

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**“ESTRUTURA GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE ABELHAS
AFRICANIZADAS (*Apis mellifera* L.) DA COLÔMBIA ESTIMADA ATRAVÉS DE
MARCADORES NUCLEARES E MITOCONDRIAIS”**

**CARLOS FERNANDO PRADA
QUIROGA**

SÃO CARLOS-SP

2004

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**“ESTRUTURA GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE ABELHAS
AFRICANIZADAS (*Apis mellifera* L.) DA COLÔMBIA ESTIMADA ATRAVÉS DE
MARCADORES NUCLEARES E MITOCONDRIAIS”**

**CARLOS FERNANDO PRADA
QUIROGA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução.

SÃO CARLOS-SP

2004

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

Q8eg

Quiroga, Carlos Fernando Prada.

Estrutura genética das populações de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) da Colômbia estimada através de marcadores nucleares e mitocondriais / Carlos Fernando Prada Quiroga. -- São Carlos : UFSCar, 2004. 96 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Abelhas. 2. Marcadores genéticos. 3. Genética de população. I. Título.

CDD: 595.799 (20^a)

Orientador

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

“Una persona me dijo un día: Nunca pretendas ser como los demás, se alguien grande, sin pasar por encima de los demás....alguien que cuando lean tu nombre, sepan quien eres...”

AGRADECIMIENTOS

A Deus, por todas suas benções e graças que me concedeu, em especial o poder estar aqui cumprindo um sonho o qual o vi muito longe.

A minha família, em especial minha mãe, pelo amor e fortaleza que me deu nos momentos mais difíceis que passei na minha estadia aqui no Brasil.

Ao Professor Dr. Marco Antonio Del lama. São poucas as palavras para agradecer toda sua orientação, amizade, carinho, compreensão e paciência durante todo o tempo. Por recebe mais do que esperava.

Aos Professores Dr. Guillermo Salamanca Grosso e Dr. Jorge Tello Durán, pela colaboração nas coletas.

A professora Dra. Silvia Nassif Del Lama e a meus companheiros do laboratório, Daniele, Iara, Carolina, Alessandra, Mateus, Mariana, pela amizade e trabalho alegre e prazenteiro.

A Thais por sua grande amizade e carinho.

A Rogério Oliveira Souza, pela amizade e grande ajuda subministrada ao longo da minha estadia no laboratório.

A Isabel Cristina Godoy, técnica do laboratório, que além da amizade, sua colaboração no auxílio deste trabalho.

A todos os amigos que fiz durante mi estadia no Brasil. Fórum mi respaldo fora de casa.

A CAPES pela ajuda financeira no desenvolvimento deste trabalho.

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS.....	<i>iii</i>
LISTA DE TABELAS.....	<i>vii</i>
RESUMO.....	<i>x</i>
ABSTRACT.....	<i>xii</i>
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O processo de Africanização de <i>Apis mellifera</i> ocorrido no Brasil.....	4
1.2 O Processo de Africanização da abelha da Colômbia.....	8
1.3 Métodos de identificação de subespécies e híbridos.....	10
1.3.1 Análises morfométricas.....	11
1.3.2 Polimorfismos bioquímicos.....	12
1.3.3 DNA mitocondrial.....	14
1.3.4 Microsatellites.....	17
2. PROPOSIÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Material.....	21
3.2 Métodos.....	23
3.2.1 Análise aloenzimática.....	23
3.2.2 Polimorfismos do DNA mitocondrial.....	23
3.2.3 Microsatélites.....	25

3.3 Estimativa de Parâmetros Genéticos.....	28
3.3.1 Frequência Gênica.....	28
3.3.2 Teste de Qui-quadrado de Equilíbrio (X^2).....	28
3.3.3 Teste de Homogeneidade.....	28
3.3.4 Desequilíbrio de ligação.....	28
3.3.5 Estatística F de WRIGHT.....	29
3.3.6 Teste de Correlação Linear.....	29
3.3.7 Distância Genética.....	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1 Análise Aloenzimática.....	30
4.2 Polimorfismos do DNA mitocondrial.....	42
4.2.1 Loco 16S.....	42
4.2.2. Região intergênica CO I – CO II.....	42
4.2.3 Loco CO I	51
4.3 Microsatélites.....	63
5. DISCUSSÃO.....	73
6. CONCLUSÃO.....	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	89

