

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

VARIABILIDADE GENÉTICA, BIONOMIA E  
AVALIAÇÃO DE COLÔNIAS DE *Tetragonisca angustula* E  
*Tetragonisca weyrauchi* (HYMENOPTERA: APIDAE)  
NO ESTADO DE RONDÔNIA

Autora: Ludimilla Ronqui

Orientador: Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
fevereiro – 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

VARIABILIDADE GENÉTICA, BIONOMIA E  
AVALIAÇÃO DE COLÔNIAS DE *Tetragonisca angustula* E  
*Tetragonisca weyrauchi* (HYMENOPTERA: APIDAE)  
NO ESTADO DE RONDÔNIA

Autora: Ludimilla Ronqui

Orientador: Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração: Produção Animal

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
fevereiro – 2016

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R773v	<p>Ronqui, Ludimilla</p> <p>Variabilidade genética, bionomia e avaliação de colônias de <i>Tetragonisca angustula</i> e <i>Tetragonisca weyrauchi</i> (Hymenoptera: Apidae) no Estado de Rondônia / Ludimilla Ronqui. - - Maringá, 2016.</p> <p>69 f. : il., color., figs., tabs.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2016.</p> <p>1. Abelhas. 2. Manejo. 3. Microssatélite. 4. Melhoramento genético - Abelhas. II. Toledo, Vagner de Alencar Arnaut de, orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.</p> <p>CDD 21. ed. 638.1</p>
-------	--



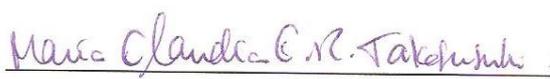
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**VARIABILIDADE GENÉTICA, BIONOMIA E  
AVALIAÇÃO DE COLÔNIAS DE *Tetragonisca angustula* E  
*Tetragonisca weyrauchi* (HYMENOPTERA: APIDAE)  
NO ESTADO DE RONDÔNIA**

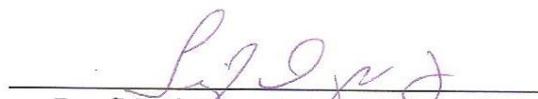
Autora: Ludimilla Ronqui  
Orientador: Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção Animal

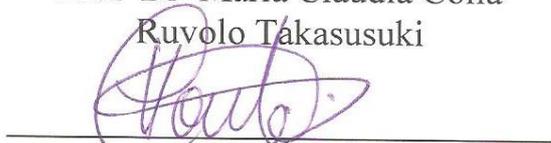
APROVADA em 26 de fevereiro de 2016.



Prof.ª Dr.ª Maria Cláudia Colla  
Ruyolo Takasusuki



Prof.ª Dr.ª Perezinha Aparecida  
Guedes



Prof. Dr. Helio Conte



Prof. Dr. Emerson Dechechi  
Chambó



Prof. Dr. Vagner de Alencar  
Arnaud de Toledo  
(Orientador)

*“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre”*

*Paulo Freire*

Ao meu pai, Natal Ronqui, por todo amor, carinho, dedicação.

À minha mãe, Dirce Albino Ronqui, pelo amor e dedicação e, principalmente, pelo incentivo, pela sua presença em todos os momentos da minha vida e, por me ensinar a viver um dia de cada vez.

Com muito amor, dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus a quem devo a vida. Deus, amigo e companheiro querido de tantas horas e tantos momentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo, pela dedicada orientação, incentivo, amizade, atenção e, especialmente, por sempre estar ao meu lado quando precisei.

À minha coorientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki, pela paciência, atenção, carinho e, principalmente, pelos seus ensinamentos.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Terezinha A. Guedes, pela ajuda, atenção e pelos ensinamentos, sempre disposta a ajudar. Muito obrigada!

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, que contribuíram para o meu crescimento profissional.

Aos que contribuíram com a coleta do material para que este estudo fosse realizado, meliponicultores do Estado de Rondônia.

Aos amigos do laboratório, pela convivência, pelo carinho e pelos momentos de descontração, em especial as amigas Simone Aparecida dos Santos, Juliana Mosconi Magro, Katlin Fernanda Araújo.

À minha amiga Suzana Paiva e sua família, por ter me acolhido em sua casa por meses, pela atenção e amizade.

Aos amigos do programa de pós-graduação: Heber Luiz Pereira, André Halak e Rejane Stubs Parpinelli, pelo convívio e pelos momentos de descontração.

À Universidade Federal de Rondônia, pelo afastamento concedido e a todos os amigos de trabalho do *Campus* de Ariquemes que me apoiaram.

Aos funcionários do laboratório: Sérgio Luiz Calvi e Leila Andréia Frota, pela colaboração.

Aos funcionários do PPZ, pela atenção e prestação de serviço.

A todos os amigos e colegas, pela ajuda, troca de ideias e por todo carinho.

Foram tantas e tão grandes saudades... Superá-las foi sempre um grande desafio a cada amanhecer, mas o amor e carinho de todos preencheram meus dias de esperança.

## BIOGRAFIA

LUDIMILLA RONQUI, filha de Natal Ronqui e Direce Albino Ronqui, nasceu em Umuarama – PR, em 18 de agosto de 1982.

Em março de 2001, iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia, na Universidade Paranaense, concluído em 2004.

Durante a graduação, atuou como monitora e bolsista em projeto de pesquisa – Pibic.

Em 2005, ingressou no curso de pós-graduação em Genética e Melhoramento, em nível de mestrado, área de concentração: Genética Animal, na Universidade Estadual de Maringá.

Em dezembro de 2006, submeteu-se à banca examinadora para defesa da dissertação.

Desde julho de 2009 atua como professora na Universidade Federal de Rondônia, no departamento Interdisciplinar de Tecnologia e Ciências.

Em 2013, ingressou no curso de Pós-graduação em Zootecnia em nível de doutorado na Universidade Estadual de Maringá.

Em abril de 2015 submeteu-se ao exame de qualificação.

No dia 26 de fevereiro de 2016, submeteu-se à banca examinadora para defesa da tese.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xi
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xvi
I – INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1.1 Abelhas nativas sem ferrão .....	2
1.2 Aspectos gerais de abelhas <i>Tetragonisca angustula</i> .....	4
1.3 Aspectos gerais de abelhas <i>Tetragonisca weyrauchi</i> .....	8
1.4 Marcadores moleculares e <i>Tetragonisca</i> .....	10
REFERÊNCIAS .....	14
II – OBJETIVOS GERAIS .....	19
III – VARIABILIDADE GENÉTICA DE <i>Tetragonisca angustula</i> E <i>Tetragonisca weyrauchi</i> (HYMENOPTERA, APIDAE) DO ESTADO DE RONDÔNIA .....	20
Resumo .....	20
Abstract .....	20
Introdução .....	21
Material e métodos .....	22
Resultados .....	25
Discussão .....	29
Conclusões .....	32
Agradecimentos .....	32
Referências .....	32

IV – POLIMORFISMO MITOCONDRIAL EM <i>Tetragonisca angustula</i> E <i>Tetragonisca weyrauchi</i> EMPREGANDO MARCADORES PCR-RFLP ...	37
Resumo .....	37
Abstract .....	37
Introdução .....	39
Material e métodos .....	40
Resultados .....	43
Discussão .....	46
Conclusões .....	48
Agradecimentos .....	48
Referências .....	48
V – ARQUITETURA DE NINHO, NIDIFICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE COLÔNIAS DE <i>Tetragonisca angustula</i> E <i>Tetragonisca weyrauchi</i> (HYMENOPTERA, APIDAE) NO ESTADO DE RONDÔNIA .....	51
Resumo .....	51
Abstract .....	51
Introdução .....	52
Material e métodos .....	53
Resultados .....	55
Discussão .....	60
Conclusões .....	65
Agradecimentos .....	66
Referências .....	66
VI – CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	69

## LISTA DE TABELAS

	Página
III – VARIABILIDADE GENÉTICA DE <i>Tetragonisca angustula</i> E <i>Tetragonisca weyrauchi</i> (HYMENOPTERA, APIDAE) DO ESTADO DE RONDÔNIA	
Tabela 1	23
Tamanho do fragmento (TF), número de repetições dos <i>primers</i> na amplificação de DNA de <i>T. angustula</i> e <i>T. weyrauchi</i> .....	
Tabela 2	24
Temperaturas de anelamento específicas, temperaturas usadas para adaptação dos <i>primers</i> na amplificação de DNA de <i>T. angustula</i> e <i>T. weyrauchi</i> .....	
Tabela 3	26
Frequência dos alelos de microssatélites de <i>T. angustula</i> e <i>T.</i> <i>weyrauchi</i> nas populações do Estado de Rondônia .....	
Tabela 4	26
Valores de heterozigosidade observada ( <i>Ho</i> ) e esperada ( <i>He</i> ) obtidas com marcadores microssatélites para <i>T. angustula</i> e <i>T.</i> <i>weyrauchi</i> do Estado de Rondônia .....	
Tabela 5	27
Índice de fixação ( <i>F<sub>IS</sub></i> ), grau de diferenciação ( <i>F<sub>ST</sub></i> ) e fluxo gênico ( <i>Nm</i> ) .....	
IV – POLIMORFISMO MITOCONDRIAL EM <i>Tetragonisca angustula</i> E <i>Tetragonisca weyrauchi</i> EMPREGANDO MARCADORES PCR-RFLP	
Tabela 1	41
Pares de <i>primers</i> utilizados para amplificação de regiões do mtDNA de <i>Tetragonisca</i> e temperatura de anelamento (N – número de <i>primers</i> , R – Referências, T – Temperatura em °C) .....	
V – ARQUITETURA DE NINHO, NIDIFICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE COLÔNIAS DE <i>Tetragonisca angustula</i> E <i>Tetragonisca weyrauchi</i> (HYMENOPTERA, APIDAE) NO ESTADO DE RONDÔNIA	
Tabela 1	54
Descrição dos tratamentos com dimensão e espessura das colmeias modelo Fernando Oliveira/INPA .....	

Tabela 2	Análise de variância para <i>T. angustula</i> em nove meses de observação .....	57
Tabela 3	Análise de variância para <i>T. angustula</i> em dois meses de observações (setembro e outubro) .....	58
Tabela 4	Análise de variância para o <i>T. weyrauchi</i> em dois meses de observações (setembro e outubro) .....	59
Tabela 5	Dados climáticos de temperatura do ambiente (°C), umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm) de 2013 e 2014 .....	60

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 <b>A)</b> Entrada do ninho de <i>T. angustula</i> ; <b>B)</b> favos de cria, cerume formando o invólucro e a célula real. (Fotos: Ludimilla Ronqui) .....	6
Figura 2 <b>A)</b> Rainha de <i>T. angustula</i> ; <b>B)</b> potes com saburá; <b>C)</b> potes com mel. (Fotos: Ludimilla Ronqui) .....	7
Figura 3 <b>A)</b> Ninho é aéreo localizado em forquilhas de árvore, a seta indica o tubo de entrada; <b>B)</b> tubo de entrada; <b>C)</b> cobertura de uma película fina e maleável com diferentes consistências; <b>D)</b> A seta indica cobertura nova com coloração mais clara. (Fotos: Ludimilla Ronqui) .....	9
Figura 4 <b>A)</b> Discos (12) podem ser observada a diferença de coloração; <b>B)</b> Potes de alimentos com mel e pólen. (Fotos: Ludimilla Ronqui) .....	10
 III – VARIABILIDADE GENÉTICA DE <i>Tetragonisca angustula</i> E <i>Tetragonisca weyrauchi</i> (HYMENOPTERA, APIDAE) DO ESTADO DE RONDÔNIA	
Figura 1    Identificação dos locais de coleta de <i>T. angustula</i> e <i>T. weyrauchi</i> no Estado de Rondônia .....	22
Figura 2    Análise em componentes principais (PCoA) evidenciando a ordenação dos grupos estabelecidos pelas amostra de populações de <i>Tetragonisca</i> do Estado de Rondônia .....	27
Figura 3 <b>A):</b> Por inferência bayesiana (MCMC) número de populações estimado em $K = 4$ . <b>B):</b> estimativa do número real de populações pelo método de Evanno et al. (2005) .....	28
 IV – POLIMORFISMO MITOCONDRIAL EM <i>Tetragonisca angustula</i> E <i>Tetragonisca weyrauchi</i> EMPREGANDO MARCADORES PCR-RFLP	
Figura 1    Identificação dos locais de coleta de <i>T. angustula</i> e <i>T. weyrauchi</i> no Estado de Rondônia .....	40

Figura 2	Análise em componentes principais (PCoA) evidenciando a ordenação dos grupos estabelecidos pelas amostra de populações de <i>Tetragonisca</i> do Estado de Rondônia .....	44
Figura 3	<b>A:</b> Por inferência bayesiana (MCMC) número de populações estimado em $K = 5$ . <b>B:</b> estimativa do número de populações pelo método de Evanno et al. (2005) .....	45
V – ARQUITETURA DE NINHO, NIDIFICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE COLÔNIAS DE <i>Tetragonisca angustula</i> E <i>Tetragnisca weyrauchi</i> (HYMENOPTERA, APIDAE) NO ESTADO DE RONDÔNIA		
Figura 1	(A) Discos de cria de <i>T. weyrauchi</i> com diâmetro médio dos discos de cria medidas de 11 cm (B) e ocorrência de lixeira não relatada na bionomia da espécie. (Fotos: Ludimilla Ronqui) .....	55
Figura 2	(A) Nidificação em solo <i>T. angustula</i> (B) espessura do tronco de árvore em nidificação de <i>T. angustula</i> . (Fotos: Ludimilla Ronqui) ..	56
Figura 3	(A) Nidificação de <i>T. weyrauchi</i> em árvore de <i>Bombacaceae</i> - paineira (B) em <i>Mangifera indica</i> – manga. (Fotos: Ludimilla Ronqui) .....	56
Figura 4	Média do peso das caixas (g) de <i>T. angustula</i> no período de setembro de 2013 a agosto de 2014 com as diferentes dimensões e espessuras. 1 (10x10 com 2cm), 2 (10x10 com 3 cm), 3 (10x10 com 3,5 cm), 4 (10x10 com 4 cm) 5 (10x10 com 5 cm) 6 (12x12 com 5 cm) .....	57
Figura 5	Média do peso das caixas (g) do experimento com <i>T. angustula</i> em dois meses (setembro e outubro) para cada um dos tratamentos. 1 (10x10 com 2cm), 2 (10x10 com 3 cm), 3 (10x10 com 3,5 cm), 4 (10x10 com 4 cm) 5 (10x10 com 5 cm) 6 (12x12 com 5 cm) 7 (15x15 com 2 cm) 8 (15x15 com 5 cm) .....	58

## RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar a diversidade genética em abelhas (*Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca weyrauchi*) utilizando marcador microssatélite e PCR-RFLP, assim como as características da arquitetura dos ninhos, local de nidificação e o desenvolvimento de colônias. Para avaliar a diversidade genética foram coletadas abelhas operárias de ninhos localizados em Cacoal, Ji-Paraná, Jaru, Ariquemes, Cacaupônia, Monte Negro, Alto Paraíso e Porto Velho - Rondônia. Após isolar o DNA foram realizados testes com nove *primers* microssatélites. O sucesso na amplificação e presença de polimorfismo ocorreu com quatro *primers*: (T3-32, Mbi33, Mbi254 e Tang 77) foram selecionados para análise das duas espécies, pois demonstraram qualidade na amplificação dos locos. Para o marcador PCR-RFLP, foram realizados testes com dez pares de *primers* heterólogos que amplificam diferentes regiões do DNA mitocondrial, porém quatro (*primer 1* - ND2 e COI; *primer 2* - COI; *primer 8* - 16S e 12S e *primer 9* - COII) foram utilizados no estudo. Para a análise de restrição das regiões amplificadas foram testadas 13 enzimas: *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *Hinfl*, *RsaI*, *PstI*, *XbaI*, *HaeIII*, *ClaI*, *XhoI*, *BglII*, *PvuII* e *ScaI*. Para avaliar o desenvolvimento foram utilizadas diferentes espessuras e dimensões em colmeias modelo Fernando Oliveira/INPA, instaladas no município de Alto Paraíso – Rondônia. A partir das análises dos resultados com os quatro *primers* do marcador microssatélite, os maiores valores de heteroziguidade observados foram estimados para o loco *Tang77* de *T. angustula* (0,1333). Os valores de heteroziguidade esperados foram maiores que os de heteroziguidade observada e os valores positivos de  $F_{IS}$  indicaram que há excesso de homozigotos. As populações analisadas são moderadamente diferenciadas de acordo com o valor estimado de  $F_{ST}$ . A análise de variância molecular indicou que 9% da variação ocorreram entre as populações e 91% dentro das populações. A análise por

inferência bayesiana, utilizando o Método de Monte Carlo via cadeias de Markov (MCMC), não separaram as duas espécies de *Tetragonisca* analisadas. Os resultados que utilizaram marcador PCR-RFLP permitiram identificar para o *primer 1* – (ND2, COI) um fragmento com aproximadamente 2400 pb em *T. angustula* e em *T. weyrauchi*. Com a análise das endonucleases de restrição foi verificada a clivagem do fragmento com a enzima *EcoRI* e *EcoRV*. Para região (COI) *primer 2*, as duas espécies amplificaram um fragmento que corresponde a aproximadamente 1850 pb. A clivagem foi verificada com a enzima *EcoRV* somente em indivíduos de *T. angustula*. Porém, a clivagem com a enzima *HinfI* foi observada nas duas espécies. A amplificação da região (16S, 12S) *primer 8* gerou dois fragmentos (1850 pb e 350 pb), e foi observada a clivagem nas duas espécies com as enzimas *EcoRV*, *RsaI*, *PstI*. Enquanto que a enzima *XbaI* só clivou em *T. weyrauchi*. A amplificação da região (COII) *primer 9* apresentou um fragmento com 1000 pb. A clivagem ocorreu com a enzima *ClaI* e *HinfI* para *T. angustula*. O valor de identidade genética observado entre as populações foi de (0,3636) e distância genética igual a 1,0116. A análise por inferência bayesiana estimou o número real de populações,  $K=5$ . Já nas características da arquitetura dos ninhos em *T. angustula* foram observados discos com 6 a 11 cm, em *T. weyrauchi* a média para o tamanho dos discos foi de 11 cm. A nidificação em *T. angustula* foi registrada em árvore e solo, enquanto que em *T. weyrauchi* foram encontrados em forquilha de árvores. O ninho com o menor peso registrado foi de 50 g (*T. angustula*), enquanto que o maior foi de 250 g (*T. weyrauchi*). Em ninhos de *T. weyrauchi* foi realizada uma observação não registrada na bionomia da espécie. Na parte inferior dos ninhos foi encontrada uma lixeira, onde estava depositado um grande número de abelhas mortas. Foi registrado um grande número de perda de colônias durante o experimento. As análises estatísticas realizadas com GLM para *T. angustula* e *T. weyrauchi* indicaram que existem diferenças significativas entre as colmeias. A partir dos resultados encontrados conclui-se que nas populações de abelhas avaliadas os marcadores microsatélites utilizados não foram eficientes em separar as duas espécies estudadas. A variação detectada com as análises de mtDNA por PCR-RFLP das duas espécies de jataí mostrou que há diferenças no mtDNA entre as duas espécies. Essas populações estão bem diferenciadas, e permite observar que as populações tiveram padrão distintos de marcadores de mtDNA, e que a arquitetura do ninho difere não só nos respiráculos, mas também na lixeira que foi registrada para *T. weyrauchi*. Quanto à nidificação, a frequência observada é maior em *T. angustula* quando comparada a *T. weyrauchi*. As

colmeias, modelo Fernando Oliveira/INPA, são eficientes para produção em *T. angustula*, mas não são adequadas para *T. weyrauchi*.

**Palavras-chave:** Abelhas, manejo, microsatélite, Amazônia.

## ABSTRACT

This study had as objective to evaluate the genetic diversity of bees (*Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca weyrauchi*) by means of microsatellite marker and PCR-RFLP, as well as the architectural features of the nests, the nidification place and the development of the colonies. In order to evaluate the genetic diversity some worker bees were collected from nests in Cacoal, Ji-Paraná, Jaru, Ariquemes, Cacaúlândia, Monte Negro, Alto Paraíso and Porto Velho – Rondônia state. After isolating DNA, tests were performed with nine microsatellite primers. The success in the amplification and in the presence of Polymorphism occurred with four primers: (T3-32, Mbi33, Mbi254 and Tang 77) two species were selected for analysis because they demonstrate quality in the amplification of the loci. For PCR-RFLP marker, tests were carried out with ten pairs of heterologous primers that amplified different regions of the mitochondrial DNA, though, four primers (primer 1 - ND2 and COI; primer 2 - COI; primer 8 - 16S and 12S and primer 9 - COII) were used in this study. For restriction analysis of the amplified regions 13 enzymes were tested: EcoRI, EcoRV, HindIII, HinfI, RsaI, PstI, XbaI, HaeIII, ClaI, XhoI, BglII, PvuII and ScaI. In order to evaluate the development, different thicknesses and dimensions were used in Fernando Oliveira/INPA model hives, which were set in the town of Alto Paraíso – Rondônia state. From the analysis of the four primers of the microsatellite marker results, the highest heterozygosity values observed were estimated to site Tang77 of *T. angustula* (0,1333). The heterozygosity values expected greater than those heterozygosity observed and the positive values of  $F_{IS}$  indicated that there is excess of homozygotes. The populations analyzed are moderately differentiated according to the estimated value of  $F_{ST}$ . The analysis of molecular variance indicated that 9% of the variation occurred among populations and 91% within populations. Analysis by Bayesian inference using

Monte Carlo method by Markov chains (MCMC) did not separate the two kinds of *Tetragonisca* analyzed. The results using marker PCR-RFLP allowed to identify the primer 1 - (ND2, IOC) a fragment of approximately 2400 bp in *T. angustula* and *T. weyrauchi*. With the analysis of restriction endonuclease the fragment cleavage with EcoRI and EcoRV enzyme was verified. For region (IOC) primer 2 the two species amplified a fragment corresponding to about 1850 bp. Cleavage was verified with the EcoRV enzyme only in *T. angustula* individuals. However the cleavage with enzyme HinfI was observed in both species. The amplification of the primer 8 region (16S, 12S) generated two fragments (1850 bp and 350 bp), and the cleavage was observed in both species with the enzymes EcoRV, RsaI, PstI. Whereas enzyme XbaI cleaved in *T. weyrauchi* only. The amplification of the primer 9 region (IOC) showed a fragment of 1000 bp. The cleavage occurred with the enzyme ClaI and HinfI to *T. angustula*. The genetic identity value observed among populations was (0.3636) and the genetic distance was equal to 1.0116. The analysis by Bayesian inference estimated the real number of populations,  $K = 5$ . The architectural features of the nests discs with 6-11 cm were observed in *T. angustula*, in *T. weyrauchi* the average for the size of the disks was 11 cm. The nidification in *T. angustula* was recorded in tree and on the ground, while in *T. weyrauchi* they were found in fork trees. The nest with the smallest recorded weight was 50 g (*T. angustula*), whereas the highest was 250 g (*T. weyrauchi*). In *T. weyrauchi* nests, an observation not listed on the bionomics of the species was made, at the bottom of the nests a dumpster was found, where a large number of dead bees were deposited. A large number of colony loss was recorded during the experiment. The statistical analyzes conducted with GLM to *T. angustula* and *T. weyrauchi* indicated that there are significant differences between the hives. From the results found, it is concluded that the populations of evaluated bees the microsatellite markers used were not efficient in separating the two species. The variation detected with DNA analysis by PCR-RFLP of the two species of *jataí* showed that there are differences in mtDNA between the two species. These populations are well separated allowing us to observe that they have distinct pattern of mtDNA markers. And that the nest architecture differs not only in spiracles but also in dump that was recorded for *T. weyrauchi*. As for nidification, the frequency observed is higher for *T. angustula* when compared with *T. weyrauchi*. Hive model Fernando Oliveira / INPA are efficient for production for *T. angustula*, but are not suitable for *T. weyrauchi*.

**Keywords:** bees, management, microsatellite, Amazonia.

## I – INTRODUÇÃO GERAL

As abelhas sem ferrão estão distribuídas nas regiões de clima tropical e subtropical (NOGUEIRA-NETO, 1997). No Brasil encontram-se muitas espécies de abelhas que são de grande importância para a ecologia de diversos ecossistemas, como a floresta Amazônica e a mata Atlântica, pelo seu grande potencial polinizador. Os meliponíneos são responsáveis pela polinização de 40 a 90% dos vegetais que necessitam de polinização nestas florestas (KERR et al., 1996).

Em culturas cultivadas as abelhas são as principais polinizadoras. A maioria das frutas, sementes pequenas em muitas culturas vegetais, exige polinização para a produção e aumento dos rendimentos econômicos (ABROL, 2012). Um declínio dessas espécies ou a polinização inadequada em algumas culturas pode provocar perdas na produção de 50% ou mais (KLEIN et al., 2007). A perda de polinizadores em ritmo acelerado é consequência da agricultura contemporânea que pode ser vista de vários ângulos, analisando cada componente da agricultura, tais como o desmatamento para a expansão agrícola, solo, irrigação, fertilizantes, pesticidas e práticas agronômicas com a sua influência sobre o ambiente das plantas e dos polinizadores (ABROL, 2012).

