

POLIMORFISMOS ISSR EM ABELHAS SEM FERRÃO *Tetragonisca angustula* LATREILLE, 1811 (APIDAE, MELIPONINI)

Vitor Gabriel Petergato de Camillo (PIBIC/CNPq/Uem), Andressa Santoro, Talita Aparecida Todora (Coorientador), Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki (Orientadora), e-mail: mccrtakasusuki@uem.br

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: Jataí, marcadores moleculares, variabilidade genética

Resumo:

Este estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética e estrutura populacional de *Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca fiebrigi* por meio da utilização dos marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). Foram utilizadas operárias adultas provenientes de quatro localidades em Maringá-PR. Após a extração do DNA foram realizadas amplificações via PCR utilizando dois *primers* (ISSR 18 e ISSR 20). Os resultados obtidos indicam que ambas as espécies apresentam baixa variabilidade genética e as populações são bem diferenciadas e estruturadas de acordo com o marcador utilizado. Para o ninho com indivíduos híbridos foi possível observar maior semelhança genética com a espécie *T. fiebrigi*. Devido ao isolamento das colônias nas comunidades também foi possível observar baixo fluxo gênico entre as populações. Ainda, com o auxílio do marcador ISSR foi possível verificar que os indivíduos das localidades Maringá 2 e UEM-Maringá 4 apresentam alta identidade. Considerando o baixo número de ninhos analisados, são necessários novos estudos com maior número de populações a fim de ampliar o entendimento sobre a estrutura populacional e a diversidade genética do gênero *Tetragonisca*.

Introdução

As abelhas apresentam diversas funções como a produção de mel, própolis, pólen e cera (KERR et al, 1996), porém um papel extremamente importante que esses insetos realizam nos ecossistemas naturais e agrícolas é a polinização. Entre os meliponíneos, destacam-se as espécies *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) e *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz, 1938), (CAMARGO e PEDRO, 2013) ambas popularmente chamadas de Jataí e morfologicamente semelhantes, sendo diferenciadas principalmente pela coloração do mesepisterno na região torácica. *Tetragonisca angustula* possui mesepisterno com coloração negra e *T. fiebrigi* coloração amarela. Além disso, pode ocorrer a existência de híbridos, com mesepisterno negro com manchas amarelas. Alguns autores consideram essas espécies como duas subespécies: *Tetragonisca angustula angustula* e *Tetragonisca*

angustula fiebrigi (CASTANHEIRA e CONTEL, 2005). Estudos sobre genética de populações dessas espécies podem auxiliar na conservação e no manejo dessas abelhas. Sendo assim, esse estudo teve como objetivo identificar polimorfismos moleculares e estudar a estrutura de populações das abelhas sem ferrão *T. angustula* e *T. fiebrigi*, utilizando marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*).

Materiais e métodos

Foram coletadas abelhas operárias adultas de *T. angustula* provenientes de 3 localidades, totalizando 8 ninhos; operárias adultas de *T. fiebrigi* de 3 localidades, totalizando 21 ninhos e operárias adultas de 1 ninho híbrido, sendo todas localidades situadas em Maringá. As amostras foram armazenadas em etanol 90% a -20°C até o momento da extração do DNA. Foi utilizado uma operária de cada ninho, resultando na análise de 30 indivíduos. Após a extração, o DNA foi quantificado por meio do equipamento NanoDrop™ Lite Spectrophotometer e todas as amostras de DNA foram diluídas para a concentração final de 10 ng/ µL. Para a amplificação do DNA via PCR, foram utilizados 2 *primers* ISSR (18 e 20). Cada reação de PCR continha os seguintes reagentes: Tampão de reação 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP, 0,4 µM de *primer*, 1 U de Taq-DNA Polimerase, 15 ng de DNA e água milli-Q. O programa utilizado no termociclador foi o descrito por Nascimento et al. (2010), com modificações na temperatura de anelamento. As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,7%. Os géis foram corados em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL para visualização das bandas e a imagem foi capturada em transiluminador L-PIX HE. Para a análise dos produtos amplificados, os fragmentos (bandas) foram lidos como presentes (1) ou ausentes (0) e foi construída uma matriz binária. O programa POPGENE 1.32 foi utilizado para a construção de um dendrograma a partir de uma matriz de distância genética de Nei (1978), usando o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages). O software structure 2.3.4 e a estrutura Harvester (http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/) foram utilizados para estimar o número de grupos genéticos, por meio da análise por inferência Bayesiana utilizando a cadeia de Markov MCMC (Markov Chain Monte Carlo) de acordo com a estatística K (número de grupos genéticos). A estimativa foi feita com valores de K variando de 2 a 10, e o valor de K utilizado foi o que apresentou maior valor de delta K.

Resultados e Discussão

O dendrograma, baseado nos valores de distância genética de Nei (1978), deu origem a dois grupos principais, um composto pelas populações de *T. angustula* e o outro composto pelas populações de *T. fiebrigi* e o ninho híbrido (Figura 1). Esse resultado demonstra a capacidade dos marcadores ISSR em diferenciar espécies. Além disso, é possível identificar que as abelhas híbridas apresentam uma maior similaridade genética com as abelhas *T. fiebrigi*. No grupo formado por *T. angustula*,

é possível observar que as operárias de Maringá 2 e da UEM-Maringá 4 apresentaram a maior similaridade genética nas regiões ISSR analisadas.