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Migração das abelhas africanizadas pelo continente americano durante o processo de africanização.	6
FIGURA 2. Distribuição das localidades amostradas na Colômbia.....	22
FIGURA 3. Padrões de <i>Hk-1</i> obtidos após eletroforese em gel de amido 14%, observados em amostras de <i>Apis mellifera</i> da Colômbia.....	34
FIGURA 4. Padrões de <i>Mdh-1</i> obtidos após eletroforese em gel de amido 14% observados em amostras de <i>Apis mellifera</i> da Colômbia.....	35
FIGURA 5. Distribuição latitudinal das freqüências alélicas da <i>Mdh-1</i> em amostras da Colômbia.....	37
FIGURA 6. Distribuição latitudinal das freqüências alélicas da <i>Hk-1</i> em amostras da Colômbia.....	38
FIGURA 7. Associação entre as freqüências alélicas de <i>Mdh-1</i> e a altitude das localidades amostradas da Colômbia.....	39
FIGURA 8. Associação entre as freqüências alélicas de <i>Hk-1</i> e a altitude das localidades amostradas da Colômbia.....	40

FIGURA 9. Padrões do loco 16S (<i>Dra I</i>) observadas em amostras de <i>Apis mellifera</i> da Colômbia.....	44
FIGURA 10. Distribuição latitudinal dos Haplótipos do loco 16S (<i>Dra I</i>) em amostras da Colômbia.....	45
FIGURA 11. Distribuição dos padrões de 16S em amostras da Colômbia de diferentes altitudes.....	46
FIGURA 12. Padrões de amplificação da região intergênica COI-COII do DNA mitocondrial de <i>Apis mellifera</i> em amostras da Colômbia, revelados em gel de poliacrilamida a 6% corado com Prata.....	47
FIGURA 13. Padrões de digestão da região intergênica COI-COII (<i>Dra I</i>) do DNA mitocondrial de <i>Apis mellifera</i> em amostras da Colômbia, revelados em gel de poliacrilamida a 12% corado com prata.....	48
FIGURA 14. Distribuição latitudinal dos haplótipos da Região Intergênica COI-COII (<i>Dra I</i>) em amostras da Colômbia.....	49
FIGURA 15. Distribuição dos haplótipos da Região Intergênica COI-COII (<i>Dra I</i>) em amostras da Colômbia de diferentes altitudes.....	50
FIGURA 16. Padrões de digestão da região COI (<i>Taq I</i>) do DNA mitocondrial de <i>Apis mellifera</i> da Colômbia em gel de poliacrilamida a 12% corado com prata.....	52

FIGURA 17. Padrões de digestão da região <i>COI</i> (<i>Bcl</i> I) do DNA mitocondrial em amostras de <i>Apis mellifera</i> da Colômbia, revelados em gel de poliacrilamida a 7% corado com prata.....	54
FIGURA 18. Distribuição latitudinal dos Haplótipos do loco <i>COI</i> (<i>Taq</i> I) em amostras da Colômbia.....	55
FIGURA 19. Distribuição dos haplótipos do loco <i>COI</i> (<i>Taq</i> I) em amostras da Colômbia de diferentes altitudes.....	56
FIGURA 20. Distribuição latitudinal dos Haplótipos do loco <i>COI</i> (<i>Bcl</i> I) em amostras da Colômbia.....	57
FIGURA 21. Distribuição dos haplótipos do loco <i>COI</i> (<i>Bcl</i> I) em amostras da Colômbia de diferentes altitudes.....	58
FIGURA 22. Padrões de amplificação do loco microsatélite <i>A43</i> obtidos após eletroforese em gel poliacrilamida a 6% (uréia), observados em amostras de <i>Apis mellifera</i> da Colômbia.....	64
FIGURA 23. Padrões de amplificação do loco microsatélite <i>RJP57-1</i> obtidos após eletroforese em gel poliacrilamida a 6% (com uréia), observados em amostras de <i>Apis mellifera</i> da Colômbia.....	66
FIGURA 24. Distribuição latitudinal das freqüências alélicas no loco <i>A43</i> em amostras da Colômbia.....	69
FIGURA 25. Distribuição das freqüências alélicas no loco <i>A43</i> em amostras da Colômbia de diferentes altitudes.....	70

FIGURA 26. Distribuição latitudinal das freqüências alélicas no loco *RJP57-1* em amostras da Colômbia.....**71**