No Estado de Rondônia, a preocupação com o desmatamento e a influência sobre as populações de abelhas levaram os autores Brown e Albrecht (2001) desenvolver um estudo (no sudeste da bacia Amazônica) para saber se o desmatamento afeta a incidência de melíponas na floresta Amazônica. Estudando sete espécies de melíponas, estes autores revelaram que a riqueza e a abundância dos meliponíneos estão diretamente relacionadas com a área de cobertura vegetal e inversamente proporcional ao tamanho da área desmatada.

A diversidade de abelhas sem ferrão no Estado de Rondônia é grande, mas o impacto da agricultura e do desmatamento sobre as abelhas sem ferrão no Estado afeta a

quantidade, diversidade e composição de abelhas (BROWN; OLIVEIRA, 2014). Algumas espécies podem sobreviver em ambientes perturbados, como exemplo a *Tetragonisca angustula* (FIERRO, 2012).

### **1.1 Abelhas nativas sem ferrão**

As abelhas (ordem Hymenoptera) formam um grupo bastante diverso, com cerca de 17.500 espécies agrupadas em gêneros e subgêneros, estimando-se, porém, que existam mais de 20 mil espécies espalhadas por todas as regiões do mundo onde existem angiospermas (MICHENER, 2007). A maioria das abelhas (cerca de 95%) não tem hábito social. No entanto, as abelhas sociais são as mais conhecidas, por serem exploradas para obtenção especialmente do mel estocado em suas colmeias e da polinização (NOGUEIRA-COUTO; COUTO, 2006).

As abelhas sem ferrão ou abelhas nativas provêm evolutivamente de um grupo de vespas que deixaram de transmitir caracteres genéticos para a formação do ferrão a seus descendentes (ALONSO, 1998). Entre as espécies de abelhas é observada uma grande variação quanto ao tamanho, à coloração e aos hábitos. Dependendo de cada espécie, os ninhos contêm de 500 a 80.000 indivíduos (CARVALHO et al., 2003).

As abelhas nativas constituem um grupo de abelhas muito importante, que povoam as regiões tropicais e subtropicais, compreendendo um grupo de aproximadamente 400 espécies (CHIARI et al., 2002). Cortopassi-Laurino et al. (2006) afirmaram que mais de 600 espécies em 56 gêneros vivem em áreas tropicais e subtropicais do mundo; sendo que existem 400 espécies conhecidas na região neotropical, e há uma estimativa de que existam mais de 100 para serem descritas.

As colônias de meliponíneos são constituídas por rainha, machos e operárias. O grupo meliponini é caracterizado por não construir células reais. Todas as rainhas, as operárias e os machos nascem e se desenvolvem até o estágio adulto, dentro de células de cria de igual tamanho. Além disso, a entrada dos ninhos está quase sempre, em todas as espécies, no centro de uma estrutura de terra, ou de geoprópolis (argila e resinas vegetais), crateriforme e raiada. Enquanto que quase todas as abelhas do grupo Trigonini constroem células reais, as quais são muito maiores que as de operárias ou machos e se destinam a criar rainhas (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Em colônias dos meliponíneos na época de boa florada, a rainha pode realizar uma postura de até 50 ovos por dia. As operárias podem chegar ao número de 5.000 abelhas

em uma colônia forte e realizam todo o trabalho interno e externo (NOGUEIRA-NETO, 1997). A principal função dos machos é de fecundar a rainha na época de procriação; em muitas espécies os machos produzem cera e trabalham com ela e em outras espécies também podem desidratar o néctar (KERR et al., 1996).

Nos meliponíneos, a reprodução e fundação de uma nova colônia perene são feitas por um conjunto de abelhas (rainha e operárias). Esse processo ocorre por meio de enxameagem progressiva, com longo período de contato entre colônia mãe e filha, ao contrário da ruptura abrupta observada em *Apis mellifera* (NOGUEIRA-NETO, 1997).

As operárias nascidas na colônia mãe passam vários dias abastecendo o novo ninho com materiais de construção (cerume) e alimento (NOGUEIRA-NETO, 1997). Esta característica pode limitar a formação de novas colônias aos sítios de nidificação mais distantes do ninho materno (BATISTA et al., 2003).

Quando uma população é iniciada por poucos indivíduos, a sua variabilidade dependerá da amostra de alelos trazida por estes fundadores. Este efeito fundador e o efeito de estrangulamento demográfico têm a mesma consequência: a redução da variabilidade genética e a formação de desequilíbrio de ligação. O número mínimo de indivíduos que se reproduziram durante o período de estrangulamento demográfico define a probabilidade de perda de alelos por deriva genética, e os alelos perdidos só podem ser recuperados por mutação ou, a partir de outras populações, por imigração (ROBINSON, 1998).

A determinação do sexo nas abelhas ocorre em duas fases: a primeira fase, poucas horas após a postura, em que os ovários ou os testículos são determinados, e a segunda fase, ao final da fase de pré-pupa, que determina o fenótipo sexual de todos os discos imaginiais (KERR, 1997). Os alelos *xo* são os primeiros genes determinadores do sexo a entrar em ação. Quando esses alelos ocorrem em hemizigose, determinam o desenvolvimento dos testículos, resultando em machos férteis e, em heterozigose, determinam o desenvolvimento dos ovários nas fêmeas. A ocorrência de alelos *xo* em homozigose determina a formação de machos diploides que são estéreis (KERR; VENCOSKY, 1982).

Quando há produção de machos diploides numa colônia de meliponíneo, a rainha é eliminada pelas operárias e a colônia tende a morrer por falta de operárias e de rainha (KERR, 1997). Esta característica é resultante de cruzamentos consanguíneos e ocorre com frequência nas pequenas reservas de matas primárias que são conservadas, e nos meliponários com poucas colônias (KERR et al., 1996).

O fato de possuir ferrão atrofiado contribuiu para que os meliponíneos desenvolvessem outras formas de defesa para o ninho quando são ameaçados. Por exemplo, a entrada de seus ninhos é guardada por abelhas que atacam os inimigos que tentam invadi-los, especialmente, formigas e abelhas de outras colônias (KERR et al., 1996).

Nogueira-Neto (1997) relatou que os meliponíneos são capazes de defender suas colônias quando são atacados por outros insetos fechando a entrada do ninho. As abelhas sem ferrão, mesmo possuindo ferrão atrofiado, atacam os invasores com as mandíbulas, enrolando-se nos pelos, envolvendo-os com geoprópolis ou entrando em orifícios dos inimigos de maior porte.

A principal limitação para a utilização comercial desses polinizadores é a dificuldade de produção de colônias em larga escala, o que é prejudicado pelo pouco conhecimento sobre a biologia reprodutiva dessas abelhas, pelas baixas taxas de reprodução natural dos ninhos e restrições apresentadas pelas técnicas de manejo disponíveis (CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006). Porém, colmeias modelo INPA foram testadas e mostraram-se 100% eficiente para o aumento rápido do número de colônias em meliponários (CARVALHO et al., 2003).

Hartfelder et al. (2006) concluíram que a compreensão de como as colônias regulam a alimentação larval nas abelhas sem ferrão é de extrema importância, pois contribui para o entendimento dos processos biológicos e evolutivos envolvidos na produção de rainhas, reprodução das colônias e determinação de castas.

Atualmente, a criação de abelhas sem ferrão também é utilizada como instrumento de conscientização como a educação ambiental. Essas abelhas representam um ótimo material didático, principalmente quando criadas em caixas racionais e organizadas em um meliponário (SÁ; PRATO, 2007).

## **1.2 Aspectos gerais de abelhas *Tetragonisca angustula***

As abelhas indígenas, especialmente a *Tetragonisca*, popularmente conhecidas como jataí, são criadas em praticamente todo território nacional, principalmente, pela ausência de defensividade, o que facilita seu manejo, bem como pelo fato de produzirem um mel bastante apreciado e valorizado. As abelhas sem ferrão são as de hábito mais limpo, pois não pousam em esterco de animais, não coletam suor animal

para a construção de ninhos ou misturar ao mel ou pólen. Além disso, o mel não necessita ser pasteurizado como o de outras espécies (NOGUEIRA-NETO, 1997).

O extrativismo de mel, cerume e resinas dessas abelhas é amplamente disseminado, principalmente, no norte e nordeste do Brasil (MENEZES-PEDRO; CAMARGO, 2000). Possuem características marcantes como o ferrão atrofiado e o comportamento altamente eussocial (SILVEIRA et al., 2002).

A biologia, o comportamento, os aspectos morfológicos e os bioquímicos de *T. angustula* têm sido estudados desde o início do século XX (OLIVEIRA et al., 2004). Os estudos com a abelha *T. angustula* se tornam importantes por existirem aspectos dessa abelha que interessam não somente à ciência, mas à economia e à sociedade em geral.

Ecologicamente, esses polinizadores são considerados essenciais para a biodiversidade global (GIANNINI et al., 2012). Contudo, essa interação inseto-planta tem sido perturbada pela degradação e desmatamento das florestas, uso indiscriminado de defensivos agrícolas, queimada e mesmo pela ação de meliões (LAUTENBACH et al., 2012).

A *T. angustula* tem facilidade em ocupar lugares variados para nidificação, tal fato influencia positivamente o sucesso evolutivo da espécie, mesmo com os grandes desmatamentos e as queimadas constantes nas florestas naturais do Brasil (CASTANHEIRA; CONTEL, 1995). A espécie é generalista com relação à nidificação, sendo encontrados ninhos em diversos lugares, como paredes de casas, tijolos e canos (SIQUEIRA et al., 2007). Ao contrário de algumas espécies de meliponini que estão associadas às áreas de floresta e não nidificam em áreas desmatadas (RAMALHO; BATISTA, 2005).

Quatro espécies compõem o gênero *Tetragonisca*; *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811), *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz, 1938), *Tetragonisca weyrauchi* (Schwarz, 1943) e *Tetragonisca buchwaldi* (Friese, 1925). Três espécies são encontradas no Brasil, tais como a *T. angustula*, a *T. fiebrigi*, a *T. weyrauchi*. A *T. weyrauchi* é a espécie que tem a distribuição mais restrita e é encontrada nos Estados do Mato Grosso, Rondônia e Acre. A *T. fiebrigi* tem distribuição nos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo, enquanto a *T. angustula* tem distribuição em todo país (MOURE, 2007).

A *T. angustula* é a única espécie que possui dois tipos de operárias guardas que realizam a defesa do ninho. Essa defesa é realizada por guardas que ficam pairando perto da entrada do ninho e o outro grupo sobre o tubo de entrada de cera. Ambos os

tipos de guardas são 30% mais pesadas que as forrageiras, apresentam corpo, cabeça e as primeiras pernas são maiores. Além disso, as operárias que removem o lixo do ninho são de tamanho intermediário, sugerindo que elas podem representar outra casta não reconhecida. Guardas ou soldados são criados em números baixos, mas suficientes para realizar esta tarefa (GRUTER et al., 2012).

A arquitetura e a organização do ninho são marcantes. Segundo Freitas e Soares (2004), a entrada é caracterizada por um tubo de cerume marrom-amarelado com a extremidade apresentando bordas mais estreitas de uma cera mais clara (Figura 1 – A).

O ninho é constituído por favos horizontais envoltos por um invólucro de cerume (Figura 1 – B) disposto de própolis dentro da colônia que, juntamente com a cera, são utilizados para fechar buracos e construir as paredes do ninho (KERR et al., 1996). Na natureza, as colônias se reproduzem a uma taxa de uma vez a cada dois anos (SLAA, 2006).

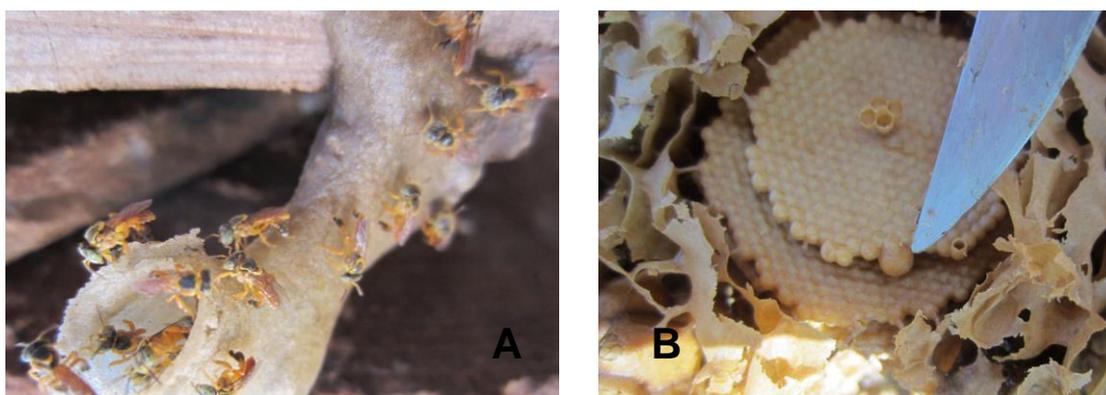


Figura 1 – **A)** Entrada do ninho de *T. angustula*; **B)** favos de cria, cerume formando o invólucro e a célula real. (Fotos: Ludimilla Ronqui)

A colônia de *T. angustula* pode chegar a conter 10.000 indivíduos (GRUTER et al., 2011). É constituída por uma rainha (Figura 2 - A), que realiza postura de até 50 ovos por dia em época de boa florada; por machos, cuja função é fecundar uma rainha virgem; e por operárias, que realizam todo o trabalho da colônia (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Os potes de alimento, geralmente, são construídos de cerume e podem apresentar tamanhos variados conforme a espécie. Pólen e mel são armazenados separadamente. Portanto, em uma colônia de abelhas sem ferrão podem-se encontrar dois tipos de potes de alimento: os de pólen e os de mel (Figura 2 – B e C). O pólen encontrado nos potes

possui também secreção enzimática das abelhas, sendo conhecido como saburá (NOGUEIRA-NETO, 1997).

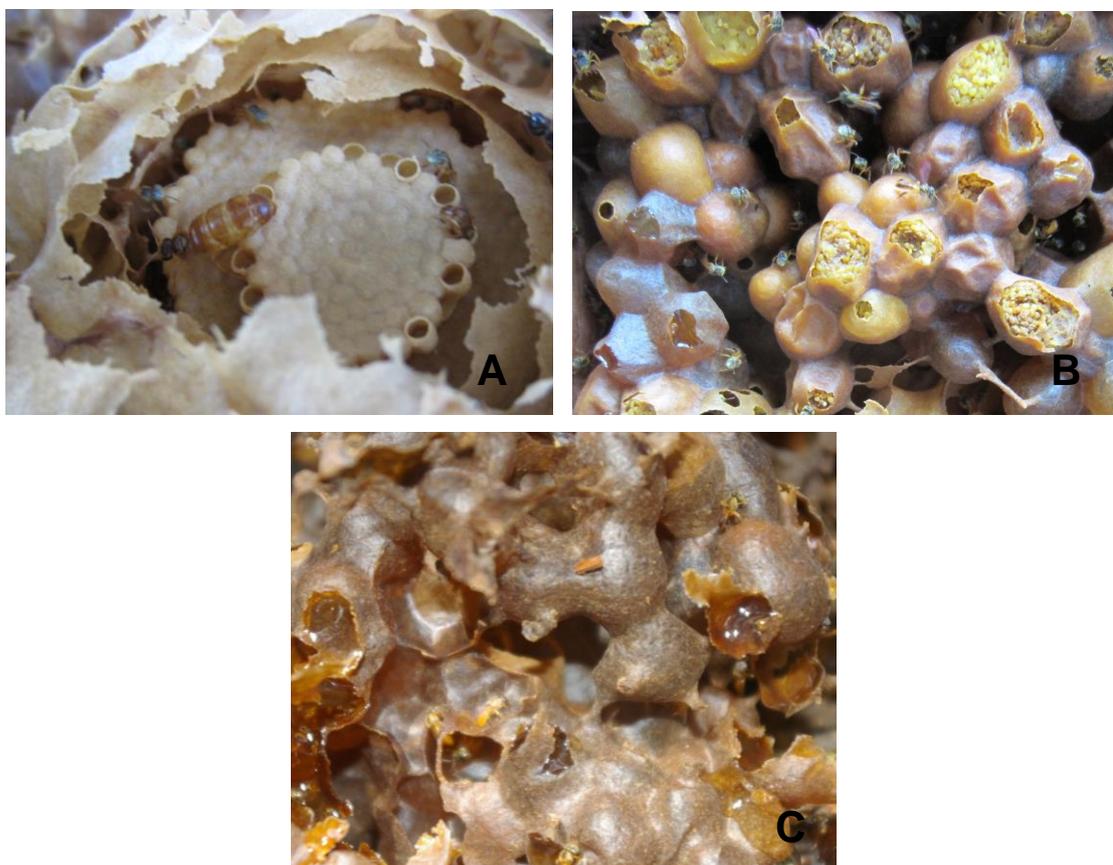


Figura 2 – **A)** Rainha de *T. angustula*; **B)** potes com saburá; **C)** potes com mel. (Fotos: Ludimilla Ronqui)

A abelha *T. angustula* também conhecida como abelha jataí produz mel de sabor muito apreciado, chegando a ser oito vezes mais valorizado do que o mel de *Apis mellifera*. O mel de abelha sem ferrão também é amplamente utilizado na medicina popular (NOGUEIRA-NETO, 1997; FREITAS; SOARES, 2004).

A coloração, aroma e sabor do mel variam de acordo com a sua origem floral, podendo ser quase incolor (oriundo de flores como o assa-peixe), âmbar (flores de laranjeiras), escuro (eucalipto, silvestre) e pardo escuro (trigo sarraceno). Com a idade e conforme a temperatura de estocagem do mel observa-se escurecimento. O superaquecimento e contaminação com metais também podem escurecer o mel. De maneira geral, o mel escuro tem mais sais minerais do que o mel claro. O mel mais escuro pode ter de quatro a seis vezes mais sais minerais que os claros, com destaque para o manganês, potássio, sódio e ferro (NOGUEIRA-COUTO; COUTO, 2006).

Além do mel e do pólen, a própolis é um produto formado pela mistura de resinas vegetais colhidas de secreções de árvores, troncos, brotos e flores (SILVA et al., 2006). São, geralmente, coletadas para fazer a proteção da colônia contra inimigos naturais como: formigas, moscas, forídeos e aranhas (NOGUEIRA-NETO, 1997).

A resina também é utilizada para evitar a entrada de luminosidade e passagem de vento, pois estes fatores afetam diretamente a movimentação das abelhas dentro e fora da colônia. A própolis é muito utilizada pelas abelhas por possuir algumas propriedades antimicrobianas, que impedem a proliferação de micro-organismos indesejáveis dentro da colônia (SILVA et al., 2006).

### **1.3 Aspectos gerais de abelhas *Tetragonisca weyrauchi***

A *T. weyrauchi* possui nidificação diferente das outras espécies do mesmo gênero. O ninho é aéreo, localizado principalmente em forquilhas inclinadas de árvores (Figura 3 – A). Os ninhos aéreos de abelhas têm uma exposição maior às variações climáticas e devem estar relacionados com uma ativação da capacidade de termorregulação, os quais são favorecidos por uma ou várias estruturas físicas que resultam em regiões frias, (na capacidade de reter energia térmica) e em regiões quentes (na capacidade de dispersá-la). Estruturas relacionadas com ventilação como batume perfurado já foram constatadas em ninhos de várias espécies de meliponíneos (CORTOPASSI-LAURINO; NOGUEIRA-NETO, 2003).

Essa espécie de abelha, com 4 milímetros de comprimento, de porte esguio e cor amarelada, constroi o tubo de entrada na parte inferior do ninho (Figura 3 – A). O tubo, de cera apresenta pequenos orifícios na parede (CORTOPASSI-LAURINO; NOGUEIRA-NETO, 2003).

O tubo da entrada é fechado depois das 18h e, pela manhã (Figura 3 – B), a abertura ocorre entre as 05h25min. – 06h05min., essa observação quando a temperatura foi realizada durante o período de novembro de 1999 a novembro de 2010 na cidade de Xapuri no Estado do Acre, quando a temperatura no período do estudo oscilou entre 21-23°C e a 93-91% de umidade relativa. Os ninhos de *T. weyrauchi* se adaptam bem em colmeias, tipo Paulo Nogueira-Neto. Essas abelhas são defensivas quando manuseadas. Estima-se que seus ninhos tenham uma população entre 2.000-3.000 indivíduos (CORTOPASSI-LAURINO; NOGUEIRA-NETO, 2003).

Os ninhos de *T. weyrauchi* são cilindroides e verticais, com cerca de 60 cm de circunferência na parte mais larga e 35 cm de altura. A cobertura é de uma película fina e maleável com diferentes consistências (Figura 3 – C, D). A maioria dos ninhos apresenta, na parte superior, um prolongamento com várias protuberâncias e aberturas, ou só aberturas com diâmetros milimétricos variáveis ao longo do dia, denominado de respiráculo (CORTOPASSI-LAURINO; NOGUEIRA-NETO, 2003).



Figura 3 – **A)** Ninho é aéreo localizado em forquilhas de árvore, a seta indica o tubo de entrada; **B)** tubo de entrada; **C)** cobertura de uma película fina e maleável com diferentes consistências; **D)** A seta indica cobertura nova com coloração mais clara. (Fotos: Ludimilla Ronqui).

As médias das temperaturas internas de um ninho habitado e outro vazio apresentaram diferenças. No ninho habitado, a média de temperatura registrada foi de 28,6<sup>0</sup>C, enquanto que o não habitado foi de 27,9<sup>0</sup>C. As temperaturas acompanharam as flutuações ambientais, com alto valor de correlação  $r = 0,98$  (CORTOPASSI-LAURINO; NOGUEIRA-NETO, 2003).

As colônias de *T. weyrauchi* possuem grande quantidade de lamelas de cerume ao redor dos discos de cria horizontais. Os potes ovoides de alimento medem cerca de 1-2 cm de altura (Figura 4 – A e B), e porcentagem de água no mel ao redor de 27,6%. As

coletas de néctar ocorrem predominantemente em *Myrtacea*, o que faz com que seja atribuída grande semelhança física e comportamental entre *T. weyrauchi* e *T. angustula* (CORTOPASSI-LAURINO; NOGUEIRA-NETO, 2003).

Quanto ao mel, amostras analisadas por Cortopassi-Laurino e Nogueira-Neto (2003) apresentaram 27,6% de água. Encontraram-se 11 diferentes tipos de pólen ( $n = 453$ ), sendo predominante o de Myrtaceae (85,2%), seguidos por Asteraceae (5,07%). Outros grãos de pólen foram identificados pertencentes às famílias Sapindaceae, Melastomataceae, Moraceae, Boraginaceae e Bombacaceae.



Figura 4 – **A)** Discos (12) pode ser observado a diferença de coloração; **B)** Potes de alimentos com mel e pólen. (Fotos: Ludimilla Ronqui).

As similaridades físicas, estruturais e comportamentais são encontradas nessas duas espécies de abelhas do gênero *Tetragonisca*. O hábito de nidificação aéreo sugere que este poderia ter sido o fator que restringiu uma distribuição geográfica de *T. weyrauchi* (CORTOPASSI-LAURINO; NOGUEIRA-NETO, 2003).

#### 1.4 Marcadores moleculares e *Tetragonisca*

Os marcadores são locos gênicos que apresentam variabilidade e podem ser utilizados para detectar diferenças entre dois ou mais indivíduos e entre duas ou mais populações. Eles apresentam altos níveis de polimorfismo e, na maioria das vezes, são codominantes, contendo maior quantidade de informação genética por loco (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores moleculares apresentam várias vantagens sobre os marcadores fenotípicos que estão disponíveis. Eles não são afetados pelo ambiente, podem ser detectados em todos os estágios do desenvolvimento, são ubíquos e cobrem todo o genoma (NAGARAJU, 2000).

Os marcadores genéticos são ferramentas indispensáveis, pois é impossível a identificação de espécies com base em características morfológicas e citogenéticas. Os marcadores genéticos são indicados para separar populações próximas geograficamente (MARQUES, 2002).

Os primeiros a serem desenvolvidos foram os marcadores embasados em variantes alélicas de isoenzimas, o que permitiu a ampliação do uso de marcadores de pelo menos uma ordem de magnitude em relação aos marcadores morfológicos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). O termo isoenzima define um grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima que ocorre em uma espécie, como resultado da presença de mais de um gene codificando cada uma das enzimas (MOSS, 1992).

Vários estudos com marcadores bioquímicos foram realizados em *T. angustula*. Estes estudos envolveram sistemas proteicos como enzima málica, esterases, fosfoglicomutase, glicerol-3-fosfato desidrogenase, isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase, hexoquinase, peptidases, proteínas totais e superóxido desmutase (FALCÃO; CONTEL, 1990, 1991; MACHADO; CONTEL, 1991; CASTANHEIRA; CONTEL, 1995, 2005).

