações de *N. testaceicornes* apresentam alta identidade genética (0,9748). No segundo grupo, as operárias de *S. bipunctata* analisadas de Maringá e de Cambé 1 apresentaram maior identidade genética (0,9876) quando comparadas com as identidades genéticas das operárias de *S. bipunctata* entre FEI-Cambé 2 (0,9771) e Cambé 1- Cambé 2 (0,9765). Esses resultados corroboram o fato dos ninhos da FEI-UEM serem provenientes de Cambé-PR há pelo menos cinco anos. Vale salientar que pode ocorrer algum fator ambiental que dificulta a hibridização entre *S. bipunctata* de Cambé 1 e Cambé 2, pois a distância geográfica entre os ninhos coletados é de aproximadamente 1.000 m.

Figura 1. Dendrograma elaborado pelo método UPGMA, utilizando o marcador molecular ISSR e a distância genética de Nei (1978), das abelhas sem ferrão *Nannotrigona* testaceicornes, provenientes de duas localidades em Maringá (FEI (Fazenda experimental Iguatemi-UEM e campus UEM (Universidade Estadual de Maringá)) e *Scaptotrigona bipunctata* provenientes da FEI, e Cambé-PR.

A análise de variância molecular (AMOVA), permitiu verificar que as duas populações de *N. testaceicornis* de Maringá apresentam 92% de variação dentro das populações e apenas 2% entre as populações (Figura 2A). Quanto as três populações de *S. bipunctata* foi observado que 99% da variação ocorre dentro das populações e apenas 1% entre as populações analisadas (Figura 2B). O marcador molecular ISSR é eficiente para análise de diversidade genética e estrutura de populações das abelhas sem ferrão *N. testaceicornis* e *S. bipunctata*. Contudo, esses dados foram observados em um pequeno número de populações, sendo necessário aumentar a amostragem para melhor entendimento da variabilidade genética e estrutura de populações dessas espécies de abelhas sem ferrão.

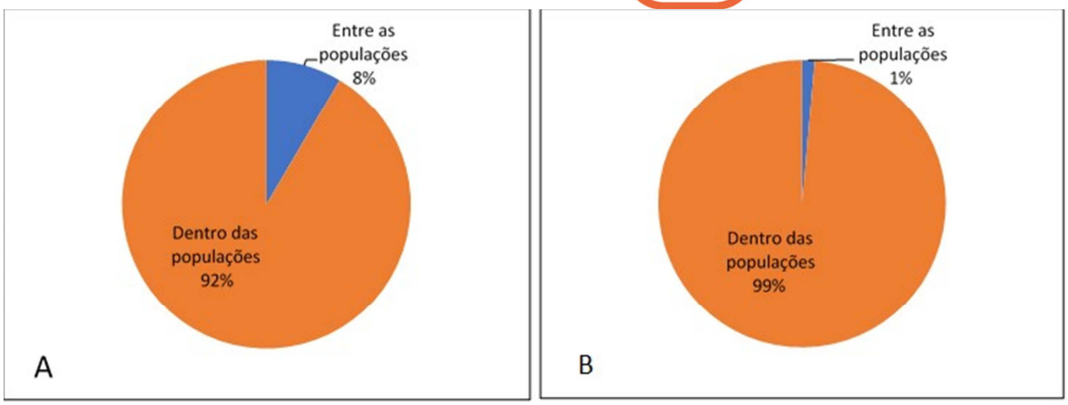

Figura 2. Análise da Variância Molecular utilizando o marcador ISSR para as abelhas sem ferrão *Nannotrigona testaceicornes* (A) e *Scaptotrigona bipunctata* (B).

Conclusões

As abelhas sem ferrão *N. testaceicornes* e *S. bipunctata* analisadas apresentam baixa diversidade genética. A maior parte da variação genética ocorre dentro das populações analisadas. Os ninhos de *S. bipunctata* da FEI provenientes de Cambé 1, após cinco anos de isolamento geográfico apresentam alta identidade genética.

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora Dr. Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki e a minha coorientadora Talita Aparecida Todora por todo apoio e ajuda durante a pesquisa e ao Programa PIBIC-UEM, CNPq e Fundação Araucária pelo incentivo e pela bolsa concedida para a realização da pesquisa.

Referências

FREITAS, M.B. **Meliponíneos**. Universidade Federal do Ceará. Fortacelza. 2003.

NASCIMENTO, M.A.; BATALHA-FILHO, H.; WALDSCHMIDT, A.M.; TAVARES, M.G.; CAMPOS, A.O.; SALOMÃO, T.M.F. Variation and genetic structure of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) populations based on ISSR pattern. **Genetics and Molecular Biology**, 33: 394-397, 2010.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89: 583–59, 1978.

PEAKALL, R.; SMOUSE P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. **Bioinformatics**, 28: 2537-2539, 2012.

YU, K.F.; DEYNZE A.V.; PAULUS, K.P. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In: GLICK, B.R. (ed.). **Methods in plant molecular biology and biotechnology**. New York: Economic Botany, 1993. p. 287-301.