FIGURA 27. Distribuição das freqüências alélicas no loco *RJP57-1* em amostras da Colômbia de diferentes altitudes.....**72**

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Fenótipos observados e frequências alélicas estimadas para os locos *Est-1*, *Est-3*, *Est-5* e *Pgm-1* em operárias adultas de 150 colônias de *Apis mellifera* provenientes de 16 localidades da Colômbia.....**32**
- TABELA 2.** Fenótipos de *Mdh-1* e *Hk-1* observados após eletroforese em gel de amido a 14%, a partir de mesossoma de operárias adultas de *Apis mellifera*, coletadas em diferentes regiões da Colômbia.....**33**
- TABELA 3.** Frequências dos alelos de *Mdh-1* e *Hk-1* estimadas em populações de *Apis mellifera* de diferentes regiões da Colômbia e valores de χ^2 para verificação de equilíbrio genético neste locos de acordo com o modelo de Hardy-Weinberg..**36**
- TABELA 4.** Valores da Estatística-F de WRIGHT, estimados a partir dos locos *Mdh-1* e *Hk-1* em populações de *Apis mellifera* provenientes de diferentes localidades da Colômbia.....**41**
- TABELA 5.** Fluxo gênico estimado segundo NEI (1987) a partir dos locos *Mdh-1* e *Hk-1* em populações de *Apis mellifera* provenientes de diferentes localidades da Colômbia.....**41**
- TABELA 6.** Padrões do DNA mitocondrial correspondentes aos locos 16S e da região intergênica CO I – CO II verificados em operárias adultas de *Apis mellifera* provenientes de diferentes localidades da Colômbia.....**43**

TABELA 7. Padrões do DNA mitocondrial correspondentes aos locos 16S e CO I do DNA mitocondrial, observados em operárias adultas de *Apis mellifera* provenientes de diferentes localidades da Colômbia.....**53**

TABELA 8. Frequências haplotípicas da região intergenica COI-COII (*Dra I*) e o loco COI (*Taq I* e *Bcl I*) observadas em operárias adultas de *Apis mellifera* de diferentes regiões da Colômbia. A - Considerando o total das colônias; B – Considerado somente as colônias com DNAmít “Africano”.....**59**

TABELA 9. Associação entre os haplótipos observados para a região intergênica CO I – CO II (sítios *Dra I*) e o loco COI (sítios *Taq I*) em operárias adultas de *Apis mellifera* de diferentes localidades da Colômbia.....**60**

TABELA 10. Associação entre os haplótipos observados para a região intergênica CO I – CO II (sítios *Dra I*) e o loco COI (sítios *Bcl I*) em operárias adultas de *Apis mellifera* de diferentes localidades da Colômbia.....**60**

TABELA 11. Comparação entre os haplótipos observados na região intergênica COI-COII (*Dra I*) e o loco COI (*Bcl I*), estabelecidos para operarias adultas de *Apis mellifera*, coletadas em diferentes regiões da Colômbia.....**60**

TABELA 12. Associação entre os haplótipos observados para a região intergênica CO I – CO II (sítios *Dra I*) e o loco COI (sítios *Bcl I*) em operárias adultas de *Apis mellifera* de diferentes localidades da Colômbia, considerando o total das amostras analisadas para estas regiões do DNA mitocondrial.....**61**

- TABELA 13.** Associação entre os haplótipos observados para a região intergênica CO I – CO II (sítios *Dra I*) e o loco *COI* (sítios *Bcl I*) em operárias adultas de *Apis mellifera* de diferentes localidades da Colômbia, desconsiderando as amostras de padrão “*ligustica*” para a região 16S (sítios *Dra I*).....**62**
- TABELA 14.** Freqüências alélicas de *A43* e valores de χ^2 para verificação de equilíbrio genético de acordo com o modelo de Hardy-Weinberg, verificadas em operárias adultas de *Apis mellifera* de diferentes localidades da Colômbia.....**65**
- TABELA 15.** Freqüências dos alelos de *RJP57-1* verificadas em operárias adultas de *Apis mellifera* de diferentes localidades da Colômbia e valores de χ^2 para verificação de equilíbrio genético de acordo com o modelo de Hardy-Weinberg...**67**
- TABELA 16.** Freqüências observadas e esperadas de homozigotos e heterozigotos para o loco *A43* nas populações de *Apis mellifera* provenientes de diferentes localidades da Colômbia.....**68**
- TABELA 17.** Freqüências observadas e esperadas de homozigotos e heterozigotos para o loco *RJP5-3* nas populações de *Apis mellifera* provenientes de diferentes localidades da Colômbia.....**68**
- TABELA 18.** Comparação entre as freqüências dos alelos de *Mdh-1* encontradas na Colômbia e as reportadas em diferentes países.....**79**
- TABELA 19.** Comparação (valores em % na linha inferior) entre os padrões de DNA mitocondrial da região intergênica CO I – CO II verificados em operárias adultas de *Apis mellifera* analisadas do Brasil, Uruguai e Colômbia.....**83**