Estudo comparando a expressão das esterases em *T. angustula* e *T. fiebrigi* foi realizado por Stuchi et al. (2012), que verificaram que o número de regiões com atividade esterásica variou de acordo com a espécie; em extratos de *T. fiebrigi* foram observadas três esterases as quais foram denominadas de EST-1 (mais anódica), EST-2 (intermediária) e EST-4 (menos anódica), enquanto que em extratos de *T. angustula* foram observadas duas regiões de atividade esterásica: EST-3 (mais anódica) e EST-4 (menos anódica).

A caracterização bioquímica das esterases por Stuchi *et al.* (2012) mostrou que apenas a EST-4 é comum às duas espécies. As EST-1 (*T. fiebrigi*) e EST-3 (*T. angustula*) provavelmente se diferenciaram por mutações ao longo da evolução das duas espécies, e a EST-2 (*T. fiebrigi*) pode ter originado por duplicação e mutações posteriores.

Muitas técnicas têm sido empregadas para revelar o amplo polimorfismo do genoma (NAGARAJU, 2000). As principais são: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeats, microssatélites) e ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeats, utilizando PCR).

Os métodos têm sido aplicados com o intuito de se caracterizar o genoma e até mesmo encontrar variabilidade genética entre populações ou espécies. Dentre os métodos de análise, destacam-se aquelas com enzimas de restrição (RFLP-“Restriction Fragment Length Polymorphism”), construção de mapa de restrição para todo o genoma, amplificação via PCR seguido de clivagem com endonucleases, clonagem e sequenciamento (ARIAS et al., 2003).

Em RFLP, a amostra de DNA é digerida em fragmentos por enzimas de restrição e, conseqüentemente, fragmentos de restrição são separados de acordo com seus tamanhos em eletroforese em gel, no qual é verificado se ocorre polimorfismo entre as amostras. Esse marcador é, em geral, codominante e permite a identificação de alelos maternos e paternos em indivíduos heterozigotos (SOUSA et al., 2003).

Utilizando a técnica de PCR-RFLP com o objetivo de obter marcadores genéticos para diferenciar as espécies de *T. angustula* e *T. fiebrigi*, Santos et al. (2015) testaram dez pares de *primers* heterólogos e a análise de restrição das regiões amplificadas foram testadas 13 enzimas. Os autores afirmaram que a análise de variância molecular mostra que 83% da variação ocorrem entre as populações analisadas e permitiram verificar que há hibridação entre as duas espécies de *Tetragonisca*.

A utilização do mtDNA em estudos populacionais e evolutivos é realizado pelo fato deste DNA possuir alta taxa de substituições de base, apresentar alterações no tamanho total da molécula por inserções e deleções, principalmente na região rica em A+T (ARIAS et al., 2003). Foi observado também que translocações de genes codificadores de tRNA parecem ser mais frequentes do que se imaginava, acarretando em alterações na ordem gênica entre organismos filogeneticamente relacionados (ARIAS et al., 2003).

Marcadores moleculares baseados em microssatélites, que são distribuídos na maioria dos genomas eucarióticos, constituem uma das classes mais polimórficas de marcadores moleculares disponíveis hoje; esses oferecem vantagens sobre os demais marcadores por ser codominante e facilmente reproduzíveis (BORÉM; CAIXETA, 2006). Os marcadores codominantes são mais indicados para estudos populacionais, pois, nesses casos, oferecem maior precisão e vantagens técnicas do que os marcadores dominantes (ARIAS et al., 2006).

A importância de marcadores microssatélites de abelhas sem ferrão para estudos de evolução foi discutida por Arias et al. (2006). Outros estudos têm descrito a importância desses marcadores para o entendimento da sistemática e evolução de abelhas sem ferrão (COSTA et al., 2005; MORETTO; ARIAS, 2005).

Apesar de extremamente eficientes, o uso de marcadores microsatélites em estudos de genética populacional depende de uma etapa prévia, que consiste na caracterização e descrição destes locos no organismo que se deseja estudar. Devido ao alto custo e tempo para o desenvolvimento de *primers* espécie-específicos para locos microsatélites, muitos estudos vêm utilizando cada vez mais *primers* descritos para uma determinada espécie em outras espécies relacionadas que ainda não possuem sequências microsatélites descritas e validadas (OLIVEIRA et al., 2006).

Essa transferência de *primers* microsatélite entre espécies relacionadas é uma vantagem para a utilização desse marcador - esse processo é denominado de transferabilidade ou amplificação cruzada. Isso permite que outra espécie seja avaliada com marcadores potentes, sem a necessidade de gastos com o desenvolvimento de *primers*. Os *primers* que se comportam desta forma são denominados heterólogos (HOSHINO et al., 2002).

A transferabilidade de locos microsatélites pode ser extremamente alta quando realizada em espécies ou gêneros taxonomicamente relacionados. Dependendo de sua localização (se o loco está ou não presente em uma região codante do genoma) esta taxa pode ser ainda maior (OLIVEIRA et al., 2006).

*Primers* microsatelites específicos para *T. angustula* foram projetados e testados 21 pares de *primers* microsatélites usando duas sondas de oligonucleotídeos simples. Quinze dos 21 loci mostraram-se polimórficos, os primers foram também utilizados com sucesso para amplificar locos microsatélites de outras espécies de abelhas sem ferrão, tais como *Tetragonisca fiebrigi*, *Tetragonisca weyrauchi*, *Lestrimelitta Maracaia* e *Schwarziana quadripunctata* (BRITO, et al., 2009).

Em meliponídeos, são poucos os trabalhos realizados empregando o mtDNA como marcador molecular para estudos populacionais, evolutivos e em estudos de caracterização desse genoma (ARIAS et al., 2003; ARIAS et al., 2006; KOLING; MORETO, 2010; FRANCISCO et al., 2014).

A caracterização da diversidade genética de populações é essencial para o conhecimento da biodiversidade de um determinado ecossistema. O entendimento da estrutura genética dessas populações pode auxiliar na preservação desses indivíduos e também contribuir para um manejo adequado.

## REFERÊNCIAS

- ABROL, D.L. **Pollination biology**: biodiversity conservation and agricultural production. New York: Springer, 2012.
- ALONSO, W.J. Abelhas sem ferrão: centenas de espécies para polinização, produção de mel, lazer e educação. Artigos técnicos. Animais de criação – Abelhas, **Revista A Lavoura**, ano 101, n. 626, p. 30-33, 1998.
- ARIAS, M.C.; BRITO, R.M.; FRANCISCO, F.O.; MORETTO, G.; OLIVEIRA, F.F.; SILVESTRE, D.; SHEPPARD, W.S. Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 259-274, 2006.
- ARIAS, M.C.; FRANCISCO, F.O.; SILVESTRE, D.O. DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. In: MELO, G.A.R.; ALVES-DOS-SANTOS, I. **Apoidea Neotropica**: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure. Criciúma: Unesc, 2003. p. 305-309.
- BATISTA, M.A.; RAMALHO, M.; SOARES, A.E.E. Nesting sites and abundance of meliponini (Hymenoptera: Apidae) in heterogenous habitats of the Atlantic Rain Forest, Bahia. **Brazil Revista Lundiana**, v. 4, n. 1, p. 19-23, 2003.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006.
- BRITO, R.M.; FRANCISCO, F.O.; DOMINGUES-YAMADA, A.M.T.; GONÇALVES, P.H.P.; PIOKER, F.C.; SOARES, A.E.E.; ARIAS, M.C. Characterization of microsatellite loci of *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Conservation Genet Resour**, v. 1, n. 1, p. 183-197, 2009.
- BROWN, J.C.; ALBRECHT, C. The effect of tropical deforestation on stingless bees of the genus *Melipona* (Insecta: Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in central Rondonia, Brazil. **Journal of Biogeography**, v. 28, n. 5, p. 623-634, 2001.
- BROWN, J.C.; OLIVEIRA, M.L. The impact of agricultural colonization and deforestation on stingless bee (Apidae: Meliponini) composition and richness in Rondônia, Brazil. **Apidologie**, v. 45, n. 2, p. 172-188, 2014.

CARVALHO, C.A.L.; ALVES, R.M.O.; SOUZA, B.A. **Criação de abelhas sem ferrão: aspectos práticos**. Cruz das Almas: Unversidade Federal da Bahia, 2003.

CASTANHEIRA, E.B.; CONTEL, E.P.B. Isoenzymes related to flight activity in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae): Evidence of posttranslational modification of the hexokinase and detection of new glycerol-3-phosphate dehydrogenase variants. **Biochemical Genetics**, v. 33, n. 11-12, p. 365-375, 1995.

CASTANHEIRA, E.B.; CONTEL, E.P.B. Geographic variation in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Mliponinae), **Journal of Apicultural Research**, v. 44, n. 3, p. 101-105, 2005.

CHIARI, W.C.; ATENCIA, V.M.; ERNESTO, A.; FRITZEN, T.; ALENCAR, V.; TOLEDO, A.; TERADA, Y.; RUVOLLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; TORAL, F.L.B.; PAIVA, G.J. Avaliação de diferentes modelos de colméias para abelhas jataí (*Tetragonisca angustula* Latreille, 1811). **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 4, p. 881-887, 2002.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; NOGUEIRA-NETO, P. Notas Sobre a bionomia de *Tetragonisca weyrauchi* Schwarz, 1943 (Apidae, Meliponini). **Acta Amazônica**, v. 33, n. 4, p. 643-650, 2003.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; ROUBIK, D.W.; DOLLIN, A.; HEARD, T.; AGUILAR, I.B.; VENTURIERI, G.C.; EARDLEY, C.; NOGUEIRA-NETO, P. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 275-292, 2006.

COSTA, R.G.; TAVARES, M.G.; DIAS, L.A.S.; CAMPOS, L.A.O. Isoenzyme variation in *Melipona rufiventris* (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) in Minas Geral State, Brazil. **Biochemical Genetics**, v. 43, n. 1-2, p. 49-58, 2005.

FALCÃO, T.M.M.A.; CONTEL, E.P.B. Genetic variability in natural populations of Brazilian social bees. I. Eletrophoretic data for PGM and MDH give evidence for multiple fertilization in stingless bees. **Revista Brasileira de Genética**, v. 14, n. 1, p. 47-59, 1991.

FALCÃO, T.M.M.A.; CONTEL, E.P.B. Genetic variability in natural populations of Brazilian social bees. I. Isozyme patterns and polymorphism for esterases and total protein. **Revista Brasileira de Genética**, v. 13, n. 4, p. 731-54, 1990.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.

FIERRO, M.M.; CRUZ-LÓPES, L.; SÁNCHEZ, D.; VILLANUEVA-GUTIÉRREZ, R.; VANDAME, R. Effect of biotic factors on the spatial distribution of stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in fragmented. Neotropical habitats. **Neotropical Entomology**, v. 41, p. 95-104, 2012.

FRANCISCO, F.O.; SANTIAGO, L.R.; BRITO, R.M.; OLDROYD, B.P.; ARIAS, M.C. Hybridization and asymmetric introgression between *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi*. **Apidologie**, v. 45, n. 1, p. 1-9, 2014.

FREITAS, G.S.; SOARES, A.E.E. **Procurando Irá**: um passeio ecológico. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2004.

GIANNINI, T.C.; ACOSTA, A.L.; GARÓFALO, C.A.; SARAIVA, A.M.; ALVES DOS SANTOS, I.; IMPEATRIZ-FONSECA, V.L. Pollination services at risk: Bee habitats will decrease owing to climate change in Brazil. **Ecological Modelling**, v. 244, n. 3, p. 127-131, 2012.

GRUTER, C.; KARCHER, M.H.; RATNIEKS, F.L.W. The natural of nest defence in a stingless bee, *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae), with two distinct types of entrance guards. **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 1, p. 55-61, 2011.

GRUTER, C.; MENEZES, C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; RATNIES, F.L.W. A morphologically specialized soldier caste improves colony defense in a neotropical eusocial bee. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the National of Sciences**, v. 109, n. 4, p. 1182-1186, 2012.

HARTFELDER, K.; MAKERT, G.R.; JUDICE, C.C.; PEREIRA, G.A.G.; SANTANA, W.C.; DALLACQUA, R.; BITONDI, M.M.G. Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 144-163, 2006.

HOSHINO, A.A.; PALMIERI, D.A.; BRAVO, J.P.; PEREIRA, T.E.B.; LOPES, C.R.; GIMENES, M.A. Marcador microssatélite na conservação de germoplasma vegetal. **Biociência**, v. 5, n. 29, p. 146-150, 2002.

KERR, W.E. Sex determination in bees (Apinae, Meliponinae) and its consequences. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 4, p. 601-612, 1997.

KERR, W.E.; CARVALHO, G.A.; NASCIMENTO, V.A. **A abelha uruçú**: biologia, manejo e conservação. Belo Horizonte: Fundação Acangáú, 1996.

KERR, W.E.; VENCOSKY, R. Melhoramento genético em abelhas. Efeito do número de colônias sobre o melhoramento. **Revista Brasileira de Genética**, v. 5, n. 2, p. 279-285, 1982.

KLEIN, A.M.; VAISSIERE, B.E.; CANE, J.H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S.A.; KREMEN, C. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of Royal Society Biological Sciences**, v. 274, n. 1608, p. 303-313, 2007.

KOLING, D.F.; MORETTO, G. Mitochondrial discrimination of stingless bees *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini) from Santa Catarina state, Brazil. **Apidologie**, v. 41, n. 4, p. 454-462, 2010.

LAUTENBACH, S.; SEPPET, R.; LIEBSCHER, J.; DORMANN, C.F. Spatial and temporal trends of lobal pollination benefit. **Plos One**, v. 7, n. 4, p. 1155-1163, 2012.

MACHADO, M.F.P.S.; CONTEL, E.P.B. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase isozyme vaiation in adult meliponids (Hymenoptera: Apidae). **Biochemical Genetics**, v. 29, n. 11-12, p. 593-600, 1991.

MARQUES, D.K. **Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros**. Corumbá: Embrapa Pantanal, Documentos 36, 2002.

MENEZES-PEDRO, S.R.; CAMARGO, J.F.M. Biodiversidade do estado de São Paulo: síntese do conhecimento ao final do século XX. Apoidea, Apiformes. In: BRANDÃO, C.R.F.; CANCELLO, E.M. **Invertebrados terrestres**. São Paulo: FAPESP, 2000. p. 193-211.

MICHENER, C.D. **The bees of the world**. 2. ed. Baltimore: The John Hopkins University Press, 2007.

MORETTO, G.; ARIAS, M.C. Systematics, morphology and physiology Detection of Mitochondrial DNA Restriction Site Differences Between the Subspecies of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 3, p. 381-385, 2005.

MOSS, D.W. **Isoenzymes**. New York: Capman & Hall, 1992.

MOURE, J.S.; URBAN, D.; MELO, G.A.R. **Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region**. Curitiba: Sociedade Brasileira Entomologia, 2007.

NAGARAJU, J. Recent advances in molecular genetics of the silk moth, *Bombyx mori*. **Current Science**, v. 78, n. 2, p. 151-161, 2000.

NOGUEIRA-COUTO, R.H.; COUTO, L. A. **Apicultura: manejo e produtos**. 3. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 1997.

OLIVEIRA, R.C.; NUNES, F.M.F.; CAMPOS, A.P.S.; VASCONCELOS, S.M.; ROUBIK, D.; GOULART, L.R.; KERR, W.E. Genetic divergence in *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 181-186, 2004.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, Evolution and Genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

RAMALHO, M.; BATISTA, M.B. Polinização na mata atlântica: perspectiva ecológica da fragmentação. In: FRANKE, C.R.; ROCHA, P.L.B.; KLEIN, W.; GOMES, S.L. **Mata Atlântica e Biodiversidade**. EDUFBA, 2005.

ROBINSON, I.P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. 2. ed. Viçosa: UFV, 1998. p. 329-380.

SÁ, N.P.; PRATO, M. Conhecendo as abelhas: um projeto de ensino. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 1, p. 107-110, 2007.

SANTOS, S.A.; BRONZATO, A.R.; MOREIRA, B.M.T.; ARAUJO, K.F.; RONQUI, L.; MANGOLIN, C.A.; TOLEDO, V.A.A.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C. Matrilineage differentiation of the genus *Tetragonisca* through mitochondrial DNA markers using PCR-RFLP technique. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 12828-12840, 2015.

SILVA, R.A.; RODRIGUES, A.E.; RIBEIRO, M.C.M.; CUSTÓDIO, A.R.; ANDRADE, N.E.D.; PEREIRA, W.E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extrato de própolis na Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1842-1848, 2006.

SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R.; ALMEIDA, E.A.B. **Abelhas brasileiras**: sistemática e identificação. Belo Horizonte: Fernando A. Silveira, 2002.

SIQUEIRA, E.L.N.; MARTINES, R.; NOGUEIRA-FERREIRA, F.H. Ninhos de abelhas sem ferrão (Hymenoptera, meliponinae) em uma região do rio Araguari, Araguari- MG. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 1, p. 38-44, 2007.

SLAA, E.J. Population dynamics of a stingless bee community in the seasonal dry lowlands of Costa Rica. **Insectes Sociaux**, v. 53, n. 1, p. 70-79, 2006.

SOUSA, C.S.; KERR, W.E.; BONETTI, A.M.; SOUZA, C.S.; SANTANA, F.A.; GOULART, L.R.; OLIVEIRA, R.C.; VIEIRA, C.V.; VASCONCELOS, S.M. Comparação das técnicas de SSCP, DS-PCR, PCR-RFLP para detecção de mutação no gene mitocondrial 16s rRNA em populações de *Melipona rufiventris*. **Bioscience Journal**, v. 19, n. 1, p. 65-70, 2003.

STUCHI, A.L.P.B.; TOLEDO, V.A.A.; LOPES, D.A.; CANTAGALLI, L.B.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C. Molecular marker to identify two stingless bee species: *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera, Meliponinae). **Sociobiology**, v. 59, n. 1, p. 123-134, 2012.

## II – OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar a diversidade genética em populações de abelhas sem ferrão (*Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca weyrauchi*) utilizando marcador microssatélite.
- Avaliar a diversidade genética em populações de abelhas sem ferrão (*Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca weyrauchi*) utilizando marcador PCR-RFLP.
- Determinar os haplótipos mitocondriais.
- Descrever arquitetura do ninho e nidificação em *Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca weyrauchi*.
- Avaliar o desenvolvimento e temperatura das colônias utilizando diferentes dimensões e espessuras em colmeias, modelo Fernando Oliveira/INPA.

### III – Variabilidade genética de *Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca weyrauchi* (Hymenoptera, Apidae) do Estado de Rondônia

#### RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética de *T. angustula* e *T. weyrauchi* por meio dos marcadores de microssatélites. Foram coletadas abelhas operárias de colônias localizadas em Cacoal, Ji-Paraná, Jaru, Ariquemes, Cacaupônia, Monte Negro, Alto Paraíso e Porto Velho no Estado de Rondônia. Após o isolamento do DNA foram realizados testes com nove *primers* microssatélites. O sucesso na amplificação e presença de polimorfismo com quatro *primers*: (T3-32, Mbi33, Mbi254 e Tang 77) foram selecionados para análise das duas espécies, pois demonstraram qualidade na amplificação dos locos. Os maiores valores de heterozigosidade observados foram estimados para o loco *Tang77* de *T. angustula* (0,1333). Os valores de heterozigosidade esperada maiores que os de heterozigosidade observada e os valores positivos de  $F_{IS}$  indicaram que há excesso de homozigotos. As populações analisadas estão moderadamente diferenciadas, o valor estimado de  $F_{ST}$  foi de 0,0717. A análise de variância molecular indicou que 9% da variação ocorrem entre as populações e 91% dentro das populações. Análise por inferência bayesiana utilizando o método de Monte Carlo via cadeias de Markov não separaram as duas espécies de *Tetragonisca* analisadas. Os marcadores microssatélites utilizados não foram eficientes em separar as duas espécies estudadas.

**Palavras-chave:** Abelha sem ferrão, Amazônia, genética de populações, Jataí.

#### ABSTRACT

This work aimed at evaluating the genetic diversity of *T. angustula* and *T. weyrauchi* by means of microsatellite marker. Some worker bees were collected from nests in Cacoal, Ji-Paraná, Jaru, Ariquemes, Cacaupônia, Monte Negro, Alto Paraíso and Porto Velho – in Rondônia State. After isolating DNA, tests were performed with nine microsatellite primers. The success in the amplification and in the presence of Polymorphism occurred with four primers: (T3-32, Mbi33, Mbi254 and Tang 77) two species were selected for analysis because they demonstrate quality in the amplification of the loci. The heterozygosity values expected greater than those heterozygosity observed and the positive values of  $F_{IS}$  indicated that there is excess of homozygotes. The populations analyzed are moderately differentiated, the estimated value of  $F_{ST}$  was 0,0717. The analysis of molecular variance indicated that 9% of the variation occurred among populations and 91% within populations. Analysis by Bayesian inference using Monte Carlo method by Markov chains (MCMC) did not separate the two kinds of *Tetragonisca* analyzed. The microsatellite markers used were not efficient in separating the two studied species.

**Keywords:** stingless bees, Amazonia, Population Genetics, Jataí.

## INTRODUÇÃO

A tribo meliponini é formada por 56 gêneros, 33 são exclusivamente neotropicais, com 397 espécies descritas (CAMARGO; PEDRO, 2013). O gênero *Tetragonisca* é composto por quatro espécies: *T. angustula*, *T. fiebrigi*, *T. buchwaldi* e *T. weyrauchi*. A espécie *T. buchwaldi* não tem distribuição no Brasil, e a *T. weyrauchi* tem a distribuição mais restrita, encontrada somente na região Norte, nos Estados do Mato Grosso, Rondônia e Acre (MOURE, 2007).

O Estado de Rondônia apresenta um grande número de espécies de abelhas sem ferrão. Em estudo realizado por Brown e Oliveira (2014), foram descritas 110 espécies, e registradas dez novas espécies. Os autores afirmam que o impacto agrícola e o desmatamento sobre as abelhas em Rondônia afetaram a quantidade, diversidade e composição de abelhas sem ferrão. O desmatamento pode ter consequências graves para a polinização e reprodução de plantas nativas e cultivadas (KERR et al., 2001).

Apesar do reconhecido e importante papel ecológico dos meliponini, pouco se sabe sobre a variabilidade genética populacional de suas espécies. Os parâmetros genéticos são de extrema importância, pois podem ser utilizados para inferir processos que moldam ou moldaram as populações, possibilitando traçar estratégias de conservação para espécies (COUCEIRO et al., 2011; MOUTOU et al., 2011).

Diversos trabalhos estão sendo realizados utilizando espécies do gênero *Tetragonisca*, especialmente com *T. angustula* e *T. fiebrigi*, porém grande parte dessas avaliações envolve a identificação genética das espécies, principalmente pelas divergências taxonômicas (BAITALA et al., 2006; BARTH et al., 2011; STUCHI et al., 2012; FRANCISCO et al., 2014; SANTOS et al., 2015).

Os microssatélites são marcadores moleculares, que permitem acessar ampla gama de diferenciações e abordar os processos ecológicos e evolutivos, sendo adequados para estudos populacionais (ARIAS et al., 2006). A caracterização por microssatélites permite identificar a presença de alelos polimórficos em uma população e é uma medida muito útil de sua diversidade genética (FRANKHAM et al., 2008).

Pela diversidade de abelhas apresentada no Estado de Rondônia e sabendo que o desmatamento de florestas e manejo inadequado pode contribuir para a diminuição das populações de abelhas sem ferrão, é importante a conservação e manejo das populações. Assim, esse estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética de *T. angustula* e *T. weyrauchi* por meio de marcadores de microssatélites.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta das abelhas

Abelhas operárias adultas de *T. angustula* (Latreire, 1811) e *T. weyrauchi* (Schwarz, 1943) foram coletadas de 32 colônias, destas, 22 colônias de *T. angustula* foram provenientes das seguintes localidades do Estado de Rondônia: Porto Velho, Cacoal, Ji-Paraná, Jaru, Cacaúlândia, Alto Paraíso, Ariquemes e Monte Negro (Figura 1). Enquanto que as dez colônias de *T. weyrauchi* foram coletadas na região do município de Alto Paraíso. As coletas foram realizadas de acordo com a autorização número: 29423-2 do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – Sisbio.