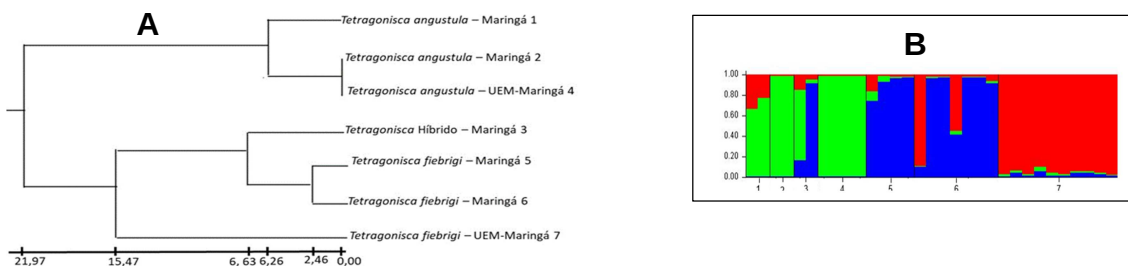


Figura 1. A) Dendrograma baseado na distância Genética de Nei (1978), utilizando o método Hierárquico UPGMA, modificado de Neighbor procedido de Phylip versão 3.5, das populações de *T. angustula* e *T. fiebrigi* coletadas em diferentes localidades de Maringá-PR. **B)** Gráfico de barras obtido por inferência Bayesiana (MCMC) com número de grupos. enéticos estimado em K = 3. N° 1 e 2 = *T. angustula* – Maringá; 3= *Tetragonisca* híbrido; 4= *T. angustula* – Maringá-UEM; 5 e 6= *T. fiebrigi* – Maringá; 7= *T. fiebrigi* – Maringá-UEM.

A análise por inferência Bayesiana utilizando a cadeia de Markov MCMC estimou o número de grupos genéticos, K= 3 (Figura 2). Assim como demonstrado no dendrograma baseado na distância genética de Nei (1978), é possível observar na análise Bayesiana a identidade genética entre as amostras de *T. angustula* de Maringá 2 (2) e da UEM (4). Observamos ainda que as abelhas do ninho híbrido (3) apresentam grupos genéticos de *T. angustula* e *T. fiebrigi*. Por fim, que as amostras de *T. fiebrigi* da UEM (7) são as mais diferenciadas, demonstrado no gráfico pela predominância do grupo em vermelho (Figura 2).

Os baixos valores de heterozigosidade total ($H_t = 0,2430 (\pm 0,558)$), e de heterozigosidade esperada ($H_s = 0,0555 (\pm 0,0038)$). O valor de G_{st} , que é um coeficiente de diferenciação populacional, foi alto ($G_{st} = 0,7717$), indicando que as populações em estudo estão diferenciadas e estruturadas. Esse resultado é corroborado pelo baixo valor de fluxo gênico ($N_m = 0,1480$). O baixo valor de N_m provavelmente ocorre devido ao isolamento das colônias nas localidades, devido à baixa capacidade de dispersão das *Tetragonisca*, diminuindo o fluxo gênico entre colônias de localidades diferentes. Os resultados obtidos podem ainda ser decorrentes do pequeno tamanho amostral utilizado. Esses resultados são acentuados pois, exceto os ninhos naturais coletados na UEM, as demais localidades são meliponários com ninhos introduzidos pelos meliponicultores, que geralmente dividem as colônias produzindo rainhas filhas, fato que reduz a variabilidade genética e, contribui com a ocorrência de endogamia. Por isso é importante conscientizar os meliponicultores para aquisição de novos ninhos de outros locais, para evitar um possível endocruzamento, homozigose, menor variabilidade genética e redução de produtividade.

Conclusões

Os ISSRs são marcadores eficientes na diferenciação de *T. angustula* e *T. fiebrigi*. O dendrograma e análise Bayesiana permitiram identificar que o ninho

híbrido possui maior similaridade genética com *T. fiebrigi*. As populações apresentam alta diferenciação genética e baixo fluxo gênico, possivelmente devido ao isolamento das colmeias nos meliponários, e/ou pelo pequeno tamanho amostral.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki pela oportunidade e a minha co-orientadora Talita Aparecida Todora pelo tempo e esforços dedicados ao trabalho. Agradeço ao Programa PIBIC-UEM-CNPq pela bolsa concedida.

Referências

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A.; BEGO, L. R.; ALVES, R. M. de O.; MARTINS, M. A. S.; SOUZA, I. C. **Abelha urucu: biologia, manejo e conservação. Coleção Manejo da Vida Silvestre, Nº 2.** Belo Horizonte, Acangaú, 1996.

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**, v.33, p. 394-397, 2010.

CASTANHEIRA, E.B.; CONTEL, E.P.B. Geographic variation in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Journal of Apicultural Research**, v.44, p.101-105, 2005.

CAMARGO, J.M.F.; PEDRO, S.R.M. (2013) Meliponini Lepeletier, 1836. In: Moure, J.S.; Urban, D.; Melo, G.A.R. (orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region** - online version. <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso: 28, Agosto, 2022.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p.583-90., 1978. Doi: 10.1093/genetics/89.3.583.