RESUMO

A partir de 1957, ocorreu um processo de hibridação no continente Americano entre as abelhas Européias pré-existentes e as Africanas recém introduzidas. Desde a chegada da abelha Africanizada à Colômbia em 1978 e seu total estabelecimento depois de quatro anos, esparsos são os estudos populacionais que demonstram o grau de hibridação entre os enxames Africanizados originados no Brasil e as abelhas residentes naquele país.

A análise das alozimas de Hk-1 e Mdh-1 permitiram demonstrar que: i) as freqüências dos alelos destes locos em amostras de *Apis mellifera* da Colômbia são muito similares às apresentadas pelas abelhas do Brasil; ii) as populações Africanizadas da Colômbia são heterogêneas, apresentando níveis distintos de introgressão dos genes Africanos nas populações Européias residentes; iii) estas populações encontram-se em equilíbrio genético de acordo com o modelo de Hardy-Weinberg e não apresentam desequilíbrio de ligação para estes locos, evidenciando que o processo de Africanização possivelmente deveu ter sido completado na Colômbia; iv) a verificação de um gradiente altitudinal leva à suposição de efeito da seleção sobre os fenótipos de *Mdh-1*.

A análise da região 16S do DNA mitocondrial evidenciou a presença quase exclusiva do padrão Africano nas abelhas da Colômbia, resultado similar ao observado no Brasil e Uruguai. O aumento verificado de freqüência do haplótipo A1 (C/A) para a região intergênica CO I – CO II em amostras da Colômbia está associado à diminuição do padrão A4 (B/B) em seu avanço do Brasil para o norte do continente Americano no decorrer do processo de Africanização. Considerando os resultados para as três regiões do DNA mitocondrial estudadas (16S, região intergênica CO I – CO I e CO I), um número elevado de haplótipos foi observado, indicando uma origem materna muito heterogênea destas colônias. Além disso, os haplótipos do DNA mitocondrial observados não estão distribuídos segundo

um gradiente latitudinal ou altitudinal, o que indica que as colônias com DNA mitocondrial “Africano” têm a capacidade de exploração e adaptação a ambientes muito diversos da Colômbia.

As análises de dois microsátélites evidenciaram a ocorrência de 7 e 12 alelos para os locos *A43* e *RJP57-1*, cujos tamanhos variaram entre 125-150 pb e 400-600 pb, respectivamente.

Os resultados do presente trabalho permitem afirmar que as populações de abelhas da Colômbia são muito similares em sua composição genética, para os marcadores nucleares e mitocondriais estudados, às populações encontradas no norte do Brasil.

ABSTRACT

In 1957 a hybridization process occurred in South America between European and African bees just introduced in the continent. Since the arrival of the Africanized bees to Colombia in 1978 and their total establishment four years later, there have been done few studies about the degree of hybridization between Africanized swarms from Brazil and the resident ones.

Allozymic analysis showed that: i) *Hk-1* and *Mdh-1* allele frequencies in Colombian *Apis mellifera* samples are very similar to the ones of Brazilian bees; ii) Africanized populations from Colombia have different levels of introgression of African genes into the European genome of the resident bees; iii) these populations are at Hardy-Wienberg equilibrium and the loci are not at linkage disequilibrium, suggesting that the Africanization process of the Colombian bees has been completed probability; iv) the presence of a altitudinal clinal variation suggests an effect of natural selection on *Mdh-1* phenotypes.

The 16S region of the mitochondrial DNA showed almost exclusively the African pattern of Colombian bees, a result similar to that was found in Brazilian and Uruguayan bees. The increasing frequencies of haplotype A1 (C/A) for the intergenic region CO I – CO II of Colombian bees is related to the decrease of the pattern A4 (B/B) during the movement of the Africanized swarms from Brazil to north of the continent. Based on the results for the three regions of the mitochondrial DNA (16S, intergenic region CO I - COII and CO I), a high number of haplotypes was observed, showing the heterogeneous maternal origin of these colonies. These mitochondrial DNA haplotypes are not distributed through a latitudinal or altitudinal clines indicating that the colonies with African mitochondrial DNA is able to explore many different environments in Colombia.