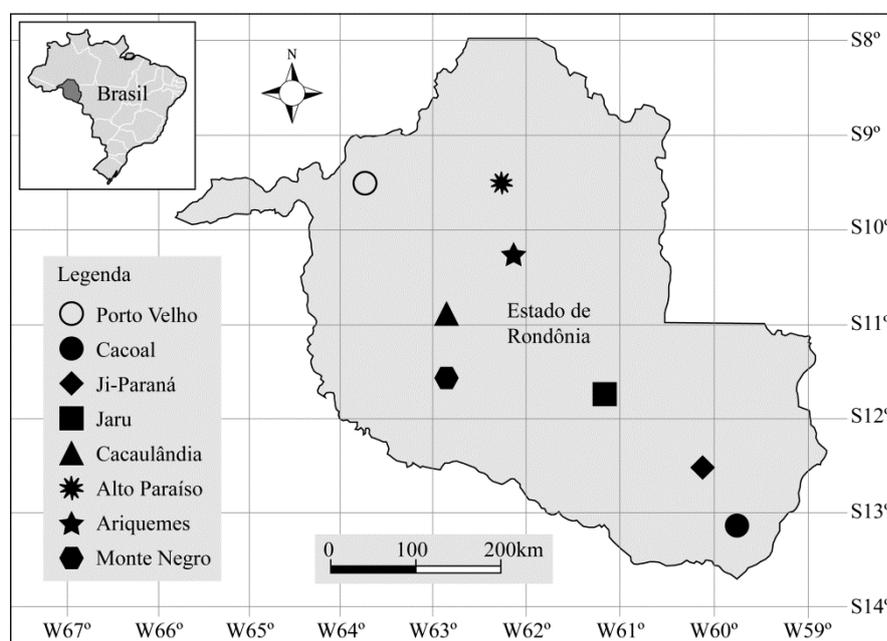


Figura 1 – Identificação dos locais de coleta de *T. angustula* e *T. weyrauchi* no Estado de Rondônia.

### Isolamento do DNA nuclear

O método usado para extração do DNA total foi com base no método modificado de Yu et al. (1993). O tórax foi homogeneizado individualmente em tubos de 1,5 mL, contendo 300 µL do tampão de extração [200 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,5% SDS, 250 mM NaCl, 50 mM EDTA e 100 mg/mL Proteinase K]. Após 01 h de incubação a 65°C, o material foi centrifugado durante 10 min. (10.000 xg) e o sobrenadante transferido para um novo tubo, adicionando-se igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguido por centrifugação a 10.000 xg por 10 min. e transferência do sobrenadante para um novo

tubo, sendo que este procedimento foi realizado duas vezes. Após homogeneização e centrifugação para separação das fases, a fase superior foi transferida para um novo tubo. O DNA precipitado por meio da adição de 250 µL de isopropanol gelado e incubado a -20°C *overnight*. O DNA precipitado foi separado por centrifugação a 10.000 xg por 10 min. Após descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado com 1,0 mL de etanol 70% gelado e deixado secar na temperatura ambiente. Depois de seco, o DNA foi ressuscitado por 02 h em 30 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA), tratado com RNase (10 µg/mL) e mantido por mais 02 h em temperatura ambiente e armazenado a -20°C. A quantificação do DNA foi avaliada por meio das análises em Picodrope mikroliteres UV spektrofotômetro - Zenon Bio com faixa de comprimento de onda de 230-850 nm.

### Amplificação dos locos microssatélites

Foram utilizadas cinco abelhas operárias de cada colônia, para a amplificação de DNA empregando nove pares de *primers* microssatélites, dois específicos para *Scaptotrigona postica* (PAXTON et al., 1999), cinco foram desenvolvidos para *Melipona bicolor* (PETERS et al., 1998), dois para *Tetragonisca* (BRITO et al., 2009) (Tabela 1).

Tabela 1 – Tamanho do fragmento (TF), número de repetições dos *primers* na amplificação de DNA de *T. angustula* e *T. weyrauchi*

Loco	Primer (5' → 3')	TF	Número de repetições
<i>T7-5</i>	GAGAGAGTCGGAGAAGAGGGC TGGCGGAACCACTGGTTCG	104	(CT)21
<i>T3-32</i>	GCGGGAGGGAAAGTCCTCTCG CGTCTTCGTCAGGCGTGC	125	(CT)20
<i>Mbi 33</i>	ATCACCTAACTTGGCATCCC GATCAAGGGCCAAGAGGA	140	(AGG)(AGA)5(GGA)2 GAA(GGA)2
<i>Mbi 215</i>	AGAGACGAAAAGTGGCGG GATAGCGGCGGAGAGATT	92	CTT(CTC)2CTTCTCTGCT TCC(TCT)9CCTTCG(TCT)2
<i>Mbi 254</i>	CAATCGTTGGAAGGAACGG ACCTATACCCAAGTCCAT	213	(AAG)11
<i>Mbi 259</i>	CGCGTTAACATTTCGCTA CTGTTCGACTGTTCTCACTCT	183	(TTC)6
<i>Mbi 278</i>	GTTTAATCGCCAAAGAGGC GTTGCGAGAACTCTGACGAT	113	TTC(TCC)2TCTTC (TCT)2(TCC)3
<i>Tang 77</i>	CGTTTGAACGATGAACTGGA CCTATTTCCGACGCTCTGTC	175 225	(CT)16CC(CT)3
<i>Tang 78</i>	CGAATACGATCTGCACTCCTC ATTCACGACGATACGCCACT	208 260	(CT)23

A reação foi preparada com 20  $\mu\text{L}$  de solução, contendo: água, 1  $\mu\text{L}$  de enzima *Taq Dna Polimerase (Platinum)*, 2,5 mM cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), 2,0  $\mu\text{L}$  tampão da enzima *Taq Platinum*, 0,4 mM Deoxinucleotídeos (dNTPs), 0,4  $\mu\text{M}$  *Primers (Forward e Reverse)*, 2  $\mu\text{L}$  DNA – 10 ng.

As reações do PCR foram realizadas em termocicladores *Eppendorf*, (*Applied Biosystems* e *Techine*), conforme o protocolo original descrito por Paxton et al. (1999), com modificações de temperatura na etapa de desnaturação de 92°C para 94°C e tempo de extensão final de 30 seg. para 45 seg. O processo de amplificação foi iniciado por uma desnaturação inicial em 94°C por 3 min., seguida por 40 ciclos de 30 seg. a 94°C, 1 min. a temperatura específica para cada *primer*, 45 seg. a 72°C e 5 min. a 72°C para extensão final (Tabela 2).

Tabela 2 – Temperaturas de anelamento específicas, temperaturas usadas para adaptação dos *primers* na amplificação de DNA de *T. angustula* e *T. weyrauchi*

Loco	Temperaturas de anelamento específicas	Temperaturas usadas
<i>T7-5</i>	60 °C <sup>1</sup>	<i>Touchdown</i>
<i>T3-32</i>	60 °C <sup>1</sup>	<i>Touchdown</i>
<i>Mbi 33</i>	60 °C <sup>2</sup>	<i>Touchdown</i>
<i>Mbi 215</i>	57.5 °C <sup>2</sup>	64 °C
<i>Mbi 254</i>	55 °C <sup>2</sup>	55 °C
<i>Mbi 259</i>	57.5 °C <sup>2</sup>	57.5 °C
<i>Mbi 278</i>	60 °C <sup>2</sup>	<i>Touchdown</i>
<i>Tang 77</i>	55 °C <sup>3</sup>	55 °C
<i>Tang 78</i>	55 °C <sup>3</sup>	55 °C

<sup>1</sup>Paxton et al. (1999); <sup>2</sup>Peters et al. (1998); <sup>3</sup>Brito et al. (2009); Touchdown (DON et al., 1991).

O programa *Touchdown-PCR* com temperatura variando de 65°C a 55°C. Desnaturação inicial 94°C por 1 min., desnaturação 94°C por 1 min., anelamento 65°C (-1°C/ciclo) por 1 min., extensão 72°C por 2 min., desnaturação 94°C por 1 min., anelamento 65°C (-1°C/ciclo) por 1 min., extensão 72°C por 2 min., volta ao passo 2 por nove vezes, desnaturação 94°C por 1 min., anelamento 55°C por 1 min., extensão 72°C por 2 min., volta ao passo 9 – 17 vezes, extensão final 72°C por 2 min., imersão a 15°C (DON et al., 1991). Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 4% (agarose + agarose MS-8), a 60 v, utilizando o volume total da reação (20  $\mu\text{L}$ ) adicionado a 2  $\mu\text{L}$  de *load* (azul de bromofenol [0,25 %] + glicerol [30 %]).

Para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular Ladder 100 Kb (*Invitrogen*<sup>®</sup>). Os geis foram corados em solução de brometo de etídeo por 30 min. para visualização das bandas e fotodocumentados em sistema EDAS - Kodak 1 D Image Analysis 3.5.

### **Análise dos dados**

As análises dos dados moleculares envolveram a interpretação do tamanho dos fragmentos de DNA obtidos. As análises foram realizadas considerando duas populações, a população 1 representada por indivíduos de *T. angustula* e a população 2 representada por indivíduos de *T. weyrauchi*. As frequências gênicas foram diretamente estimadas, bem como a medida da variabilidade genética, por determinação dos desvios das frequências genotípicas esperadas de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculadas utilizando o programa Popgene 1.32 (YEH et al., 1999) e o programa GENEPOP web version 4.2 (ROUSSET, 2008).

Foram calculados ainda os coeficientes de identidade e distâncias genéticas de Nei (1978). O programa GeneaLex 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2006) foi utilizado para a Análise de Variância Molecular (Amove) utilizando a estatística  $\Phi_{PT}$  ( $\Phi_{PT}$ ).

A estimativa do número de subpopulações foi realizada de acordo com Evanno et al. (2005), utilizando a estatística de  $\Delta K = \frac{L_n(P(X/K))}{L_{n+1}(P(X/K))}$  entre sucessivos valores de K (número de populações) e em que X = probabilidade do indivíduo apresentar o alelo em uma população. A estimativa foi feita com valores de K variando de 2 a 8 e o valor de K utilizado foi aquele que apresentou maior valor de  $\Delta K$ . Esta estimativa foi realizada utilizando o software structure 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000) e estrutura Harvester ([http://taylor0.biology.ucla.edu/struct\\_harvest/](http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/)). O *burn-in* foi fixado em 3 mil repetições e o método de Monte Carlo via cadeias de Markov (MCMC) em 30 mil. O número de iterações estabelecido foi de 10.

### **RESULTADOS**

A partir dos *primers* testados para *T. angustula* e *T. weyrauchi*, os *primers* T7-5 e Mbi278 a amplificação não foi satisfatória, apresentaram respectivamente monomorfismo e bandas inespecíficas, o que não permitiu a definição dos locos microssatélites para análise. Os *primers* Mbi215, Mbi259 e Tang78 amplificaram para *T. angustula* e não amplificaram para *T. weyrauchi*.

Entretanto, quatro *primers* (T3-32, Mbi33, Mbi254 e Tang77) foram selecionados para análise das duas espécies, pois apresentaram qualidade na amplificação dos locos microssatélites. Os quatro locos microssatélites analisados apresentaram número de alelos que variaram entre três e cinco.

O alelo que apresentou a maior frequência foi o T3-32-A em *T. angustula* (população 1), e em *T. weyrauchi* (população 2) com valores de 0,8403 e 0,8805,

respectivamente. O alelo que apresentou a menor frequência foi *Mbi254-E* com 0,0086 em *T. angustula* e 0,0067 em *T. weyrauchi* (Tabela 3).

Tabela 3 – Frequência dos alelos de microssatélites de *T. angustula* e *T. weyrauchi* nas populações do Estado de Rondônia

Frequência dos alelos			
Loco	Alelos	População 1 <i>T. angustula</i>	População 2 <i>T. weyrauchi</i>
<i>T3-32</i>	<i>A</i>	0,8403	0,8805
	<i>B</i>	0,1345	0,1006
	<i>C</i>	0,0252	0,0189
<i>Mbi33</i>	<i>A</i>	0,3417	0,2562
	<i>B</i>	0,6250	0,7188
	<i>C</i>	0,0333	0,0250
<i>Mbi254</i>	<i>A</i>	0,5517	0,5400
	<i>B</i>	0,3276	0,3267
	<i>C</i>	0,0733	0,0967
	<i>D</i>	0,0388	0,0300
	<i>E</i>	0,0086	0,0067
<i>Tang77</i>	<i>A</i>	0,5708	0,6219
	<i>B</i>	0,3542	0,3219
	<i>C</i>	0,0750	0,0563

Os maiores valores de heterozigosidade observados foram estimados para o loco *Tang77* de *T. angustula* (0,1333). Os valores de heterozigosidade esperados são maiores que os de heterozigosidade observados e indicaram que há excesso de homozigotos (Tabela 4), o que ocasionou desvio das proporções de Hardy-Weinberg ( $p < 0,05$ ). Nos locos *T3-32* e *Mbi33* para as duas espécies analisadas não foi observado polimorfismo. O loco *Mbi254* apresentou polimorfismo em *T. angustula*.

Tabela 4 – Valores de heterozigosidade observada (*Ho*) e esperada (*He*) obtidos com marcadores microssatélites para *T. angustula* e *T. weyrauchi* do Estado de Rondônia

Loco	População 1		População 2	
	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>
<i>T3-32</i>	0,0000	0,2763	0,0000	0,0000
<i>Mbi33</i>	0,0000	0,4936	0,0000	0,0000
<i>Mbi254</i>	0,0431	0,5839	0,0000	0,6234
<i>Tang77</i>	0,1333	0,5454	0,0000	0,3532
Média	0,0441	0,4748	0,0000	0,2441

Os valores positivos e próximos a 1 de  $F_{IS}$  (índice de fixação) indicaram que há excesso de homozigotos nas populações analisadas (Tabela 5). Por meio do valor de

$F_{ST}$ , podemos observar que as populações estão moderadamente diferenciadas, pois o valor estimado foi de 0,0717 e, de acordo com Wright (1969), valores de  $F_{ST}$  entre 0,05 e 0,15 indicam diferenciação moderada entre as populações. Na Tabela 5 pode ser observado também que houve fluxo gênico entre as populações, pois foram obtidos valores altos de  $Nm$ .

Tabela 5 – Índice de fixação ( $F_{IS}$ ), grau de diferenciação ( $F_{ST}$ ) e fluxo gênico ( $Nm$ )

Loco	$F_{IS}$	$F_{ST}$	$Nm$
T3-32	1,0000	0,0744	3,1118
Mbi33	1,0000	0,2082	0,9508
Mbi254	0,9639	0,0062	40,0640
Tang77	0,8505	0,0346	6,9683
Média	0,9413	0,0717	3,2370

O valor de identidade genética (NEI, 1978) observado entre as populações de *T. weyrauchi* e *T. angustula* foi de (0,9432) e a distância genética igual a 0,0605. A análise de variância molecular (AMOVA) indicou que 9% da variação ocorrem entre as populações e 91% dentro das populações. A análise de ordenação por componente principal (PCoA), mostrou que um único eixo (coordenada 1) é responsável por 74,67% (Figura 2) da variância entre os grupos formados. O eixo 2 foi representado por 16,78% e o eixo 3 por 3,86%.

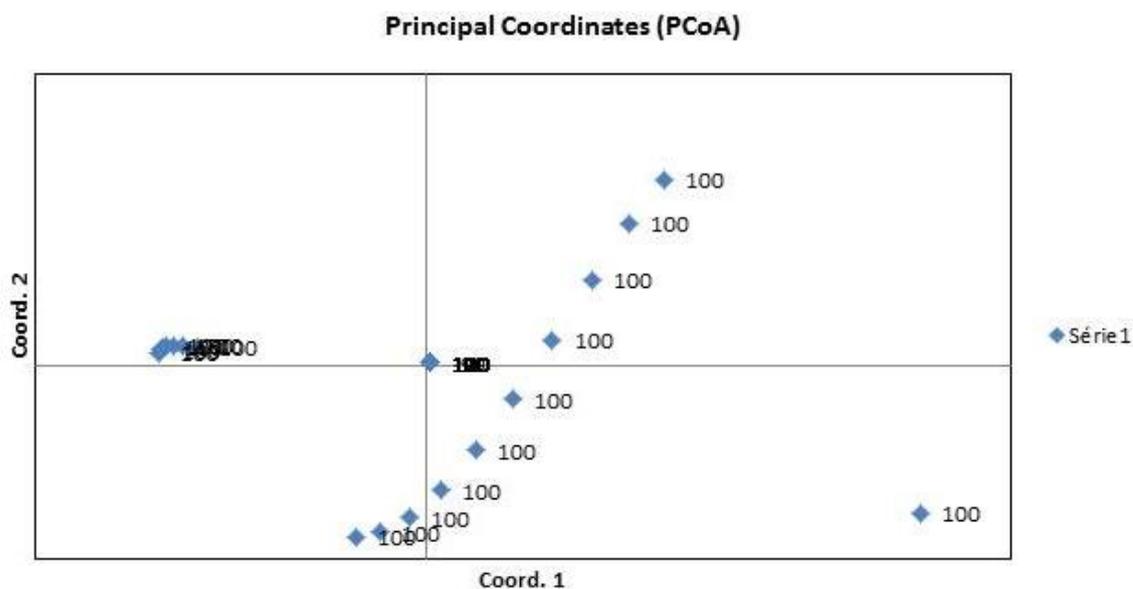


Figura 2 – Análise em componentes principais (PCoA) evidenciando a ordenação dos grupos estabelecidos pelas amostra de populações de *Tetragonisca* do Estado de Rondônia.

A análise por inferência bayesiana, utilizando a cadeia MCMC, indicou resultado semelhante ao obtido com a análise empregando distância genética de Nei (1978), como pode ser visualizado na Figura 3. Nesta análise foi estimado o número de populações,  $K=4$ . Na Figura 3 é possível verificar ainda que as populações 1 e 2 não estão separadas e compartilham alelos, e a coloração azul na figura indica a maior frequência do alelo em *T. angustula*. Os resultados mostram que a *T. weyrauchi* é mais antiga evolutivamente que a *T. angustula*, seria importante realizar estudo de filogenia para verificar.

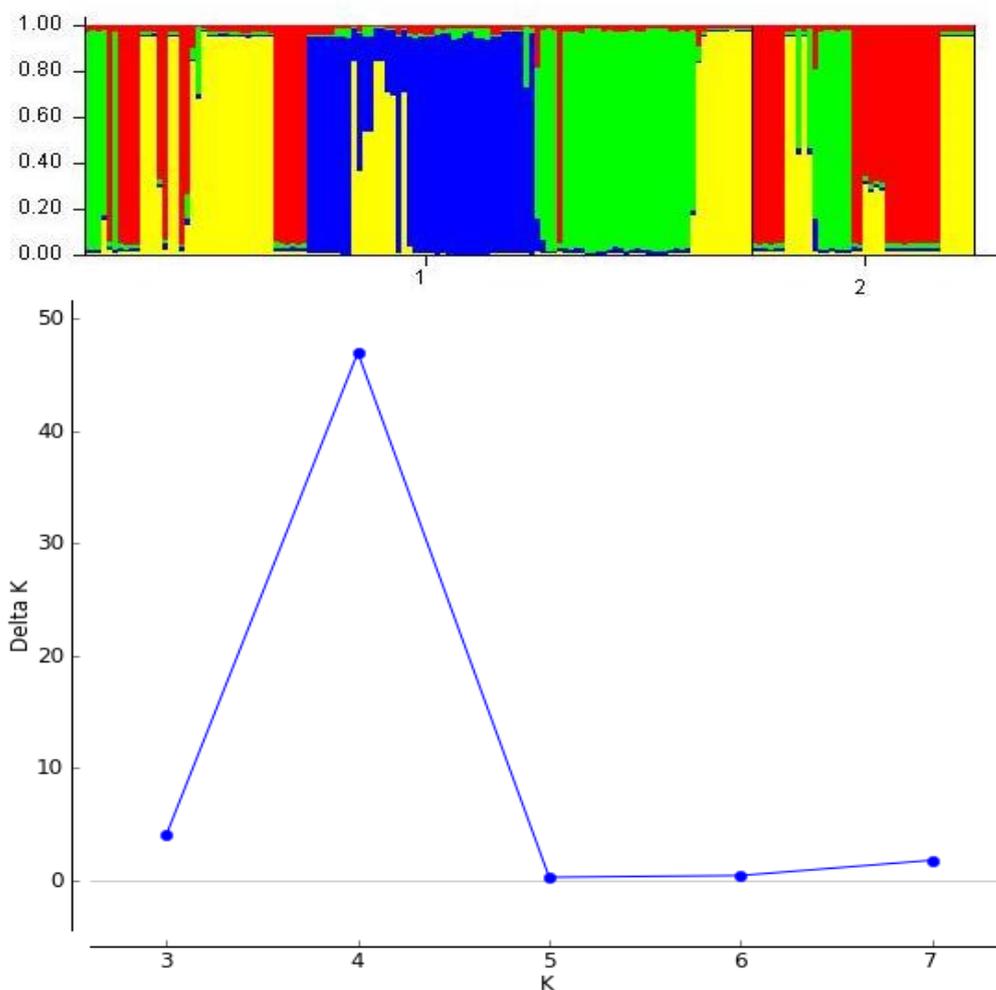


Figura 3 – **A:** Por inferência bayesiana (MCMC) número de populações estimado em  $K = 4$ . **B:** Estimativa do número de populações pelo método de Evanno et al. (2005).

## DISCUSSÃO

Hurtado-Burillo et al. (2014), com *primers* heterólogos, compararam *Melipona colimana* coletadas em duas localidades no México com *M. beecheii* coletadas em Cuba, utilizando resultados obtidos por Quezada-Euán et al. (2007) ambos os estudos empregaram marcadores microssatélite, avaliaram sete locos microssatélites. Os autores verificaram que para *M. colimana* os locos *T7-5* e *Mbi259* eram monomórficos, o loco *Mbi254* apresentou quatro alelos. Em *M. Beecheii*, somente o loco *Mbi259* foi monomórfico, o *Mbi254* apresentou quatro alelos e *T7-5* apresentou três alelos. Esses resultados diferem dos observados para *T. angustula* e *T. weyrauchi*, o loco *Mbi254* apresentou um número maior de alelos (5) e os *primers* *T7-5* e *Mbi259* não foram reproduzíveis para as espécies de *Tetragoniscas* avaliadas.

Vários trabalhos utilizam *primers* heterólogos para avaliar a diversidade genética; um exemplo é o estudo realizado por Borges et al. (2010), que utilizaram nove locos de microssatélite heterólogos em *Partamona helleri*, apenas dois (*Mbi254* e *Mbi278*) apresentaram polimorfismo. O loco *Mbi254* gerou 5-8 alelos em diferentes populações enquanto loco *Mbi278* gerou dois alelos em todas as populações analisadas no Estado de Minas Gerais. O número de alelos para o loco *Mbi254* em *P. helleri* foi maior do que o registrado para *T. angustula* e *T. weyrauchi*.

Os locos *Mbi33*, *Mbi215*, *Mbi254* e *Mbi259* também foram avaliados por Francisco et al. (2006) para as espécies de *P. remota* e *Tetragona clavipes*, sendo que o número de alelos diferiram entre as espécies. Para o loco *Mbi33* encontraram em *P. remota* (01 alelo) e *Tetragona clavipes* (02 alelos), número de alelo nesse estudo foi menor do que observado para as espécies de *Tetragonisca*. Os autores ainda encontraram os mesmo valores para os locos *Mbi215* e *Mbi254*, já para o loco *Mbi259*, este apresentou maior número de alelos (06) nas espécies estudadas. Enquanto que em *Tetragonisca* os locos *Mbi215* e *Mbi259* só amplificaram para *T. angustula*.

O fato dos *primers* heterólogos amplificarem para *T. angustula* e não para a *T. weyrauchi* está associado ao processo de transferabilidade de *primers* heterólogos que envolvem fatores como o tamanho e a complexidade do genoma e a localização do microssatélite em região codificante ou não (OLIVEIRA et al., 2006). A falta de compatibilidade no genoma para transferência de microssatélites também ocorreu no estudo realizado por Francisco et al. (2006) com o *primer* *T7-5* com *Plebeia remota*, *P. mulata* e *P. helleri*.

Francisco et al. (2006) relataram que os *primers* heterólogos, apesar de contribuírem para a compreensão da estrutura genética de populações de espécies para as quais não foram especificamente desenhados, devem ser usados com cautela, pois revelaram grau de polimorfismo mais baixo. A transferência destes marcadores é melhor entre grupos mais próximos (CARVALHO-ZILSE; KERR, 2006) e quanto maior a distância filogenética entre a espécie para a qual os *primers* foram desenhados e a espécie em que foram empregados, menor será o polimorfismo observado.

Os *primers* Tang77 e Tang78, utilizados neste estudo, estão entre os 21 locos específicos para *T. angustula* desenvolvidos por Brito et al. (2009), que segundo os autores, esses *primers* microssatélites foram transferíveis para outras espécies de abelhas como *T. fiebrigi*, *T. weyrauchi*, *Lestrimelitta maracaia* e *Schwarziana quadripunctata*. Através das análises dos 21 locos esses autores observaram 15 locos polimórficos para *T. angustula*. Porém, as análises realizadas com dois locos para abelhas *T. angustula* e *T. weyrauchi* não foi possível à amplificação da *T. weyrauchi*; para o loco Tang78 é importante destacar que o a reação de amplificação e o gel de visualização são diferentes entre os dois estudos.

O número de alelos por locos encontrado por Brito et al. (2009) são muito maiores quando comparados aos observados em abelhas do Estado de Rondônia. Para o loco Tang77, os autores encontraram dez alelos, e para o loco Tang78 foram registrados 16 alelos. O número de indivíduos nas análises é diferente, assim como as distâncias de coleta entre os ninhos. Porém, Kulza (2015) registrou um número menor de alelos (02) para o loco Tang77 avaliando a diversidade de abelhas *T. angustula* e *T. fiebrigi* em municípios do Estado do Paraná.

A heterozigosidade observada em estudos com abelhas sem ferrão apresentam valores menores do que o esperado como exemplo a avaliação de Oliveira et al. (2009) com *Nannotrigona testaceicornis* e Brito et al. (2009), avaliando a heterozigosidade de *T. angustula*, encontraram valor menor de heterozigosidade observada quando comparada com a heterozigosidade esperada. Brito et al. (2009) também observaram desequilíbrio de ligação em alguns locos avaliados.

As amostras avaliadas de *T. angustula* e *T. weyrauchi* da Amazônia também apresentaram heterozigosidade observada menor do que a esperada. A deficiência de heterozigotos pode ser explicada pela degradação da mata original, o que pode dificultar a migração de machos, além da utilização de *primers* heterólogos, que podem ter

ocasionado a ocorrência de alelos nulos, subestimando a variabilidade genética, como descrito por Brito et al. (2009) para *Partamona sp.*

A redução da variabilidade genética ocorre principalmente pela diminuição do tamanho populacional efetivo e da diversidade genômica, associados a eventos fundadores (WRIGHT et al., 2005; ZEDER et al., 2006). Foi verificado em *Scaptotrigona mexicana* que os machos evitam as agregações mais próximas de suas colônias. Como consequência desse comportamento há a diminuição de chances de endocruzamento (MUELLER et al., 2012). Assim, como observamos nas amostras avaliadas, ocorre fluxo gênico.

Porém, alguns trabalhos apresentam dados que diferem dos encontrados quando comparamos a heterozigosidade em espécies de melipona; alguns autores encontraram valores de heterozigosidade observada maior do que a heterozigosidade esperado. Koser et al. (2014) avaliaram a diversidade de abelhas *M. mondury* e *M. quadrifasciata* no Estado de Santa Catarina por microssatélites com *primers* heterólogos; estes autores obtiveram heterozigosidade observada maior que a esperada. Em *T. Angustula*, Brito et al. (2009) constataram heterozigosidade observada maior que a esperada para o loco *Tang77*.

O excesso de homozigoto também foi relatado por Carvalho-Zilse et al. (2009) com *M. scutellaris* no nordeste brasileiro. Esses autores afirmaram que o excesso de homozigotos poderia ser decorrente de migração não natural pela troca de abelhas entre meliponicultores. O que difere dos resultados encontrados em *T. weyrauchi*, que apresentou excesso de homozigotos, porém todos os indivíduos analisados foram coletados de ninhos naturais e por ser uma espécie aérea e de distribuição mais restrita quando comparada com a *T. angustula* não ocorre troca de abelhas dessa espécie entre produtores.

Através das análises de identidade genética e distância, observamos que as populações estão moderadamente diferenciadas e as variações são pequenas quando comparamos as duas populações. Isso justifica os resultados encontrados para análise bayesiana, em que não foi possível separar as populações em dois grupos. Porém, outros autores, avaliando as variações genéticas em *T. angustula* e *T. fiebrigi*, também não conseguiram separar as espécies e os valores de K encontrados são diferentes dos números de populações analisadas como o estudo de Kulza (2015). O maior valor de delta K obtido por inferência bayesiana estimou o número real de populações em 3 (K=3). A análise das redes de interações realizada não permitiu separar *T. angustula* em

duas espécies. Santos et al. (2015), utilizando marcador PCR-RFLP em populações de *T. angustula* e *T. fiebrigi* dos Estados do Paraná, São Paulo e Rondônia por análises bayesiana, encontraram valor de  $K=6$  e não foi possível diferenciá-las.

Mas, os resultados das análises bayesiana realizadas por May-Itza et al. (2010) diferem dos estudos citados; os autores verificaram em *M. yucatanica*, coletadas no México e Guatemala, a formação de dois grupos, separando as populações por localidades, o que definem uma clara estrutura geográfica.

No entanto, há uma necessidade de mais estudos para monitorar essas populações, especialmente na região amazônica, onde o desmatamento aumenta para o desenvolvimento da agricultura, assim como as queimadas. Essas análises são importantes a fim de contribuir com os programas de manejo e conservação, especialmente para *T. weyrauchi*.

## CONCLUSÕES

As espécies avaliadas apresentaram um excesso de homozigotos. Os *primers* microssatélites heterólogos para *T. angustula* e *T. weyrauchi* podem ser utilizados para genética de populações.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo projeto (Processo 482947/2013-6).

## REFERÊNCIAS

- ARIAS, M.C.; BRITO, R.M.; FRANCISCO, F.O.; MORETTO, G.; OLIVEIRA, F.F.; SILVESTRE, D.; SHEPPARD, W.S. Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 259-274, 2006.
- BAITALA, T.V.; MANGOLIN, C.A.; TOLEDO, V.A.A.; RUVOLO- TAKASUSUKI, M.C.C. RAPD polymorphism in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera; Meliponinae, Trigonini) populations. **Sociobiology**, v. 48, n. 3, p. 861-874, 2006.
- BARTH, A.; FERNANDES, A.; POMPOLO, S.G.; COSTA, M.A. Occurrence of B chromosomes in *Tetragonisca Latreille*, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): A new contribution to the cytotaxonomy of the genus. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 1, p. 77-79, 2011.

BRITO, R.M.; FRANCISCO, F.O.; DOMINGUES-YAMADA, A.M.T.; GONÇALVES, P.H.P.; POKER, F.C.; SOARES, A.E.E.; ARIAS, M.C. Characterization of microsatellite loci of *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Conservation Genetics Resources**, v. 1, n. 1, p. 183-187, 2009.

BORGES, A.A.; CAMPOS, L.A.O.; SALOMÃO, T.M.F.; TAVARES, M.G. Genetic variability in five populations of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae) from Minas Gerais State, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 4, p. 781-784, 2010.

BROWN, J.C.; OLIVEIRA, M.L. The impact of agricultural colonization and deforestation on stingless bee (Apidae: Meliponini) composition and richness in Rondônia, Brazil. **Apidologie**, v. 45, n. 2, p. 172-188, 2014.

CAMARGO, J.M.F.; PEDRO, S.R.M. 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**, 2013. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em 23 jan. 2014.

CARVALHO-ZILSE, C.D.; KERR, W.E. Utilização de marcadores microssatélites para estudos populacionais em *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). **Magistra**, v. 18, n. 4, p. 213-220, 2006.

CARVALHO-ZILSE, G.A.; COSTA-PINTO, M.F.F.; NUNES-SILVA, C.G.; KERR, W.E. Does beekeeping reduce genetic variability in *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini)? **Genetics and molecular research**, v. 8, n. 2, p. 758-765, 2009.

COUCEIRO, L.; MANEIRO, I.; RUIZ, J. M.; BARREIRO R. Multiscale genetic structure of an endangered seaweed *Ahnfeltiopsis pusilla* (Rhodophyta): implications for its conservation. **Journal of Phycology**, v. 47, n. 2, p. 259-268, 2011.

DON, R.H.; COX, P.T.; WAINWRIGHT, B.J.; BAKER, K.; MATTICK, J.S. Towchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 14, p. 4008-4008, 1991.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

FRANCISCO, F.O.; BRITO, R.M.; ARIAS, M.C. Systematics, morphology and physiology allele number and heterozigosity for microsatellite loci in different stingless bee species (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 5, p. 638-643, 2006.

FRANCISCO, F.O.; SANTIAGO, L.R.; BRITO, R.M.; OLDROYD, B.P.; ARIAS, M.C. Hybridization and asymmetric introgression between *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi*. **Apidologie**, v. 45, n. 1, p. 1-9, 2014.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos de genética da Conservação**. Ribeirão preto: Editora da Sociedade Brasileira de genética, 2008.

HURTADO-BURILLO M.; MARTINEZ, J.; MAY-ITZÁ, W. de J.; QUEZADA-EUÁN, J.J.G.; DE La RÚA, P. Estudio de microsátélites en las abejas sin aguijón *Melipona colimana* y *M. beecheii* de mesoamérica. **Revista Archivos de Zootecnia**, v. 63, n. 241, p. 145-151, 2014.

KULZA, R.A. **Análise da estrutura populacional de *Tetragonisca (Hymenoptera, Meliponini)* por marcadores microssatélites e rede de interações.** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2015. 41p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

KERR, W.E.; CARVALHO, G.A.; SILVA, A.C.; ASSIS, M.G.P. Aspectos poucos mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias Estratégicas**, v. 12, n. 2, p. 20-41, 2001.

KOSER, J.R.; FRANCISCO, F.O.; MORETTO, G. Genetic variability of stingless bees *Melipona mondury* Smith and *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae) from a meliponary. **Sociobiology**, v. 61, n. 3, p. 313-317, 2014.

MAY-ITZA, W.J.; QUEZADA-EUÁN, J.J.G.; MEDINA, L.A.M.; ENRÍQUEZ, E.; DE LA RÚA, P. Morphometric and genetic differentiation in isolated populations of the endangered Mesoamerican stingless bee *Melipona yucatanica* (Hymenoptera: Apoidea) suggest the existence of a two species complex. **Conservation Genetics**, v.11, n.5, p. 2079-2084, 2010.

MOURE, J.S.; URBAN, D.; MELO, G.A.R. **Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region.** Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia, 2007.

MOUTOU, K.A.; MAMURIS, Z.; FIRME, T.; KONTOU, M.; SARAFIDOU, T.; STOUMBOUDI, M. Th. Patterns of variability at the major histocompatibility class I and class II loci in populations of the endangered cyprinid *Ladigesocypris ghigii*. **Conservation Genetics**, v. 12, n. 5, p. 1159-1171, 2011.

MUELLER, M.Y.; MORITZ, R.; KRAUS, F.B. Outbreeding and lack of temporal genetic structure in a drone congregation of the neotropical stingless bee *Scaptotrigona Mexicana*. **Ecology and evolution**, v. 2, n. 6, p. 1304-1311, 2012.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsateLLites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA, E.J.F.; FREITAS, G.S.; FONSECA, A.S.; SOUSA, A.C.B.; CAMPOS, T.; ASSIS, A.F.; SOUZA, A.P.; CONTEL, E.P.B.; SOARES, A.E.E. Isolation and characterization of microsateLLite markers from the stingless bee *Nannotrigona testaceicornis*. **Conservation Genetics Resources**, v. 1, n. 1, p. 97-99, 2009.

- PAXTON, R.J. ; WEIBSCHUH, N.; QUEZADA-EUAN, J.J.G.. Characterization of dinucleotide microsatellite loci for stingless bees. **Molecular Ecology**, v. 8, n. 4, p. 690-692, 1999.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 1, p. 288-295, 2006.
- PETERS, J.M.; QUELLER, D.C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; STRASSMANN, J.E. Microsatellite loci for stingless bees. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 1, p. 784-787, 1998.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.
- QUEZADA-EUÁN, J.J.G.; PAXTON, R.J.; PALMER, K.A.; MAY-ITZÁ, W.J.; TAY, W.T.; OLDROYD, B.P. Morphological and molecular characters reveal differentiation in a Neotropical social bee, *Melipona beecheii* (Apidae, Meliponini). **Apidologie**, v. 38, n. 3, p. 247-258, 2007.
- ROUSSET, F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 1, p. 103-106, 2008.
- SANTOS, S.A.; BRONZATO, A.R.; MOREIRA, B.M.T.; ARAUJO, K.F.; RONQUI, L.; MANGOLIN, C.A.; TOLEDO, V.A.A.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C. Matrilineage differentiation of the genus *Tetragonisca* through mitochondrial DNA markers using PCR-RFLP technique. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 12828-12840, 2015.
- STUCHI, A.L.P.B.; TOLEDO, V.A.A.; LOPES, D.A.; CANTAGALLI, L.B.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C. Molecular marker to identify two stingless bee species: *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera, Meliponinae). **Sociobiology**, v. 59, n. 1, p. 123-134, 2012.
- WRIGHT, S.I.; BI, I.V.; SCHOEDER, S.G.; YAMASAKI, M.; DOEBLEY, J.F.; MCMULLEN, M.D.; GAUT, B.S. The effects of artificial selection on the maize genome. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1310-1314, 2005.
- WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations: The theory of gene frequencies**. v. 2. Chicago: University of Chicago, 1969.
- YEH, F.C.; YANG, R.C.; BOYLE, T. **Popgene version 1.32. Microsoft Windows – Based Freeware for Population Genetic Analysis**. Edmonton: University of Alberta, 1999.
- 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**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 287-301.

ZEDER, M.A.; EMSHWILLER, E.; SMITH, B.D.; BRADLEY, D.G. Documenting domestication: the intersection of genetics and archaeology. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 3, p. 139-155, 2006.

#### IV – Polimorfismo mitocondrial em *Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca weyrauchi* (Hymenoptera, Apidae) empregando marcadores PCR-RFLP

##### RESUMO

Este estudo teve como objetivo determinar os haplótipos mitocondriais e avaliar a diversidade genética de *T. angustula* e *T. weyrauchi* por meio dos marcadores de PCR-RFLP. Foram coletadas abelhas operárias de colônias localizados em Cacoal, Ji-Paraná, Jaru, Ariquemes, Cacaupônia, Monte Negro, Alto Paraíso e Porto Velho no Estado de Rondônia. Após o isolamento do DNA foram realizados testes com dez pares de *primers* heterólogos que amplificam diferentes regiões do DNA mitocondrial, porém quatro (*primer 1* - ND2 e COI; *primer 2* - COI; *primer 8* - 16S e 12S e *primer 9* - COII) foram utilizados no estudo. Para a análise de restrição das regiões amplificadas foram testadas 13 enzimas: *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *HinfI*, *RsaI*, *PstI*, *XbaI*, *HaeIII*, *ClaI*, *XhoI*, *BglII*, *PvuII* e *ScaI*. O *primer 1* – (ND2, COI) permitiu identificar um fragmento, um com aproximadamente 2.400 pb em *T. angustula* e em *T. weyrauchi*. Com a análise das endonucleases de restrição foi verificada a clivagem do fragmento com a enzima *EcoRI* e *EcoRV*. Para região (COI) *primer 2*, as duas espécies amplificaram um fragmento corresponde a aproximadamente 1850 pb. A clivagem foi verificada com a enzima *EcoRV* somente em indivíduos de *T. angustula*. Porém, a clivagem com a enzima *HinfI* foi observada nas duas espécies. A amplificação da região (16S, 12S) *Primer 8* geraram dois fragmentos (1850 pb e 350 pb), e foi observada a clivagem nas duas espécies com as enzimas *EcoRV*, *RsaI*, *PstI*. Enquanto que a enzima *XbaI* só clivou em *T. weyrauchi*. A amplificação da região (COII) *primer 9* apresentou um fragmento com 1000 pb. A clivagem ocorreu com a enzima *ClaI* e *HinfI* para *T. angustula*. O valor de identidade genética observado entre as populações foi de (0,3636) e distância genética igual a 1,0116. Já a análise por inferência bayesiana estimou o número real de populações,  $K = 5$ . Essas populações estão altamente diferenciadas e permite observar que as populações tiveram padrão distintos de marcadores de mtDNA. A variação detectada com as análises de mtDNA por PCR-RFLP das duas espécies de jataí mostrou que há diferenças no mtDNA entre as duas espécies.

**Palavras-chave:** Abelha sem ferrão, Amazônia, *primers* heterólogos, PCR-RFLP, análise bayesiana.

##### ABSTRACT

The aim of this study was to determine the mitochondrial haplotypes and to evaluate the genetic diversity of *T. angustula* and *T. weyrauchi* by means of PCR-RFLP markers. Some worker bees were collected from nests in Cacoal, Ji-Paraná, Jaru, Ariquemes, Cacaupônia, Monte Negro, Alto Paraíso and Porto Velho in Rondônia State. After isolating DNA, tests were performed with ten pairs of heterologous primers which amplify different regions of mitochondrial DNA, however four of them (*primer 1* - ND2 and COI; *primer 2* - COI; *primer 8* - 16S e 12S and *primer 9* - COII) were used in this study. For restriction analysis of the amplified regions 13 enzymes were tested: *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *HinfI*, *RsaI*, *PstI*, *XbaI*, *HaeIII*, *ClaI*, *XhoI*, *BglII*, *PvuII* and *ScaI*. *Primer 1* - (ND2, IOC) allowed to identify a fragment with about 2400 bp in *T. angustula* and in *T. weyrauchi*. With the analysis of restriction endonuclease, fragment cleavage was verified with *EcoRI* and *EcoRV* enzyme. For region (IOC) *primer 2* the two species amplified a fragment corresponding to about 1850 bp. Cleavage was verified with the *EcoRV* enzyme only in *T. angustula* individuals. However cleavage

with the enzyme *Hinf*I was observed in both species. Amplification of the region (16S, 12S) Primer 8 generated two fragments (1850 bp and 350 bp), and cleavage was observed in both species with the enzymes *Eco*RV, *Rsa*I, *Pst*I. While *Xba*I enzyme cleaved in *T. weyrauchi* only. Amplification of the region (COII) primer 9 showed a fragment of 1000 bp. The cleavage occurred with *Cla*I and *Hinf*I enzyme to *T. angustula*. The genetic identity value observed among populations was (0.3636) and genetic distance equal to 1.0116. The analysis by Bayesian inference, however, estimated the real number of populations,  $K = 5$ . These populations are well separated and they allow us to observe that the populations had different pattern of mtDNA markers. The variation detected with the analysis of mtDNA by PCR -RFLP of the two species of jataí showed there are differences in mtDNA between the two species.

**Keywords:** Stingless bees, Amazonia, heterologous primers, PCR-RFLP, Bayesian analysis.

## INTRODUÇÃO

As abelhas são insetos pertencentes à ordem Hymenoptera, da superfamília Apoidea (CAMARGO; PEDRO, 2013). São conhecidas no mundo pelos vários benefícios que proporcionam, como a capacidade de algumas espécies de produzir mel e pelo seu papel natural de polinização (SANTOS, 2010).

As abelhas sem ferrão estão entre as polinizadoras mais comuns nos ambientes tropicais e em determinadas regiões são dominantes, visitando várias culturas (MACÍAS-MACÍAS et al., 2009). Compreende um grupo diverso de insetos que inclui mais de 400 espécies que mostram alta variabilidade na fisiologia, morfologia e tamanho (MOURE et al., 2007).

Porém, o constante desmatamento, somado ao extrativismo pelos meleiros, vem aumentando a pressão sobre este importante recurso natural, sendo necessário utilizar estratégias avançadas que auxiliem na sua conservação (SANTOS, 2010). As abelhas do gênero *Melipona* são especialmente sensíveis aos distúrbios causados ao meio ambiente, já que dependem das árvores para moradia e alimentação (BRUENING, 2006; VOSSLER, 2012).

Os marcadores moleculares vêm sendo empregados como importante ferramenta na conservação de espécies selvagens e/ou de interesse econômico por fornecerem dados importantes aos estudos populacionais, como: estimativas referentes ao grau de variabilidade genética, grau de endogamia, diferenças entre populações, fluxo gênico entre populações, determinação do tamanho efetivo da população, dentre outros (MÜLLER et al., 2010; TAVARES et al., 2013).

A análise do DNA mitocondrial (mtDNA) polimorfismos é uma abordagem útil para a investigação de variabilidade genética e tem sido aplicado com sucesso aos estudos de populações de insetos, incluindo espécies de meliponini (FRANCISCO; ARIAS, 2010). Estudos indicam baixa diversidade genética em populações selvagens de abelhas sem ferrão brasileira (COSTA et al., 2005; ARIAS et al., 2006; TAVARES et al., 2007; BORGES et al., 2010; BRITO; ARIAS, 2010; FRANCISCO; ARIAS, 2010). Esta baixa diversidade genética pode ter consequências negativas para a taxa de sobrevivência em longo prazo da população e levanta questões importantes relacionadas aos programas de conservação. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética em abelhas do gênero *Tetragonisca* do Estado de Rondônia utilizando marcador PCR-RFLP, bem como determinar os haplótipos mitocondriais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta das abelhas

Para caracterização das abelhas operárias adultas de *T. angustula* (Latreire, 1811) e *T. weyrauchi* (Schwarz, 1943) foram coletadas 32 colônias, destas, 22 colônias de *T. angustula* foram provenientes das seguintes localidades do Estado de Rondônia: Porto Velho, Cacoal, Ji-Paraná, Jaru, Cacaúlândia, Alto Paraíso, Ariquemes e Monte Negro (Figura 1). Enquanto que as dez colônias de *T. weyrauchi* foram coletadas na região do município de Alto Paraíso. As coletas foram realizadas de acordo com a autorização número: 29423-2 do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – Sisbio.

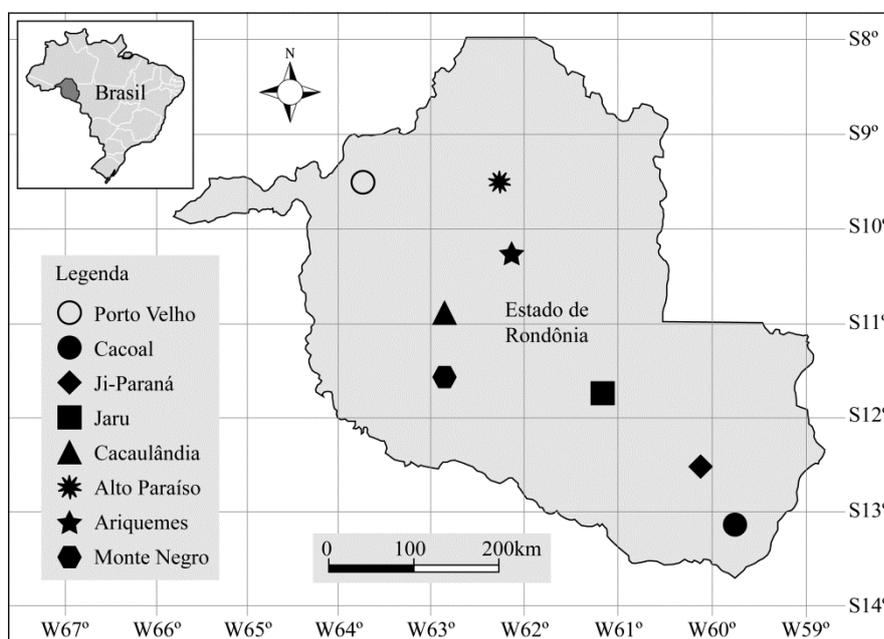


Figura 1 – Identificação dos locais de coleta de *T. angustula* e *T. weyrauchi* no Estado de Rondônia.

### Extração de DNA genômico

O método usado para extração do DNA total foi com base no método modificado de Yu et al. (1993). O tórax foi homogeneizado individualmente em tubos de 1,5 mL, contendo 300 µL do tampão de extração [200 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,5% SDS, 250 mM NaCl, 50 mM EDTA e 100 mg/mL Proteinase K]. Após 01 h de incubação a 65°C, o material foi centrifugado durante 10 min. (10.000 xg) e o sobrenadante transferido para um novo tubo, adicionando-se igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguido por centrifugação a 10.000 xg por 10 min. e transferência do sobrenadante para um novo tubo, sendo que este procedimento foi realizado duas vezes. Após homogeneização e centrifugação para separação das fases, a fase superior foi transferida para um novo tubo. O

DNA precipitado por meio da adição de 250  $\mu$ L de isopropanol gelado e incubado a  $-20^{\circ}\text{C}$  *overnight*. O DNA precipitado foi separado por centrifugação a 10.000 xg por 10 min. Após descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado com 1,0 mL de etanol 70% gelado e deixado secar na temperatura ambiente. Depois de seco, o DNA foi ressuspensionado por 02 h em 30  $\mu$ L de tampão TE (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA), tratado com RNase (10  $\mu$ g/mL) e mantido por mais 02 h em temperatura ambiente e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A quantificação do DNA foi avaliada por meio das análises em Picodrope mikroliteres UV spektrofotômetro - Zenon Bio com faixa de comprimento de onda de 230-850 nm.

### PCR-RFLP

Para amplificação e análise do mtDNA foram utilizados dez *primers* heterólogos descritos por Hall e Smith (1991), e Simon et al. (1994), sendo estes *primers* de *Apis mellifera* de acordo com Francisco et al. (2001), *primers* de *Melipona* (Tabela 1).