Microsatellite analysis showed the presence of 7 to 12 alleles for the *A43* and *RJP57-1* loci. The allele sizes varied between 125-150 pb and 400-600pb,

respectively.

The results of the present work suggest that the bee populations of Colombia are genetically similar to the ones from north Brazil based on the results from nuclear and mitochondrial markers.

1. INTRODUÇÃO

A Classe Insecta é o grupo de organismos mais numeroso na face da terra. Presente em quase todos os habitats, contém mais de 750.000 espécies distribuídas em 26 Ordens. A Ordem Hymenoptera, comumente conhecida por algumas espécies de vespas, formigas e abelhas, é considerada a terceira maior ordem de insetos vivos, depois de Lepidoptera e Coleoptera. Esta ordem é constituída por cerca de 4.000 gêneros e 150.000 espécies e algumas estimativas realizadas apontam para a existência de até 300.000 espécies. As abelhas são descendentes das vespas que deixaram de se alimentar de pequenos insetos e aranhas para consumirem o pólen das flores quando essas surgiram, há cerca de 135 milhões de anos. Durante esse processo evolutivo, várias espécies de abelhas foram aparecendo e hoje se conhece mais de 20.000 espécies, mas acredita-se que existam umas 40.000 espécies ainda não descritas. Somente 2% das espécies de abelhas são sociais (KERR, 1969; GOULET & HUBER, 1993).

Entre as espécies produtoras de mel, as abelhas do gênero *Apis* são as mais conhecidas e difundidas. O fóssil conhecido mais antigo deste gênero, datado de 12 milhões de anos, é *Apis ambruster*, espécie já extinta,. Provavelmente esse gênero de abelha tenha surgido na África, após a separação do continente Americano, tendo posteriormente migrado para a Europa e Ásia, originando as espécies *Apis mellifera*, *Apis cerana*, *Apis florea*, *Apis koschevnikovi*, *Apis andreniformis*, *Apis dorsata*, *Apis laboriosa*, *Apis nuluensis* e *Apis nigrocincta*, *Apis binghami*, *Apis breviligula* (GAULD & BOLTON, 1996; ROUBIK, 1989; OTIS, 1991).

Assim como as vespas e algumas espécies de formigas, a maioria das abelhas possui um ferrão funcional. Sua alimentação é constituída de pólen e de néctar de flores. O primeiro é fonte de proteínas e o segundo, de açúcares. Nas espécies de abelhas solitárias, cada fêmea constrói seu próprio ninho e armazena provisões para suas larvas. Outras vivem em comunidades onde várias fêmeas pertencentes à mesma geração compartilham um ninho, construindo células

onde ficam os ovos, larvas e pupas. Provavelmente 1000 espécies de abelhas são eusociais (verdadeiramente sociais) (KERR, 1969). Estas vivem em grandes colônias com sobreposição de duas gerações: as mães, rainhas, e as filhas, operárias. Os machos têm como função a fertilização das fêmeas.

Apis mellifera é uma espécie que apresenta comportamento eusocial e as colônias reproduzem-se por enxameamento. Usualmente, há uma única rainha na colônia e, em momentos anteriores à enxameagem, são produzidas novas rainhas sendo que a mais velha deixa a colméia com uma parte das operárias e zangões e logo se instala em lugares provisórios até encontrar um refúgio seguro. Foi demonstrado que existe uma certa fidelidade ao local de nidificação (filopatRIA) na dispersão de *Apis mellifera*. A existência de uma árvore ou local específico onde uma colônia nidifica depois da dispersão a cada ano, foi demonstrada por diversos autores como NEWMANN *et al.* (2000b) por meio de análise com microsatélites. Os zangões agrupam-se em áreas de congregação na temporada reprodutiva, nas quais o número de colônias representadas é muito alto, e cada colônia pode estar representada por um zangão ou grupo de zangões-irmãos. Os zangões que fecundam a rainha no vôo nupcial são uma amostra representativa de uma população local (BAUDRY *et al.*, 1998).