Tabela 1 – Pares de *primers* utilizados para amplificação de regiões do mtDNA de *Tetragonisca* e temperatura de anelamento (N – número de *primers*, R – Referências, T – Temperatura em  $^{\circ}\text{C}$ )

N	Nome	Sequência (5'→3')	R	Gene	T
1	mtD2 mtD9	GCTAAATAAGCTAACAGGTTTCAT CCCGGTAAAATTAATAATAAACTTC	1	ND2, COI	45
2	mtD7 COI-IIR	GGATCACCTGATATAGCATTCCC GATCAATATCATTGATGACC	1,2	COI	46
3	mtD19 mtD22	GAAATTTGTGGAGCAAATCATAG TCAACAAAGTGTCAGTATCA	1	ATPases (8,6), COIII	47
4	5612R tPheF	GAAATTAATATAACATGACCACC GCGTAATATTGAAAATATTAATGA	3	COIII, ND3	47
5	mtD24 mtD28	GGAGCTTCAACATGAGCTTT ATT.ACACCTCCTAATTTATTAGGAAT	1	ND4, ND6, CytB	44
6	mtD26 mtD30	TATGTACTACCATGAGGACAAATATC GTAGCATTTTTAACTTTATTAGAACG	1	CytB, ND1	45
7	Mel 3 16SF	TAAAGTTAAAAAAGCAACTC CACCTGTTTATCAAAAACATGTCC	3,2	16S	44
8	16SR mtD36	CGTCGATTTGAACTCAAATCATG AAACTAGGATTAGATACCCTATTAT	2,1	16S, 12S	45
9	MtD18 COI-IIIF	CCACAAATTTCTGAACATTGACCA TCTATACCACGACGTTATTC	1,2	COII	47
10	Seq 18 8467F	GAACTATCAATTTGATATTG GGAATTTTTTTTTGAATGAAA	3	ND4, ND5	46

<sup>1</sup>Simon et al.(1994); <sup>2</sup>Hall e Smith(1991); <sup>3</sup>Francisco et al. (2001).

As condições de amplificação foram baseadas na metodologia descrita por Barni et al., (2007) com modificações nas temperaturas de anelamento dos *primers*. Para um volume de reação de 20  $\mu$ L foi utilizado tampão Tris-HCl 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 2,5 mM de  $MgCl_2$ , 0,25  $\mu$ M de cada *primer*, 2,5 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), duas unidades de Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen) e 10 ng de DNA molde. As reações foram realizadas em um termociclador “Biosystems, Veriti 384”, programado com uma desnaturação inicial a 94°C por 05 min. e uma extensão final a 64°C por 10 min. Foram realizados 35 ciclos, sendo que cada ciclo de 1 min. em 94°C, temperatura de anelamento específica para cada *primer* por 1 min. e 20 seg. e 64°C por 2 min.

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1% a 60 volts usando tampão TBE 0,5X (Tris-borato, EDTA pH 8,0) e corados em brometo de etídio (0,5  $\mu$ g/mL). Os fragmentos da amplificação foram visualizados sob luz ultravioleta e a imagem capturada por sistema de fotodocumentação L-Pix HE. Um marcador de peso molecular de DNA (100 pb, DNA Ladder-Invitrogen) foi usado para determinar o tamanho dos fragmentos gerados.

Para a análise de restrição, os fragmentos amplificados de mtDNA foram submetidos à digestão por 12 h com as seguintes enzimas: *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *HinfI*, *RsaI*, *PstI*, *XbaI*, *HaeIII*, *ClaI*, *XhoI*, *BglIII*, *PvuII* e *ScaI* (Invitrogen). Para cada reação de clivagem foi utilizado 3  $\mu$ l do produto do PCR, três unidades de enzima de restrição, tampão da enzima 1 X e água milli-Q 14,7  $\mu$ l, totalizando 20  $\mu$ l. Os resultados da digestão foram analisados em gel de agarose a 1% a 60 volts usando tampão TBE 0,5X (Tris-borato, EDTA pH 8,0) e corados com banho de brometo de etídio (0,5  $\mu$ g/mL). Os fragmentos da clivagem foram visualizados sob luz ultravioleta e a imagem capturada por sistema de fotodocumentação L-Pix HE. Um marcador de peso molecular de DNA (100 pb, DNA Ladder-Invitrogen) foi usado para determinar o tamanho dos fragmentos gerados.

### **Análise dos dados**

As análises dos dados moleculares envolveram a interpretação dos fragmentos de DNA mitocondrial. A identidade e a distância genética de Nei (1978) foram calculadas empregando o programa Popgene 1.32 (YEH et al., 1999). O programa GeneaLex 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2006) foi utilizado para a Análise de Variância Molecular (Amova) utilizando a estatística  $\Phi_{PT}$  ( $\Phi_{PT}$ ).

A estimativa do número real de populações foi realizada de acordo com Evanno et al. (2005), com a estatística de delta  $K = \ln(P(X/K))$  entre sucessivos valores de K (número de populações) e X = probabilidade de observar os dados. Foram estimados os valores de K

variando de 2 a 8 e o valor de K utilizado foi aquele que apresentou maior valor de delta K. Esta estimativa foi realizada utilizando o software structure 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) e estrutura Harvester ([http://taylor0.biology.ucla.edu/struct\\_harvest/](http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/)). O *burn-in* foi fixado em 3 mil repetições e o método de Monte Carlo via cadeias de Markov (MCMC) em 30 mil. O número de interações estabelecido foi de 10.

## RESULTADOS

### Análise de regiões do DNA mitocondrial com a técnica de PCR-RFLP

Dos *primers* testados para amplificação apenas quatro apresentaram padrões reproduzíveis de fragmentos (*primers* 1, 2, 8 e 9), e foram utilizados nas análises. Os demais pares de *primers* amplificaram, porém não apresentaram padrão de fragmentos reproduzíveis.

#### **Primer 1** – (ND2, COI)

A amplificação dos mtDNAs com o *primer* 1 permitiu identificar um fragmento com aproximadamente 2.400 pb em *T. angustula* e em *T. weyrauchi*. Com a análise utilizando as endonucleases de restrição, verificou-se que houve clivagem do fragmento de 2.400 pb com a enzima *EcoRI* somente em *T. weyrauchi*, possibilitando a identificação de dois haplótipos. O haplótipo dos indivíduos em que não houve clivagem (*T. angustula*) e o segundo haplótipo apresentou padrão de fragmentos de aproximadamente 1.800 pb e 400 pb (*T. weyrauchi*).

O fragmento de aproximadamente 2.400 pb também clivou com a enzima *EcoRV* em *T. weyrauchi* gerou dois fragmentos com 1.700 pb e 700 pb. Já a clivagem com a enzima *RsaI*, na mesma região, foi verificado padrão de dois fragmentos de 2.000 pb e 400 pb em *T. weyrauchi*.

#### **Primer 2** – (COI)

O seguimento referente ao *primer* 2 amplificou para as duas espécies (*T. angustula* e *T. weyrauchi*). O fragmento corresponde a aproximadamente 1.850 pb. A clivagem com a enzima *EcoRV* ocorreu somente em indivíduos da espécie de *T. angustula* e gerou dois fragmentos de 1.000 pb e 850 pb. Não ocorreu a clivagem com indivíduos da espécie *T. weyrauchi*. Porém, a clivagem com a enzima *HinfI* gerou nas duas espécies três fragmentos de aproximadamente 900 pb, 400 pb e 300.

#### **Primer 8** – (16S, 12S)

O segmento de mtDNA amplificado referente ao *primer* 8 gerou dois fragmentos, um de aproximadamente 1.850 pb e outro de 350 pb, que foram observados em todos os indivíduos analisados das duas espécies. Foi observada a clivagem nas duas espécies com as enzimas *EcoRV*, *RsaI*, *PstI*. O resultado da clivagem, utilizando a enzima *EcoRV*, foi observado dois

fragmentos com 950 pb e 900 pb. A clivagem ocorreu com as enzimas *RsaI* tanto para *T. angustula* quanto em *T. weyrauchi* e gerou fragmentos de aproximadamente 700 pb, 600 pb e 500 pb. A clivagem com a enzima *PstI* para as duas espécies gerou fragmentos de aproximadamente 1.300 pb e 550 pb. A clivagem com a enzima *XbaI* só foi observada em *T. weyrauchi* e gerou um fragmento de 1.400 pb e outro de 450 pb.

#### **Primer 9 – (COII)**

Evidencia-se um padrão de amplificação dos DNAs com o *primer 9* entre as espécies de *Tetragonisca* com um fragmento de 1.000 pb. A clivagem com a enzima *ClaI* resultou em dois fragmentos, um de aproximadamente 800 pb e outro de 200 pb. A restrição com enzima *HinfI* também gerou dois fragmentos, sendo um de aproximadamente 600 pb e outro com 400 pb. Não ocorreu a clivagem em amostras de *T. weyrauchi*.

#### **Genética de populações**

Dos quatro *primers* utilizados para amplificação, obteve-se sucesso na clivagem com sete enzimas de restrição, o que permitiu detectar 11 locos PCR-RFLP. A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que a variação é grande entre as populações e não dentro das populações.

A análise de ordenação por componente principal (PCoA), mostrou que uma única coordenada (eixo 1) é responsável por 76,01% (Figura 2) da variância entre os grupos formados. O eixo 2 foi representado por 16,76% e o eixo 3 por 3,64%.

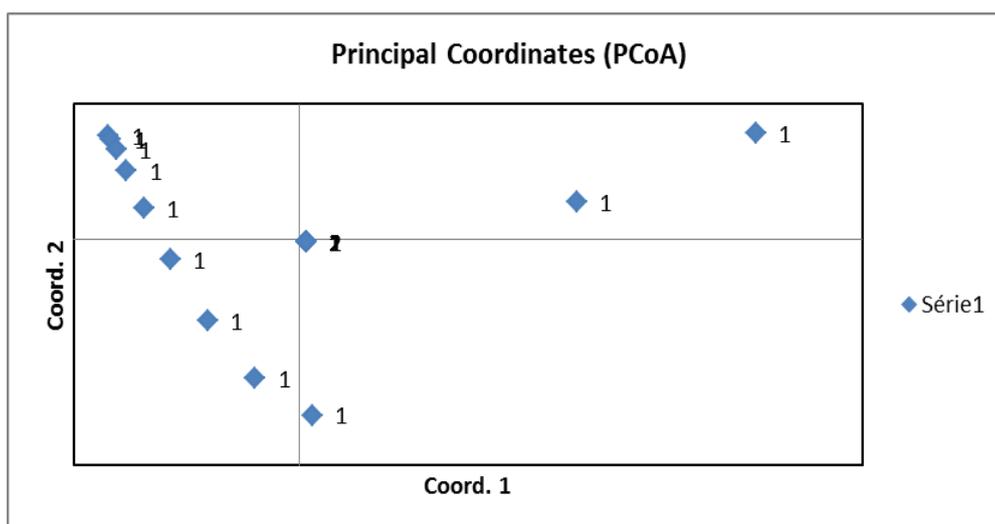


Figura 2 – Análise em componentes principais (PCoA) evidenciando a ordenação dos grupos estabelecidos pelas amostras de populações de *Tetragonisca* do Estado de Rondônia.

O valor de identidade genética (NEI, 1978) observado entre as populações de *T. weyrauchi* e *T. angustula* foi de 0,3636 mostrando que são duas espécies distintas. A distância genética igual a 1,0116. A análise por inferência bayesiana, utilizando a cadeia MCMC, mostrou resultado semelhante ao obtido com a análise em que foi empregada a distância genética de Nei (1978). Nessa análise, foi estimado o número real de populações,  $K= 5$ . Na figura 3, é possível verificar que as populações 1 e 2 que correspondem as *T. angustula* e *T. weyrauchi* estão separadas, permitindo observar que as espécies tiveram padrões distintos de marcadores de mtDNA. A variação detectada com as análises de mtDNA por PCR-RFLP das duas espécies de *T. angustula* e *T. weyrauchi* mostrou que há diferenças no mtDNA entre as duas espécies.

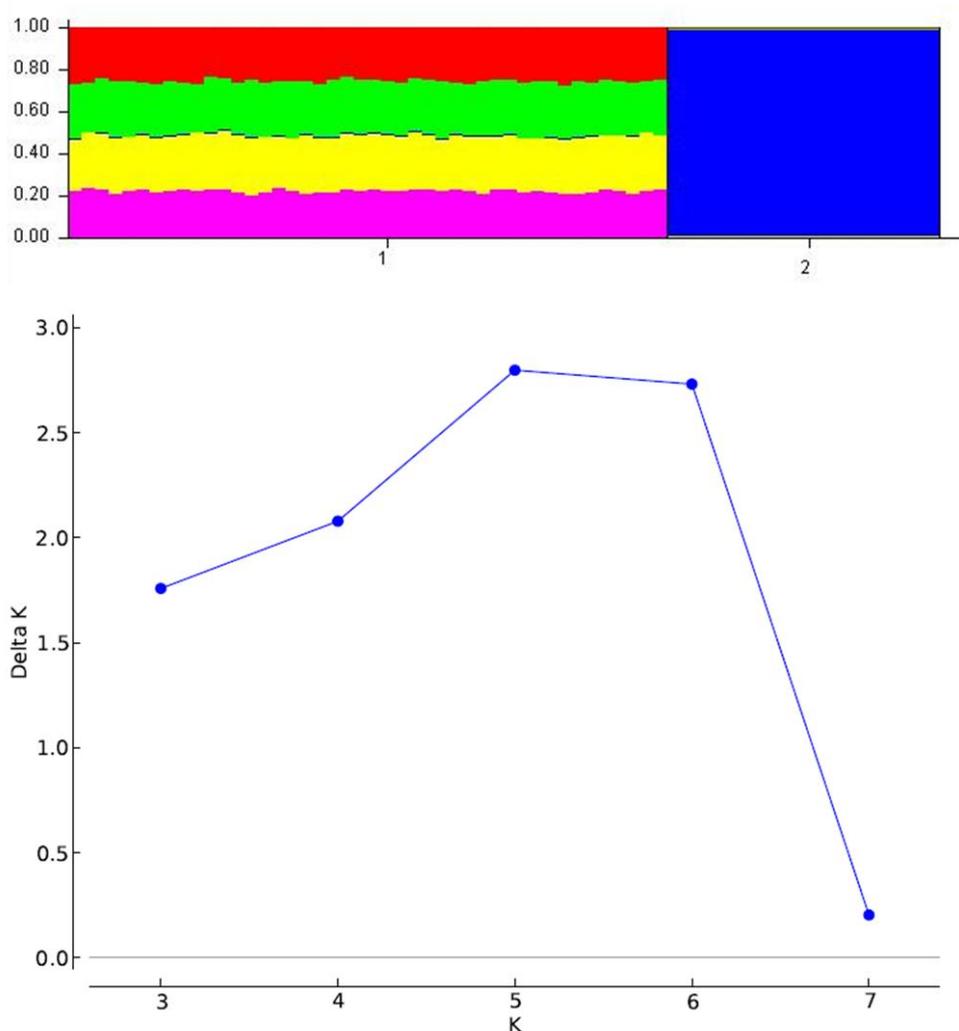


Figura 3 – **A**: Por inferência bayesiana (MCMC) número de populações estimado em  $K = 5$ . **B**: Estimativa do número de populações pelo método de Evanno et al. (2005).

## DISCUSSÃO

No estudo realizado por Santos et al. (2015) com a região ND2, COI (*primer 1*) em *T. angustula* e *T. fiebrigi*, coletados em três Estados brasileiros, os fragmentos observados foram diferentes dos verificados para *T. angustula*. Esses autores verificaram polimorfismo em amostras de *T. angustula* da cidade de Porto Velho, onde alguns indivíduos amplificaram o fragmento com 900 pb.

Segundo Santos et al. (2015), nos ninhos de *Tetragonisca*, há apenas uma rainha que origina todas as operárias presentes no ninho. Portanto, não poderia ocorrer variação no mtDNA das operárias. Os autores sugerem que provavelmente nessas rainhas pode ter ocorrido mutação na região do mtDNA de algumas mitocôndrias e o sítio de ligação do *primer 1* que amplifica o fragmento de 900 pb tenha sido alterado, impossibilitando a amplificação. As abelhas *T. angustula* presentes em Rondônia estão separadas geograficamente daquelas que ocorrem mais ao sudeste e sul (Paraná e São Paulo), provavelmente mantendo a mutação detectada.

Os resultados do estudo corroboram com os de Santos et al. (2015), pois as amostras de *Tetragonisca* amplificaram para região ND2, COI (*primer 1*) o fragmento com o mesmo tamanho, aproximadamente 2.400 pb e as clivagens ocorreram com as mesmas enzimas de restrição (*EcoRI* e *EcoRV*) em *T. angustula* do Estado de Rondônia, exceto a clivagem com a enzima *RsaI* que clivou somente para *T. weyrauchi*.

A região ND2, COI (*primer 1*) também foi avaliada por Barni et al. (2007), em *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury*, em que os autores verificaram a amplificação de um fragmento de 2.200 pb, que clivou com *EcoRI* em dois fragmentos, um de 1.500 pb e 700 pb, e *HinfI* que apresentaram fragmentos polimórficos entre as diferentes espécies, em que um fragmento de 1.600 pb e outro de 600 pb para *M. mondury* e 1850 pb e 350 pb para *M. rufiventris*. Assim, podemos afirmar que o mesmo fragmento amplificado para diferentes espécies podem apresentar fragmentos diferentes quando clivados.

A amplificação da região (COI) *primer 2*, o tamanho do fragmento (1850 pb), observado para *T. angustula* e *T. weyrauchi* é o mesmo que foi observado por Santos et al. (2015) para *T. angustula* e *T. fiebrigi*. Porém, esses autores observaram a clivagem dessa região com duas enzimas de restrição (*EcoRV* e *HinfI*). Diferente do que foi observado em *T. weyrauchi* que a clivagem só ocorreu com a enzima *HinfI*. Essa mesma região em *M. mondury* e *M. rufiventris*, amplificado por Barni et al. (2007), apresentou 1.900 pb para as duas espécies e houve clivagem somente com a enzima *HinfI*.

A sequência (16S, 12S) *primer 8*, assim como no estudo realizado por Santos et al. (2015), também gerou dois fragmentos, um de aproximadamente 1.850 pb e outro de 350 pb, porém, a clivagem dos fragmentos foram diferentes. Santos et al. (2015) observaram a clivagem dos fragmentos de 1.850 pb como as enzimas *EcoRV*, *PstI*, *RsaI* e *XbaI*. Enquanto que nas amostras avaliadas de *T. angustula* e *T. weyrauchi*, a clivagem com a enzima *XbaI*, só foi observada em *T. weyrauchi*, que gerou um fragmento de 1.400 pb e outro de 450 pb. Já Barni et al. (2007) também detectaram um fragmento de 1.850 pb para o mesmo segmento amplificado em *M. mondury* e *M. rufiventris*, porém não houve clivagem com as enzimas *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII* e *HinfI*.

Segundo Santos et al. (2015), a sequência (COI) *primer 9* apresentou dois padrões de amplificação. O primeiro padrão, que correspondeu as amostras de *T. angustula*, apresentou um fragmento com 1.000 pb e o segundo padrão apresentou fragmentos de 1.000 e 1.100 pb. O primeiro padrão quando clivado com a enzima *ClaI* resultou em dois fragmentos, um de aproximadamente 800 pb e outro de 200 pb. A restrição com *HinfI* também gerou dois fragmentos, sendo um de aproximadamente 600 pb e outro com 400 pb. Diferente do que foi observado para *T. angustula* e *T. weyrauchi* do Estado de Rondônia que apresentaram somente o padrão 1 e a clivagem desse padrão diferiu nas amostras de *T. weyrauchi*, em que não foi observado a clivagem com as enzimas de restrição.

Os locos amplificados para *T. angustula* e *T. weyrauchi* foram comuns aos amplificados no estudo realizado por Santos et al. (2015), porém o sucesso na clivagem foi menor (07 enzimas) enquanto os autores registraram oito enzimas. A análise de variância molecular (Amova) descrita pelos autores mostrou que 83% da variação ocorrem entre as populações e 17% dentro das populações, característica semelhante ao observado em abelhas *Tetragonisca* do Estado de Rondônia.

A análise por inferência bayesiana, utilizando a cadeia MCMC no estudo realizado por Santos et al. (2015), estimou o número real de populações em  $K=6$ , número maior do que foi observado nas populações de *T. angustula* e *T. weyrauchi* que foi de  $K=5$ . Porém, com essa análise, os autores afirmaram que não foi possível diferenciar as populações de *T. angustula* e *T. fiebrigi*. Diferente do resultado desses autores as populações avaliadas do Estado de Rondônia foi possível diferenciá-las.

## CONCLUSÕES

A variação detectada com as análises de mtDNA por PCR-RFLP das duas espécies de jataí mostrou que há diferenças no mtDNA entre as duas espécies. Essas populações estão bem diferenciadas e permite observar que apresentaram padrões distintos de marcadores de mtDNA.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo projeto (Processo 482947/2013-6).

## REFERÊNCIAS

ARIAS, M.C.; BRITO, R.M.; FRANCISCO, F.O.; MORETTO, G.; OLIVEIRA, F.F.; SILVESTRE, D.; SHEPPAR W.S. Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 259-274, 2006.

BARNI, G.S.; STRAPAZZON, R.; GUERRA, J.C.V.Jr.; MORETTO, G. Mitochondrial genome differences between the stingless bees *Melipona rufiventris* and *Melipona mondury* (Apidae: Meliponini). **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 1, p. 8-14, 2007.

BORGES, A.A.; CAMPOS, L.A.O.; SALOMÃO, T.M.F.; TAVARES, M.G. Genetic variability in five populations of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae) from Minas Gerais State, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 4, p. 781-784, 2010.

BRITO, R.M.; ARIAS, M.C. Genetic structure of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) from Neotropical Atlantic rainforest. **Insectes Sociaux**, v. 57, n. 4, p. 413-419, 2010.

BRUENING, H. **Abelha Jandaíra**. 3<sup>a</sup> ed. Natal: SEBRAE/ RN, 2006.

CAMARGO, J.M.F.; PEDRO, S.R.M. 2013. Meliponini Lapeletier, 1836. In MOURE, J.S., URBAN, D.; MELO, G.A.R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region** - online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed Oct/07/2015

COSTA, R.G.; TAVARES, M.G.; DIAS, L.A.S.; CAMPOS, L.A.O. Isoenzyme variation in *Melipona rufiventris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina) in Minas Gerais State, Brazil. **Biochemical Genetics**, v. 43, n. 1, p. 49-58, 2005.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

FRANCISCO, F.O.; ARIAS, M.C. Inferences of evolutionary and ecological events that influenced the population structure of *Plebeia remota*, a stingless bee from Brazil. **Apidologie**, v. 41, n. 2, p. 216-224, 2010.

FRANCISCO, F.O.; SILVESTRE, D.; ARIAS, M.C. Mitochondrial DNA characterization of five species of *Plebeia* (Apidae: Meliponini): RFLP and restriction map. **Apidologie**, v. 32, n. 4, p. 323-332, 2001.

HALL, H.G.; SMITH, D.R. Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 88, n. 10, p. 4248-4252, 1991.

MACIAS-MACIAS, O.; CHUC, J.; ANCONA-XIU, P.; CAUICH, O.; QUEZADA-EUAN, J.J.G. Contribution of native bees and Africanized honey bees (Hymenoptera: Apoidea) to solanaceae crop pollination in tropical México. **Journal of Applied Entomology**, v. 133, n. 6, p. 456-465, 2009.

MOURE, J.S.; URBAN, D.; MELO, G.A.R. **Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia, 2007.

MÜLLER, G.A.; MARCONDES, C.B.; NAVARRO-SILVA, M.A. Aplicação de marcadores microssatélites para o estudo de *Culicidae* (Diptera): revisão com especial referência a *Haemagogus*. **Boletín de Malariología y Salude Ambiental**, v. 50, n. 2, p. 175-186, 2010.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 1, p. 288-295, 2006.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

SANTOS, A.B. Abelhas nativas: polinizadores em declínio. **Natureza online**, v. 8, n. 3, p. 103-106, 2010.

SANTOS, S.A.; BRONZATO, A.R.; MOREIRA, B.M.T.; ARAUJO, K.F.; RONQUI, L.; MANGOLIN, C.A.; TOLEDO, V.A.A.; RUVOLLO-TAKASUSUKI, M.C.C. Matrilineage differentiation of the genus *Tetragonisca* through mitochondrial DNA markers using PCR-RFLP technique. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 12828-12840, 2015.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECHENBACH, A.; CRESPI, B.; HONG, L.; PAUL, F. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, n. 6, p. 651-701, 1994.

TAVARES, M.G.; DIAS, L.A.S.; BORGES, A.A.; LOPES, D.M.; BUSSE, A.H.P.; COSTA, R.G.; SALOMÃO, T.M.F.; CAMPOS, L.A.O. Genetic divergence between populations of the stingless bee urucu amarela (*Melipona rufiventris* group, Hymenoptera, Meliponini): Is there a new *Melipona* species in the Brazilian state of Minas Gerais? **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 667-675, 2007.

TAVARES, M.G.; PIETRANI, N.T.; DURVALE, M.C.; RESENDE, H.C.; CAMPOS, L.A.O. Genetic divergence between *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, apidae) populations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 1, p. 111-117, 2013.

VOSSLER, G.G. Flower visits, nesting and nest defence behaviour of stingless bees (Apidae: Meliponini): suitability of bee species for meliponiculture in the Argentinean Chaco region. **Apidologie**, v. 43, n. 2, p. 139-161, 2012.

YEH, F.C.; YANG, R.C.; BOYLE, T. **Popgene version 1.32. Microsoft Windows – Based Freeware for Population Genetic Analysis**, Edmonton: University of Alberta, 1999.

YU, K.F.; DEYNZE A.V.; PAULUS, K.P. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In BR Glick (ed.), **Methods in plant molecular biology and biotechnology**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 287-301.

**V – Arquitetura de ninho, nidificação e desenvolvimento de colônias de  
*Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca weyrauchi* (Hymenoptera, Apidae) no  
Estado de Rondônia**

**RESUMO**

Este estudo teve como objetivo avaliar a arquitetura dos ninhos, local de nidificação e o desenvolvimento de colônias de *Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca weyrauchi*, utilizando diferentes espessuras e dimensões em colmeias, modelo Fernando Oliveira/INPA. As colmeias foram instaladas no município de Alto Paraíso – Rondônia. O período avaliado foi de setembro de 2013 a agosto de 2014. Em ninhos de *T. angustula* foi observado discos com 6 a 11 cm, em *T. weyrauchi* a média para o tamanho dos discos foi de 11 cm. A nidificação em *T. angustula* foi registrada em árvore e solo, enquanto que em *T. weyrauchi* foram encontrados em forquilha de árvores. O ninho com o menor peso foi 50 g para *T. angustula*, enquanto que o maior foi de 250 g para *T. weyrauchi*. A arquitetura do ninho difere entre as espécies, não só nos respiráculos, mas também na lixeira que foi registrado em *T. weyrauchi*. As análises estatísticas realizadas com procedimento GLM do SAS para *T. angustula* e *T. weyrauchi* mostram que há diferenças significativas entre as colmeias com relação às dimensões e espessura. As dimensões 12x12 e 15x15 com espessura de 5 cm apresentam resultado próximos para *T. angustula*, porém a melhor dimensão foi de 10x10 e espessura de 3,5 e 5 cm respectivamente. Colmeias, modelo Fernando Oliveira/INPA, são eficientes para produção de *T. angustula*, mas não são adequadas para *T. weyrauchi*.

**Palavras-chave:** Amazônia, Jataí, manejo, produção sustentável.

**ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate the architecture of the nests, nidification site and the development of *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca weyrauchi* colonies using different thicknesses and dimensions in hives model Fernando Oliveira / INPA. The hives were installed in the city of Alto Paraíso - Rondonia. They were evaluated from September 2013 to August 2014. It was noted discs with 6-11 cm in *T. angustula* nests, in *T. weyrauchi* the average for the size of the disks was 11 cm. The nidification in *T. angustula* was recorded in tree and on the ground, while in *T. weyrauchi* they were found in tree forks. The nest with the lowest weight was 50 g to *T. angustula*, whereas the highest was 250 g for *T. weyrauchi*. The nest architecture differs between species, not only in spiracles but also in a trash that was recorded in *T. weyrauchi*. The statistical analyzes performed with the SAS GLM procedure for *T. angustula* and *T. weyrauchi* show that there are significant differences between the hives with respect to size and thickness. The dimensions 12x12 and 15x15 cm with a thickness of 5cm show results near *T. angustula*, but the best was 10x10 dimension and thickness 3.5 and 5 cm, respectively. Hives model Fernando Oliveira / INPA are efficient for production *T. angustula*, but are not suitable for *T. weyrauchi*.

**Keywords:** Amazon, Jataí, manipulation, Sustainable Production.

## INTRODUÇÃO

As abelhas do gênero *Tetragonisca* são abelhas sem ferrão de grande importância econômica e ecológica. A espécie de *T. angustula* tem ampla distribuição pelo país enquanto a *T. weyrauchi* tem distribuição restrita à região Norte (CAMARGO; PEDRO, 2013).

Na meliponicultura, essas abelhas são promissoras, pois é a abelha que apresenta maior potencial como agente polinizador de flores não polinizadas por *Apis mellifera*, inclusive cultivares, por isso, é importante dar ênfase especial à sua criação na maior parte do Brasil e da América tropical (NOGUEIRA-NETO, 1997). No Brasil, o foco dos produtores ainda é a produção de mel, que nas abelhas sem ferrão pode chegar a 5-6 litros por ano, dependendo da espécie, dos fatores ambientais e do manejo. Além do mel, as abelhas sem ferrão possuem outros produtos com potencial, como o pólen, a cera e a própolis (VENTURIERI, 2008).

A meliponicultura é uma atividade de baixo impacto ambiental, produz um alimento de elevado nível nutricional, e de retorno financeiro garantido, além de contribuir para a conservação das abelhas e de seus habitats. A atividade pode ser voltada para venda de colônias, estudos científicos, preservação e educação ambiental e paisagismo e produção de mel dentre outros (CARVALHO-ZILSE et al., 2005).

Uma característica que tem influenciado diretamente a meliponicultura é o desmatamento. Embora a destruição de habitat ocorra em nível global, a região Norte do país esta sendo devastada pela expansão da agropecuária, exploração de madeira e as queimadas que provocam a redução na disponibilidade de alimento e até a destruição direta dos ninhos. A criação dos meliponários deve ser realizada com responsabilidade para evitar a extinção das abelhas e, em médio e longo prazo, a extinção da flora e fauna que dependem direta ou indiretamente desta importante agente polinizadora (BROWN; OLIVEIRA, 2014).

A redução desses substratos promove tanto o desaparecimento local de certas espécies, como força à adaptação de outras espécies a nidificar em substrato não usual (SOUZA, 2008). No entanto, o manejo adequado das suas colônias depende, dentre outros fatores, de um modelo de caixa racional que atenda às características biológicas de cada espécie e permitam o seu adequado desenvolvimento (SOUZA, 2008).

A riqueza de abelhas do gênero *Tetragonisca* é explicada pelo fato dessas serem generalistas com relação à nidificação, sendo encontrados ninhos em diversos lugares, como paredes de casas, tijolos e canos (SIQUEIRA et al., 2007). Essa espécie pode

sobreviver muito bem em ambientes perturbados, bem como é bem adaptada a ambientes urbanos (FIERRO et al., 2012).

Este estudo teve como objetivo avaliar a arquitetura dos ninhos, local de nidificação e o desenvolvimento das colônias de *Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca weyrauchi* no Estado de Rondônia, utilizando diferentes espessuras e dimensões em colmeias, modelo Fernando Oliveira/INPA, e assim fornecer subsídios para programas de manejo e de preservação da espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

As colônias de *T. angustula* (Latreille, 1811) e *T. weyrauchi* (Schwarz, 1943) avaliadas foram instaladas na região Amazônica, município de Alto Paraíso – Rondônia, altitude de 143 m, latitude: 9° 71' 42" sul, longitude: 63° 34' 81" oeste. Segundo a classificação de Köppen (1978), o clima predominante na cidade de Alto Paraíso-RO é do tipo Aw - clima tropical chuvoso. A média anual da temperatura é de 24°C a 26°C, com temperatura máxima entre 30°C e 35°C, e mínima entre 16°C e 24°C. A média anual da precipitação pluviométrica varia entre 1.400 a 2.600 mm/ano, com precipitação inferior a 20 mm nos meses de junho, julho e agosto um período seco bem definido durante a estação de inverno.

Todas as colônias foram retiradas em áreas rurais e antes de serem alojadas em colmeias racionais, as colônias foram avaliadas quanto à arquitetura dos ninhos, número de discos, local de nidificação e o peso da colônia, considerando somente o peso dos discos de cria, sem invólucro e potes de alimento. O modelo de colmeia utilizado foi o Fernando Oliveira/INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (OLIVEIRA; KERR, 2000), pois este modelo apresenta facilidades quanto ao processo de multiplicação artificial de colônias. O povoamento das colmeias foi realizado aleatoriamente.

Foram utilizadas caixas com dimensões de 15x15 cm e as espessuras de 2 cm e 5 cm, com cinco repetições, para as duas espécies. Para *T. angustula* também foram utilizadas as dimensões de 10x10 cm com espessura de (2; 3; 3,5; 4 e 5 cm) com cinco repetições e com dimensão 12x12 cm, com espessura de 2 cm e 5 cm, com cinco repetições. Todas foram confeccionadas com o mesmo tipo de madeira (*Cedrelinga catenaeformis*) – cedro mara. O número de tratamentos foi maior para *T. angustula* pelo fato ser uma espécie mais generalista quanto à nidificação e a maior facilidade de

captura dos ninhos. Foram avaliadas 45 colmeias de *T. angustula* e dez colmeias de *T. weyrauchi*.

O experimento foi realizado de setembro de 2013 a agosto de 2014. Mensalmente, as colmeias foram pesadas em balança eletrônica da marca Filizola®, modelo CS-15, com divisões de 05 em 05 gr. Para se obter, por diferença, o peso das colônias em relação ao seu peso inicial. Foram realizadas observações quanto à produção de mel, desenvolvimento da colônia no período avaliado e temperatura interna do ninho.

As análises estatísticas foram realizadas para espécie de *T. angustula* em nove meses de observações, utilizando seis tratamentos, que foram: dimensões de 10x10 cm com espessuras (2, 3, 3,5, 4 e 5 cm) e dimensões de 12x12 cm com espessura de 5 cm pelo fato de muitos dados perdidos. Porém, também foram avaliados dois meses de observação para *T. angustula* em oito tratamentos, os já citados e os tratamentos 15x15 cm com espessura 2 e 5 cm. Para *T. weyrauchi*, as análises foram realizadas para dois meses de observação com os tratamentos 15x15 cm com espessura 2 e 5 cm (Tabela 1).

Tabela 1 – Descrição dos tratamentos com dimensão e espessura das colmeias, modelo Fernando Oliveira/INPA

Tratamentos	Dimensão/colmeias	Espessura	Espécie	Número de colônias
1	10x10	2	<i>T. angustula</i>	5
2	10x10	3	<i>T. angustula</i>	5
3	10x10	3,5	<i>T. angustula</i>	5
4	10x10	4	<i>T. angustula</i>	5
5	10x10	5	<i>T. angustula</i>	5
6	12x12	5	<i>T. angustula</i>	5
7	15x15	2	<i>T. angustula</i> , <i>T. weyrauchi</i>	5; 5
8	15x15	5	<i>T. angustula</i> , <i>T. weyrauchi</i>	5; 5

As análises estatísticas foram realizadas, utilizando procedimento GLM - General Lineal Model do software Statistical Analysis System (SAS, 2012).

O modelo estatístico utilizado foi:  $y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_k + (\alpha\gamma)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$

em que:

$y_{ijk}$  é a medida do peso da caixa k no mês j e tratamento i;

$\mu + \alpha_i + \gamma_k + (\alpha\gamma)_{ik}$  é a média do peso para o tratamento i no mês j, contendo efeitos de tratamento, meses e interação tratamento e meses;

$\varepsilon_{ijk}$  é o erro aleatório associado com a caixa k que recebeu o tratamento i no mês j.

## RESULTADOS

### Arquitetura dos ninhos e número de discos

Em *T. angustula* foram observados ninhos com discos de 6 cm a 11 cm. Em *T. weyrauchi*, o diâmetro médio para o tamanho dos discos foi de 11 cm (Figura 1A). A média para o número de disco em *T. angustula* foi de 9,4, enquanto que para *T. weyrauchi* foi de 12,2 discos. Em ninhos de *T. weyrauchi* foi realizada uma observação não registrada na bionomia da espécie, e na parte inferior dos ninhos foi encontrada uma lixeira, onde estava depositado um grande número de abelhas mortas que pode ser visto na Figura 1B.

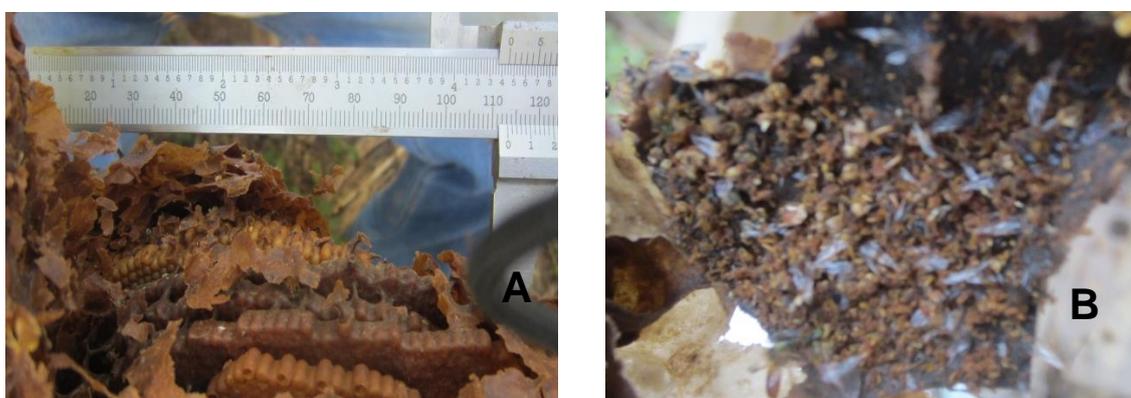


Figura 1 – (A) Discos de cria de *T. weyrauchi* com diâmetro médio dos discos de cria medidas de 11 cm (B) e ocorrência de lixeira não relatada na bionomia da espécie. (Fotos: Ludimilla Ronqui)

### Local de nidificação e peso da colônia

Das colônias de *T. angustula* capturadas somente uma não estava alojada em tronco de árvore, foi encontrada em área de pastagem, em barranco; o tubo de entrada até o ninho tinha a profundidade de 50 cm, em sentido horizontal. Este tubo de entrada era formado por cerume que é característico da espécie (Figura 2A). Do tubo de entrada até o ninho existia uma estrutura formada por cera e batume com uma coloração mais escura para garantir a passagem das abelhas até o ninho. Nos ninhos encontrados em troncos de árvores as espessuras observadas variaram de 5 cm a 12 cm vide Figura 2B.

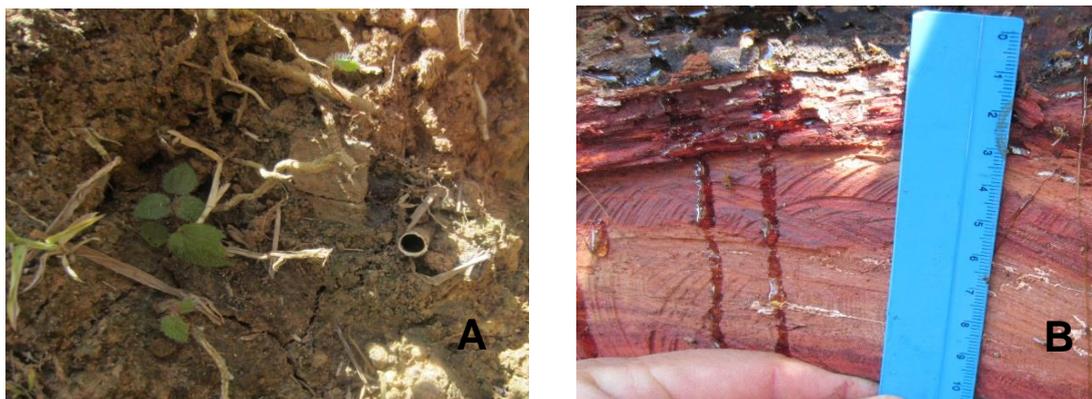


Figura 2 – (A) Nidificação em solo *T. angustula* (B) espessura do tronco de árvore em nidificação de *T. angustula*. (Fotos: Ludimilla Ronqui)

Os dez ninhos de *T. weyrauchi* foram encontrados em árvores de *Bombacaceae* (paineiras) como pode ser observado na Figura 3A e *Mangifera indica* L. (manga) na Figura 3B, 20% dos ninhos foram encontrados em altura inferior a 10 m, enquanto que 80% dos ninhos foram encontrados em alturas superiores a 20 m.



Figura 3 – (A) Nidificação de *T. weyrauchi* em árvore de *Bombacaceae* - paineira (B) em *Mangifera indica* - manga. (Fotos: Ludimilla Ronqui)

Nas observações quanto ao peso dos ninhos em *T. angustula*, foi registrado o menor peso de 50 gr com seis discos de cria, enquanto o maior peso foi de 220 gr com 13 discos de cria. A média para o peso da colônia foi de 131,3 gr e a média para o número de discos de cria foi de 9,4. Em *T. weyrauchi*, o menor peso foi 170 gr com 11 discos de cria, o maior peso foi de 250 gr e com 14 discos de cria. A média para o peso foi de 198 gr e a média para o número de discos de cria foi de 12,2.

No decorrer do experimento ocorreu uma grande perda de colônias. Em *T. angustula*, mais da metade das colônias (51%) foi perdida ao final do experimento, enquanto que em *T. weyrauchi* no terceiro mês de observação (novembro) 70% das

colônias foram perdidas. No quarto e quinto mês (dezembro/2013, janeiro/2014) registraram-se 100% de perda, período de chuvas intensas no Estado de Rondônia.

### Análises estatísticas

Nos 12 meses de experimento realizaram-se nove observações, em que três não foram realizadas por interferências climáticas, período de muita chuva. Nas análises de variância para os dados observados, no experimento com *T. angustula*, pode-se observar diferenças significativas entre os tratamentos, enquanto que os valores para meses e tratamento/meses não foi significativo e podem ser observados na (Tabela 2 e Figura 4). O tratamento 5 (dimensão 10x10 cm espessura 5 cm) foi o que apresentou o maior desempenho durante as observações.

Tabela 2 – Análise de variância para *T. angustula* em nove meses de observação

	DF	Soma de quadrado	Quadrado médio	Valor F	Pr > F
<b>Dimensão/espessura</b>	5	682,02	136,40	44,61	<,0001
<b>Erro</b>	16	48,91	3,05		
<b>Meses</b>	8	1,08	0,13	0,60	0,7784
<b>Meses*DE</b>	40	7,03	0,17	0,78	0,8207
<b>Erro (Meses)</b>	128	28,99	0,22		

\*DE - Dimensão/espessura

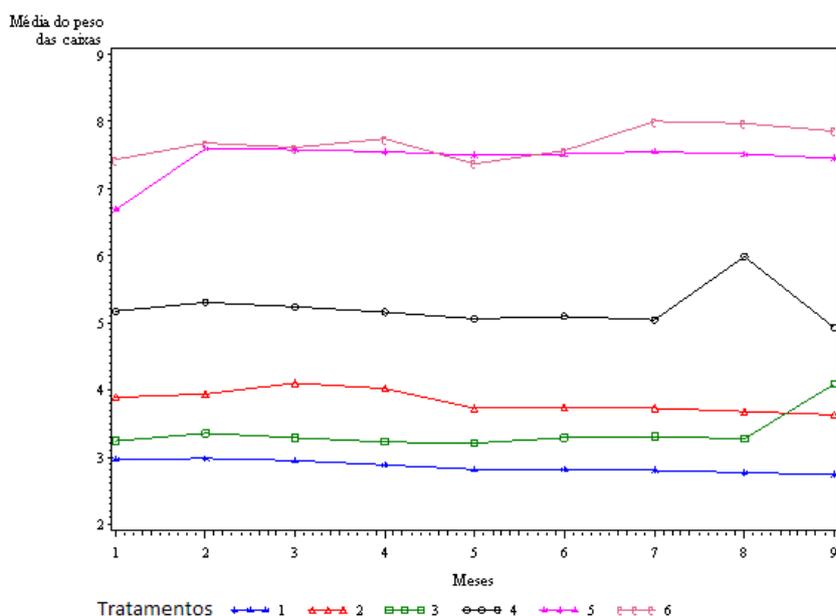


Figura 4 – Média do peso das caixas (g) de *T. angustula* no período de setembro de 2013 a agosto de 2014 com as diferentes dimensões e espessuras. 1 (10x10 com 2cm), 2 (10x10 com 3 cm), 3 (10x10 com 3,5 cm), 4 (10x10 com 4 cm) 5 (10x10 com 5 cm) 6 (12x12 com 5 cm).

Avaliando dois meses de observações (setembro e outubro/2013) pode-se constatar que não há efeito entre a dimensão, espessura e meses para *T. angustula*. Os valores de F estão apresentados na Tabela 3, em que ocorreu diferença significativa entre as dimensões e espessuras, porém não houve interação. Na Figura 5 pode-se observar que nos tratamentos 6 e 8, os resultados foram semelhantes e têm a mesmas espessuras, mas com dimensões diferentes (12x12 e 15x15).

Tabela 3 – Análise de variância para *T. angustula* em dois meses de observações (setembro e outubro)

	DF	Soma de quadrado	Quadrado médio	Valor F	Pr > F
<b>Dimensão/espessura</b>	7			26,40	<,0001
<b>Erro</b>	21	20,54	0,97		
<b>Meses</b>	1	0,83	0,83	9,29	0,0061
<b>Meses*DE.</b>	7	0,76	0,10	1,22	0,3368
<b>Erro (Meses)</b>	21	1,88	0,08		

\*DE - Dimensão/espessura

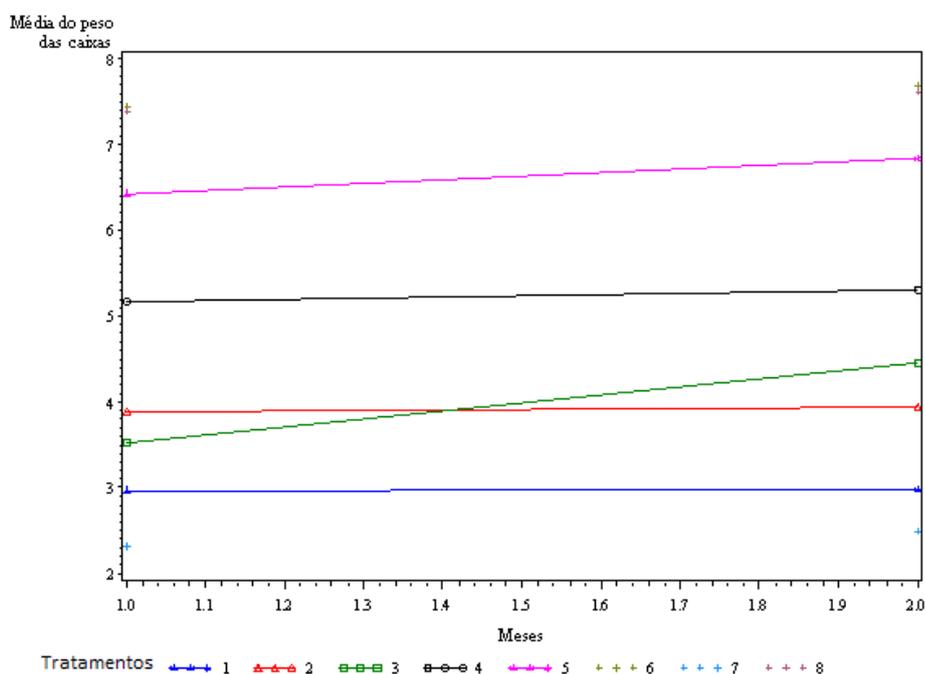


Figura 5 – Média do peso das caixas (g) do experimento com *T. angustula* em dois meses (setembro e outubro) para cada um dos tratamentos. 1 (10x10 com 2cm), 2 (10x10 com 3 cm), 3 (10x10 com 3,5 cm), 4 (10x10 com 4 cm) 5 (10x10 com 5 cm) 6 (12x12 com 5 cm) 7 (15x15 com 2 cm) 8 (15x15 com 5 cm).

Avaliando os dois meses de observações (setembro e outubro/2013) para espécie de *T. weyrauchi*, ocorreu diferença significativa entre as dimensões e espessuras, porém não houve interação, os dados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Análise de variância para *T. weyrauchi* em dois meses de observações (setembro e outubro)

	DF	Soma de quadrado	Quadrado médio	Valor F	Pr > F
<b>Dimensão/espessura</b>	1	366,36	366,36	1048,38	<,0001
<b>Erro</b>	8	2,79	0,34		
<b>Meses</b>	1	0,08	0,08	2,19	0,1776
<b>Meses*DE</b>	1	0,07	0,07	1,87	0,2087
<b>Erro (Meses)</b>	8	0,32	0,04		

\*DE - Dimensão/espessura

Para criação de *T. angustula*, as espessuras foram selecionadas com base nas observações realizadas em campo quanto à nidificação registrada para a espécie. As colônias se desenvolveram melhor na menor dimensão testada (10x10 cm), e com espessura de 3,5 cm. A perda de colônias registrada pode ter ocorrido por vários fatores como, por exemplo, a chuva intensa registrada no período do desaparecimento. E a baixa disponibilidade de alimento, que durante o período de experimento optou-se por não oferecer nenhum tipo de suplemento alimentar.