O sexo em *Apis mellifera* L., como na maior parte dos Himenópteros, é determinado pela haplodiploidia (número distinto de conjuntos cromossômicos). Apesar de existirem variações na haplodiploidia, a mais comum é a partenogênese arrenótoca, caracterizada pelo desenvolvimento de fêmeas diplóides a partir de embriões fertilizados e de machos haplóides a partir de óvulos não fertilizados. Este fato implica em um grau de parentesco, em média, de 75% entre as fêmeas operárias (se irmãs-completas), 25% entre operárias e zangões e 50% entre a rainha, operárias e zangões; considerando um sistema monoândrico.

Ao contrário de muitas plantas e animais, a determinação do sexo em Hymenoptera, portanto, não pode ser explicada por cromossomos sexuais heteromórficos. Entre os modelos propostos para elucidar os mecanismos de determinação do sexo nessa ordem pode-se citar o modelo de alelos múltiplos

de WHITING (1943, 1945) e MACKENSEN (1951). Os indivíduos que são heterozigotos para este loco sexual se desenvolvem em fêmeas, enquanto os indivíduos que são hemi ou homozigotos se desenvolvem em machos haplóides ou diplóides, respectivamente. Estes últimos podem ser produzidos artificialmente pelo método de POLACZEK *et al.* (2000), por meio de inseminação instrumental de rainhas com sêmen de seus filhos.

Apis mellifera é encontrada em todas as partes do mundo, com exceção das regiões polares, enfrentando condições ecológicas bastante diversificadas que incluem savanas, florestas tropicais, desertos, regiões litorâneas e montanhosas. Essa grande variedade de clima e vegetação acabou originando diferentes características e adaptações às diversas condições ambientais. Este fato, associado ao isolamento geográfico, tem levado à evolução de numerosas subespécies adaptadas aos ambientes específicos. Nas últimas glaciações, por exemplo, as populações Européias foram empurradas para o sul da Península Ibérica, Itália e Grécia, num reduto populacional, acelerando a formação de subespécies locais (RUTTNER, 1981). A origem mais provável da espécie é o sudeste da Ásia, a partir de onde, posteriormente, invadiram a África, Europa e oeste da Ásia por volta de 30 mil anos atrás (BUTLER, 1975). Devido à sua grande importância econômica na produção de mel, cera e própolis, estas abelhas têm sido objeto de diferentes estudos em diversos países do mundo (CORNUET, 1986).

A diferenciação dessas raças não é um processo fácil, sendo realizada somente por pessoas especializadas, que se utilizam de diferentes metodologias propostas para este fim. Baseados em análise multivariada de caracteres morfológicos, RUTTNER *et al.* (1978) propuseram que 26 raças geográficas de *Apis mellifera*, distribuídas em três ramos evolutivos distintos, colonizaram a África e Europa. O primeiro ramo, A, corresponde às subespécies Africanas (*A. m. lamarckii*, *A. m. yemenitica*, *A. m. litorea*, *A. m. scutellata*, *A. m. monticola*, *A. m. adansonii*, *A. m. unicolor*, *A. m. capensis*). O ramo M engloba as subespécies do norte da Europa (*A. m. mellifera*), Espanha e Portugal (*A. m. iberica*), e norte da

África (*A. m. intermissa*, *A. m. sahariensis*, *A. m. major*), enquanto o ramo C agrupa as subespécies do oeste da Europa, norte do Mediterrâneo, e meio este da Europa. Subseqüentemente, RUTTNER (1988, 1992) dividiu este último grupo de subespécies em dois: o ramo C, incluindo subespécies da Itália (*A. m. ligustica*), Áustria e Iugoslávia (*A. m. carnica*), norte da Grécia (*A. m. cecropia*) e Sicília (*A. m. sicula*), e o ramo O que vai além do centro-este até o noroeste da África, compreendendo desde os montes Cáucacos (*A. m. caucasica*), Armênia (*A. m. armeniaca*), Irã, Iraque, Síria e Turquia (*A. m. meda*), Turquia (*A. m. anatoliaca*), Síria (*A. m. syriaca*), Chipre (*A. m. cypria*), e Creta (*A. m. adami*). (SMITH, 1991; GARNERY *et al.*, 1992; 1993; ARIAS & SHEPPARD, 1996; FRANCK *et al.* 1998, 2000; PALMER *et al.*, 2000). Posteriormente, esta classificação foi complementada com a inclusão, por médio do análises de DNAm, do ramo Y característico das abelhas presentes na Etiópia (FRANCK *et al.* 2001).