### Desenvolvimento e temperatura

As variáveis climáticas (temperatura média, máxima, mínima e umidade relativa do ar) foram comparadas com a temperatura interna dos ninhos na região dos discos de cria com termômetros digitais *indoor/outdoor*. Foi observado que as temperaturas internas dos ninhos independem da temperatura ambiente, pois as colônias mantêm a temperatura para o desenvolvimento e a capacidade de termorregulação.

Os ninhos de *T. angustula* apresentaram temperatura média de 28,8°C e a temperatura mínima registrada foi de 26°C no mês setembro e máxima de 32°C no mês de novembro. Em *T. weyrauchi*, a média de temperatura foi de 30,3°C, a temperatura mínima registrada foi de 29,8°C no mês setembro e máxima de 30,6°C no mês de novembro. As maiores temperaturas externas foram registradas em outubro enquanto a menor temperatura ambiente foi de 21°C nos meses de maio e julho.

Entre setembro a janeiro, foram observados os maiores valores para umidade interna nas colmeias quando comparada com os outros meses, o maior valor registrado

foi de 90% em novembro e a menor foi de 30% nos meses de junho, julho e agosto. A umidade externa registrada foi maior em abril 89,25% e o menor índice registrado foi em setembro 73,5%. O período com maior precipitação pluviométrica ocorreu em dezembro, janeiro e fevereiro (Tabela 5).

Tabela 5 – Dados climáticos de temperatura do ambiente (°C), umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm) de 2013 e 2014

Meses	Temperatura (°C)			Umidade relativa (%)	Precipitação (mm)
	mínima	máxima	média		
Setembro (2013)	23,3	31,0	27,1	<b>73,5</b>	2,5
Outubro (2013)	23,0	<b>33,0</b>	24,5	82,0	5,1
Novembro (2013)	23,0	30,7	26,8	80,0	9,2
Dezembro (2013)	22,0	28,3	25,1	82,3	<b>25,3</b>
Janeiro (2014)	23,0	31,0	27,0	85,7	<b>35,1</b>
Fevereiro (2014)	23,0	28,6	25,8	88,5	<b>17,2</b>
Março (2014)	23,3	30,0	26,6	87,5	10,8
Abril (2014)	22,6	30,1	26,3	<b>89,2</b>	10,3
Mai (2014)	<b>21,0</b>	29,2	25,1	86,0	2,5
Junho (2014)	22,6	31,8	27,2	79,0	12,8
Julho (2014)	<b>21,1</b>	29,4	25,2	79,5	12,2
Agosto (2014)	22,3	33,0	27,6	79,5	8,5
Mínima	21,0	28,3	24,5	73,5	2,5
Máxima	23,3	33,0	27,6	89,2	35,1
Média	22,5	30,5	26,1	82,7	12,6

## DISCUSSÃO

A média para o número de discos nas duas espécies avaliadas foi superior (*T. angustula* 9,4 e *T. weyrauchi* com 12,2 discos), assim como o diâmetro registrado quando comparamos com outros autores. Segundo Nogueira-Neto (1997), o ninho de *T. angustula* é construído em forma de disco, com uma média de sete discos de cria sobrepostos e ligados entre si. O disco central possui, em média, 60 mm de diâmetro, o disco superior e o inferior podem chegar a 20 mm de diâmetro.

As duas espécies *T. angustula* e *T. weyrauchi* apresentaram similaridades físicas, estruturais e comportamentais (CORTOPASSI-LAURINO; NOGUEIRA-NETO, 2003). Vale ressaltar que as colônias de *T. weyrauchi* apresentaram comportamento defensivo, sendo recomendada a utilização de vestimentas. Esse estudo proporcionou registrar uma característica de *T. weyrauchi* que não havia sido descrita que é a lixeira encontrada na parte inferior do ninho, uma característica importante que influencia na escolha do modelo de caixa racional a ser utilizado.

O conhecimento da estrutura do ninho e hábitos de nidificação é importante, mas para alguns ambientes ainda faltam informações (LIMA, 2013). As áreas de florestas muito afetadas por pressões antrópicas apresentam menor densidade e riqueza de ninhos de meliponíneos. Os dois principais recursos limitantes da densidade de ninhos é a disponibilidade de locais de nidificação e alimento (SLAA, 2006).

Registros de nidificação de *Tetragonisca* em áreas urbanas, realizados por Velez-Ruiz et al. (2013), foram encontradas colônias em cavidades no interior de construção (73%) e (27%) que estavam dentro de postes de cimento e troncos de árvores. Esses autores observaram as colônias em alturas que variaram de 0 a 250 cm ( $X = 38,8$  cm,  $\pm 55$ ,  $n = 59$ ) acima do solo e frequentemente as colônias estavam expostas à luz solar. Esses valores são diferentes dos observados neste estudo para a espécie de *T. angustula* em que 97% dos ninhos foram registrados em troncos de árvores.

A nidificação da espécie *T. angustula* no Estado de Rondônia ocorre em ambientes rurais e urbanos. A *T. weyrauchi* sendo uma espécie de nidificação aérea e com as condições de desmatamento na área de estudo, observou-se um número pequeno de colônias quando comparado com *T. angustula* e são raríssimas as colônias alojadas em ambientes urbanos. Porém, segundo Cortopassi-Laurino e Nogueira-Neto, (2003), a *T. weyrauchi* registrada no estudo realizado na cidade de Xapuri no Estado do Acre, é muito frequente. Essa espécie é localizada principalmente em forquilhas inclinadas de árvores, beirais de telhados e, até mesmo, paredes de caixas d'água.

As diferenças observadas para a frequência e o local de nidificação estão associadas ao extrativismo indiscriminado praticado há muitos anos por toda a Amazônia, como o desmatamento, a destruição de locais de nidificação, a ação dos meleiros que apenas retiram o mel e jogam fora o resto da colônia e o uso de pesticidas em áreas agrícolas próximas à floresta vem fazendo com que haja diminuição no número de populações de abelhas sem ferrão na região (KERR et al., 2001).

Um estudo realizado em Rondônia, por Brown e Albrecht (2001), revelou que a riqueza e a abundância dos meliponíneos estão diretamente relacionadas com a área de cobertura vegetal e inversamente proporcional ao tamanho da área desmatada. Segundo Brosi et al. (2008), o desmatamento é, portanto, uma grave ameaça para a conservação das populações de abelhas sem ferrão.

As condições ambientais influenciam não só a nidificação, mas também o desenvolvimento da colônia que está associado à oferta de alimento. Avaliações referente ao peso médio das colônias em *T. angustula* foram realizadas por Chiari et al.

(2002), a média foi de  $320,92 \pm 119,99$  gr. Valores próximos do encontrado por Torres et al. (2007), em que o ninho pesou 304 gr, com 11,5 cm de altura e 143 potes de armazenamento, 82 com mel, 50 com pólen e 11 vazios. Os valores de peso registrados no estudo foram menores porque foi realizada a pesagem somente dos discos de cria, não considerando o invólucro e potes com alimento.

Uma das características observadas em *T. weyrauchi* que diferem das espécies do gênero são os respiráculos, essa estrutura foi descrita por Cortopassi-Laurino e Nogueira-Neto (2003) como aberturas que variam no tamanho e número de acordo com a temperatura ambiente, é uma forma de regular a temperatura. Esses mesmos autores realizaram observações em dez ninhos de *T. weyrauchi*, em colmeias, modelo Paulo Nogueira-Neto - PNN (NOGUEIRA-NETO, 1997) e, em uma dessas caixas racionais, a estrutura de um respiráculo foi construída pelas abelhas num buraco lateral superior da caixa. Neste estudo, os autores não citam o tamanho da colmeia utilizada.

Considerando a grande diversidade de espécies de abelhas sem ferrão, a escolha de um modelo único para criar todos os tipos é inviável, sendo necessário, para cada espécie ajustes na forma e/ou dimensões das caixas, o que depende diretamente da biologia de cada espécie de abelha (VILLAS-BÔAS, 2012). Vale ressaltar que a forma e a dimensão das caixas utilizadas para uma espécie de abelha pode apresentar resultados diferentes de acordo com a região, pois os fatores ambientais como temperatura, umidade influenciam no desenvolvimento das colônias.

Um método de multiplicação de colônias recomendado é o modelo de colmeia INPA. Em estudo, essa colmeia se mostrou 100% eficiente para o aumento rápido do número de colônias em meliponários no município de Manacapuru/AM (CARVALHO et al., 2002). Apesar da exploração comercial da meliponicultura ainda ser pequena quando comparada com a apicultura, o reconhecimento do melhor tipo de colmeia para estas abelhas em uma determinada região é importante (CHIARI et al., 2002).

O modelo Fernando Oliveira/INPA foi adequado para a espécie *T. angustula*. Porém, não é adequado para a *T. weyrauchi*, sugerimos que sejam avaliadas novas dimensões e adaptações como perfurações na colmeia que podem ser feitas na parte inferior, superior ou lateral, seria uma forma de facilitar a termorregulação, assim as abelhas através das aberturas podem desenvolver os respiráculos para manutenção da temperatura.

Oliveira e Aidar (2006) observaram que, na região amazônica, as colônias quando alimentadas artificialmente apresentam desenvolvimento superior ao das submetidas

somente à alimentação natural, principalmente no período de escassez de floradas, em razão das mudanças climáticas (início das chuvas). No estudo realizado, as colônias foram submetidas somente à alimentação natural, o local onde as colmeias foram instaladas para o desenvolvimento do estudo é uma área rural; a região é formada por pequenas propriedades com predominância de agricultura familiar.

Apesar da diversidade da flora apícola e da alta concentração de alimento existente no período chuvoso, durante a estação seca, ocorre escassez de pasto apícola e, conseqüentemente, de alimento para as abelhas (PEREIRA et al., 2006). A alimentação artificial composta de uma solução de 50% de água e 50% de mel de abelha africanizada (DIAS et al., 2008) teve influência significativa no aumento da produção de potes e armazenamento de alimento, no entanto, não teve influência quanto à área dos discos de cria em abelhas sem ferrão (*Melipona subnitida*). Alves et al. (2011) relataram que as abelhas que consumiam a alimentação artificial, acumularam reserva de alimento e também coletaram pólen, néctar e resina, aceitaram a alimentação artificial e isso contribuiu para o fortalecimento das colônias.

Além do alimento, uma característica importante para a meliponicultura é a adaptação das abelhas. Segundo Chiari et al. (2002), é importante a adaptação das abelhas ao tipo de colmeia, principalmente, as medidas que facilitam a termorregulação. Neste estudo, os autores avaliaram diferentes modelos de colmeias com a espécie *T. angustula*, na cidade de Maringá – PR, e concluíram que os modelos de colmeias Guiliani e Nogueira-Neto seriam os mais recomendados para a região.

No período do experimento, as características das propriedades próximas foram alteradas e ocorreu aumento no cultivo de soja (*Glycine max* L. Merrill); e a utilização de pesticidas. Esses fatores podem ter sido um dos principais, senão o responsável pelo abandono das colônias que vale ressaltar a falta da oferta de alimentação artificial. O abandono registrado em *T. weyrauchi* pode ter ocorrido pelos fatores citados ou ainda pelo fato desta espécie ter um mecanismo diferente de termorregulação, não se adaptando à colmeia racional utilizada neste experimento ou ao manejo de instalação e revisão de colônia.

A capacidade de termorregulação de colônias foi estudada por Proni e Hebling (1996) em abelhas *T. angustula* e *T. fiebrigi*, as avaliações foram realizadas durante o inverno e no verão na área do ninho, a temperatura média observada para *T. fiebrigi* foi de 28,1°C e para *T. angustula* 28,6°C durante o inverno. Durante o verão, a temperatura média observada *T. fiebrigi* de 29,5°C e para *T. angustula* 31,6°C. A temperatura

ambiente no mesmo intervalo do período foi de 10,5°C - 24,4°C (inverno) e 20,1 - 36,3°C (verão).

Na avaliação térmica em *T. angustula* realizada na Colômbia, os autores afirmaram que essas abelhas executam a termorregulação e são capazes de manter a temperatura constante na área do ninho em  $25,5 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$ . As temperaturas mais elevadas foram ( $30,3 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ ) registradas na parte central do ninho (TORRES et al., 2007). Os resultados desses estudos corroboram com os valores registrados para a espécie *T. angustula* do Estado de Rondônia, onde a temperatura mínima registrada foi de 26°C e máxima de 32°C.

A temperatura interna das colônias de *T. weyrauchi* foi registrada somente no estudo de Cortopassi-Laurino e Nogueira-Neto (2003), esses autores afirmam que a temperatura interna das colônias acompanham as variações da temperatura ambiente, permanecendo sempre próximas, registraram temperatura média em ninho habitado de 28,6°C. Essa temperatura é próxima ao que foi registrado para *T. weyrauchi* em Rondônia onde foi observada temperatura média interna maior (30,3°C). Porém, não podemos corroborar com a afirmação dos autores de que as variações acompanham as variações da temperatura ambiente, pois a temperatura mínima registrada nas colônias foi de 29,8°C e a menor temperatura ambiente registrada foi de 21°C.

As médias de temperatura no interior da colônia diferem entre *T. angustula* e *T. weyrauchi*, sendo elas 28,8°C e 30,3°C, respectivamente, o mecanismo para manter a termorregulação desta espécie são os respiráculos. Mas, a resistência à temperatura da *T. weyrauchi* foi verificada por Ronqui (2016) por meio da termoestabilidade, que avaliou a expressão de enzimas. Estas enzimas apresentaram atividade mesmo em altas temperaturas, e só foram totalmente degradadas a 60°C. Essa mesma avaliação foi realizada por Stuchi et al. (2012) em *T. angustula* e *T. fiebrigi*, porém as enzimas perderam a atividade a 54°C.

É importante ressaltar que o Estado de Rondônia apresenta um grande número de espécies de abelhas sem ferrão. No Estado são encontradas 110 espécies, no levantamento realizado foram registradas dez novas espécies. Mas, o impacto da agricultura e o desmatamento sobre as abelhas sem ferrão no Estado de Rondônia, afetam a quantidade, a diversidade e a composição de abelhas sem ferrão. Brown e Oliveira (2014) afirmaram que o desmatamento pode ter consequências graves para a polinização e reprodução de ambas as plantas nativas e cultivadas.

Venturieri (2009) relatou que para a conservação das abelhas sem ferrão na Amazônia são recomendadas algumas ações como mais estudos sobre a sua biologia de nidificação, monitorar e controlar o corte de árvores que contêm cavidades naturais de nidificação; estratégias de gestão que determinem as árvores que oferecem abrigos em potencial; informar melhor os exploradores de madeira e técnicos sobre os efeitos do corte das árvores que possuem ninhos de abelhas sem ferrão na reprodução de espécies de árvores de interesse comercial. É necessário oferecer informação sobre a importância de manter as espécies de plantas que servem de alimento para populações naturais de abelhas sem ferrão e polinizadores em geral.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama) publicou no Diário Oficial da União em 17 de agosto de 2004 a resolução nº 346 de 06 de julho de 2004, que disciplina a utilização de abelhas silvestres nativas, bem como a implementação do meliponário. Segundo a lei complementar nº 140, de 8 de dezembro de 2011, a aprovação do funcionamento de criadouros da fauna silvestre, principalmente de abelhas sem ferrão bem como a sua fiscalização é ação administrativa dos Estados, por meio desta lei é estabelecida a cooperação entre a União, os Estados, o Distrito Federal e os Municípios.

Contudo, sabe-se que somente a criação de uma legislação normativa não é suficiente para preservação de espécies da fauna e flora nativa. É necessário, também, um programa informativo visando à capacitação e à sensibilização. A ecologia de uma região é de importância notável para a conservação das abelhas, pois promove a preservação das espécies vegetais e a manutenção da diversidade genética e, ao mesmo tempo, a sobrevivência das colônias. Hoje, são poucas as publicações que têm por objetivo investigar o potencial econômico das abelhas sem ferrão.

## CONCLUSÕES

Podemos concluir que a arquitetura do ninho difere não só nos respiráculos, mas também na lixeira que foi registrada para *T. weyrauchi*. Quanto à nidificação, a frequência observada é maior em *T. angustula* quando comparada a *T. weyrauchi*.

Colmeias, modelo Fernando Oliveira/INPA, são eficientes para produção em *T. angustula*. Porém, essa colmeia não é adequada para *T. weyrauchi*.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo projeto (Processo 482947/2013-6).

## REFERÊNCIAS

ALVES, T.T.L.; BARBOSA, R.S.; SANTOS, W.D.; SILVA, J.N.; HOLANDA NETO, J.P. Estudo do desenvolvimento e força de trabalho de abelha mandaçaia (*Melipona mandacaia*) em meliponário no estado do Ceará, como ferramenta para o manejo racional da espécie. **Revista Verde**, v. 6, n. 2, p. 163-168, 2011.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Lei complementar. Fixa normas, nos termos dos incisos III, VI e VII do **caput** do parágrafo único do art. 23 da Constituição Federal. **Diário Oficial**, 09 de dezembro de 2011. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/lcp/Lcp140.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/lcp/Lcp140.htm). Acesso em: 22 maio 2013.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n. 346, de 16 de agosto de 2004. Disciplina a utilização das abelhas silvestres nativas, bem como a implantação de meliponários. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 158, 17 ago. 2004. Seção 1, p. 70.

BROSI, B.J.; DAILY, G.C.; SHIH, T.M.; OVIEDO, F.; DURAN, G. The effects of forest fragmentation on bee communities in tropical countryside. **Journal of Applied Ecology**, v. 45, n. 3, p. 773-783, 2008.

BROWN, J.C.; ALBRECHT, C. The effect of tropical deforestation on stingless bees of the genus *Melipona* (Insecta: Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in central Rondonia, Brazil. **Journal of Biogeography**, v. 28, n. 5, p. 623-634, 2001.

BROWN, J.C.; OLIVEIRA, M.L. The impact of agricultural colonization and deforestation on stingless bee (Apidae: Meliponini) composition and richness in Rondônia, Brazil. **Apidologie**, v. 45, n. 2, p. 172-188, 2014.

CAMARGO, J.M.F.; PEDRO, S.R.M. 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**, 2013. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em 23 jan. 2014.

CARVALHO-ZILSE, G.A.; SILVA, C.G.N.; ZILSE, N.; VILAS-BOAS, H.C.; SILVA, A.C.; LARAY, J.P.; FREIRE, D.C.B.; KERR, W.E. **Criação de abelhas sem ferrão**. Manaus: IBAMA/PRÓVARZEA, 2005. 27 p.

CARVALHO G.A.; SILVA, A.C.; KERR, W.E. **Desenvolvimento de tecnologias para implantação de meliponários em comunidades rurais da Amazônia**. Manaus: BASA/FDB/INPA, 2002. 35 p.

CHIARI, W.C.; ATTENCIA, V.M.; FRITZEN, A.E.T.; TOLEDO, V.A.A.; TERADA, Y. (in memorian), RUVOLLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; TORAL, F.L.B.; PAIVA, G.J. Avaliação de diferentes modelos de colméias para abelhas jataí (*Tetragonisca angustula* Latreille, 1811). **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 4, p. 881-887, 2002.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; ROUBIK, D.W.; DOLLIN, A.; HEARD, T.; AGUILAR, I.B.; VENTURIERI, G.C.; EARDLEY, C.; NOGUEIRA-NETO, P. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 275-292, 2006.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; NOGUEIRA-NETO, P. Notas Sobre a bionomia de *Tetragonisca weyrauchi* Schwarz, 1943 (Apidae, Meliponini). **Acta Amazônica**, v. 33, n. 4, p. 643-650, 2003.

DIAS, V.H.P.; DIAS, M.A.; OLIVEIRA, F.L.; DIAS, A.M.; COSTA, E.M. Alimentação artificial à base de mel e suas implicações no desenvolvimento de famílias de abelhas jandaíras (*Melipona subnitida* ducke) em Mossoró – RN. **Revista Verde**, v. 3, n. 3, p. 40-44, 2008.

FIERRO, M.M.; CRUZ-LÓPES, L.; SÁNCHEZ, D.; VILLANUEVA-GUTIÉRREZ, R.; VANDAME, R. Effect of biotic factors on the spatial distribution of stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in fragmented. Neotropical habitats. **Neotropical Entomology**, v. 41, p. 95-104, 2012.

KERR, W.E.; CARVALHO, G.A.; SILVA, A.C.; ASSIS, M.G.P. Aspectos poucos mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias Estratégicas**, v. 12, n. 2, p. 20-41, 2001.

KÖPPEN, W. **Climatologia**. Mexico: Fondo de Cultura Economica, 1978.

LIMA, F.V.O.; SILVESTRE, R.; BALESTIERI, J.B.P. Nest entrance types of stingless bees (Hymenoptera: Apidae) in a tropical dry forest of mid-western Brazil. **Sociobiology**, v. 60, n. 4, p. 421-428, 2013.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Nogueirápis, 1997.

OLIVEIRA, M.A.; AIDAR, D. S. Efeito da alimentação artificial no crescimento de colônias de *Melipona seminigra merrillae* (HYMENOPTERA, APIDAE MELIPONINAE). **Mensagem Doce**. São Paulo, n. 89, 2006.

OLIVEIRA, F.; KERR, W.E. **Divisão de uma colônia de jupará (*Melipona compressipes*) usando-se o método Fernando Oliveira**. Manaus, AM: INPA, 2000. 10 p.

PEREIRA, F.M. FREITAS, B.M. VIEIRA NETO, J.M. LOPES, M.T.R. BARBOSA, A.L. CAMARGO, R.C.R. Desenvolvimento de colônias de abelhas com diferentes alimentos protéicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 1, p. 1-7, 2006.

PRONI, E.A.; HEBLING, MJA. Thermoregulation and Respiratory Metabolism in two Brazilian Stingless Bee Subspecies of Different Climatic Distribution, *Tetragonisca angustula fiebrigi* and *T. a. angustula* (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). **Entomology General**, v. 20, n. 4, p. 281 -289, 1996.

RONQUI, L.; GALHARDO, D.; LISBOA, F.T.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; Toledo, V.A.A. Caracterização eletroforética e bioquímica das esterases da abelha sem ferrão *Tetragonisca weyrauchi* (Hymenoptera, Apidae). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 15, n. 1, p. 70-75, 2016.

SAS Institute. SAS/STAT user's guide, version 9.3. SAS Institute, Cary, NC, 2012.  
SLAA, E.J. Population dynamics of a stingless bee community in the seasonal dry lowlands of Costa Rica. **Insectes Sociaux**, v. 53, n. 1, p. 70-79, 2006.

SIQUEIRA, E.L.N.; MARTINES, R.; NOGUEIRA-FERREIRA, F.H. Ninhos de abelhas sem ferrão (Hymenoptera, meliponinae) em uma região do rio Araguari, Araguari- MG. **Bioscience Journal**, v. 23, n.1, p. 38-44, 2007.

SOUZA, B.A.; CARVALHO, C.A.L.; ALVES R.M.O. Notas sobre a bionomia de *Melipona asilvai* (APIDAE: MELIPONINI) como subsídio à sua criação racional. **Archivos de Zootecnia**, v. 57, n. 217, p. 53-62, 2008.

STUCHI, A.L.P.B.; TOLEDO, V.A.A.; LOPES, D.A.; CANTAGALLI, L.B.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C. Molecular marker to identify two stingless bee species: *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera, Meliponinae). **Sociobiology**, v. 59, n. 1, p. 123-134, 2012.

TORRES, A.; HOFFMANN, W.; LAMPRECHT, I. Thermal investigations of a nest of the stingless bee *Tetragonisca angustula* Illiger in Colombia. **Thermochimica Acta**, v. 458, p. 118-123, 2007.

VELEZ-RUIZ, R.I.; GONZALEZ, V.H.; ENGEL, M.S. Observations on the urban ecology of the Neotropical stingless bee *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) **Journal of Melittology Bee Biology, Ecology, Evolution, & Systematics**, n. 15, p. 1-8, 2013.

VENTURIERI, G.C. **Criação de abelhas indígenas sem ferrão**. 2. ed. Belém-PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2008.

VENTURIERI, G.C. The impact of forest exploitation on Amazonian stingless bees (Apidae, Meliponini). **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 684-689, 2009.

VILLAS-BÔAS, J. **Manual tecnológico: mel de abelhas sem ferrão**. Brasília, DF. Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN), 2012.

## VI – CONSIDERAÇÕES FINAIS

As espécies avaliadas apresentaram excesso de homozigotos. Os *primers* microssatélites heterólogos para *T. angustula* e *T. weyrauchi* podem ser utilizados para genética de populações.

A variação detectada com as análises de mtDNA por PCR-RFLP das duas espécies de jataí mostrou que há diferenças no mtDNA entre as duas espécies. Essas populações estão bem diferenciadas, permitindo observar que as populações tiveram padrão distintos de marcadores de mtDNA.

Podemos concluir que a arquitetura do ninho difere não só nos respiráculos, mas também na lixeira que foi registrada para *T. weyrauchi*. Quanto à nidificação, a frequência observada é maior em *T. angustula* quando comparada a *T. weyrauchi*.

Colmeias, modelo Fernando Oliveira/INPA, são eficientes para produção em *T. angustula*. Mas, essa colmeia não é adequada para *T. weyrauchi*.