1.1 O processo de Africanização de *Apis mellifera* ocorrido no Brasil

As abelhas *Apis mellifera* foram introduzidas no continente Americano pelos primeiros colonizadores. Por volta de 1840, as primeiras colônias de *A. m. mellifera* foram introduzidas no Brasil, trazidas da Europa pelos imigrantes alemães e dando início à apicultura no país. A partir de 1870 começou a introdução da subespécie *A. m. ligustica* (NOGUEIRA-NETO, 1972). O objetivo principal da maioria destes primeiros produtores era atender às próprias necessidades de consumo e, desta forma, a maior parte dos apicultores criava as abelhas de forma rústica, possuindo poucas colméias no fundo do quintal, onde, devido à baixa defensividade, eram criadas próximas a outros animais, como porcos e galinhas.

Em meados de 1950, a apicultura praticada no Brasil sofreu um grande impacto devido a problemas com a sanidade (nosemose, acariose e cria pútrida européia) o que dizimou 80% das colméias do país (como na maioria dos países Americanos), diminuindo a produção apícola drasticamente (CORNUET, 1986).

Diante desse quadro, ficou evidente que era necessário aumentar a resistência das abelhas. Assim, em 1956, o professor Warwick Estevam Kerr dirigiu-se à África, com apoio do Ministério da Agricultura do Brasil, com a incumbência de selecionar rainhas de colméias Africanas produtivas e resistentes a doenças. A intenção era realizar pesquisas comparando a produtividade, rusticidade e agressividade entre as abelhas Européias, Africanas e seus híbridos e, após resultados conclusivos, recomendar a abelha mais apropriada às condições tropicais do país. Por esta razão, 51 rainhas Africanas foram levadas a São Paulo para serem estudadas. Um ano após, 26 delas se destacaram por sua alta produtividade e foram transferidas para o Horto de Camaquã (município de Rio Claro, São Paulo) para comparação com um grupo de rainhas italianas. Mas, um apicultor que desconhecia o trabalho que estava sendo realizado, retirou as telas excludoras que estavam dispostas à entrada das colméias ao verificar que as operárias deixavam cair o pólen coletado ao passar por elas. As rainhas escaparam e quando os pesquisadores chegaram, as 26 rainhas já haviam enxameado. A partir deste momento, teve início o processo que ficou conhecido como “Africanização”, isto é, a hibridação entre as abelhas Européias aqui residentes desde o século anterior, trazidas pelos colonizadores, com a subespécie Africana introduzida, cruzando-se indiscriminadamente, terminando com a substituição ou total alteração das primeiras em sua composição genética (GONÇALVES, 1996; EMBRAPA MEIO-NORTE, 2003).

Devido a que estas colônias se reproduzem 10 vezes mais que as Européias, os enxames avançaram com rapidez, a uma taxa de 480 quilômetros anuais. Entre os anos de 1966 a 1979, já existiam registros de sua chegada em outros países da América do Sul, como Argentina, Paraguai, Uruguai, Venezuela, Colômbia, Peru e Equador (GONÇALVES, 1974; ARANJO, 1990; TAYLOR, 1985). A explosiva dispersão de milhares de colônias desta abelha (ver Figura 1) levou à invasão de toda a América do Sul em apenas 25 anos (KERR, 1967; CORNUET, 1986; GONÇALVES, 1998; RINDERER *et-al.*, 1993).



FIGURA 01. Migração das abelhas africanizadas pelo continente americano durante o processo de africanização. As linhas vermelhas indicam os pontos mais distantes de detecção nos anos indicados. Extraído de Rinderer *et-al* (1993).

Em 1982, as abelhas Africanizadas atingiram a América Central, constituindo o Panamá o primeiro país a recebê-las (BOREHAM & ROUBIK, 1987). Pouco tempo depois, estas abelhas ocuparam a Nicarágua, Honduras e o México (MOLINA PARDO *et al.*, 1988; KARPATI & QUINTERO, 1989; RINDERER, 1991). Finalmente, em outubro de 1990, o primeiro exame foi encontrado no Texas, sul dos Estados Unidos da América (SANFORD, 1995).

Mais recentemente, entre os anos 1999-2000, foram observados enxames de abelhas Africanizadas em muitas outras áreas como Imperial, San Diego, Riverside, Orange, Los Angeles e nos condados de San Bernardino e Kern (WILLIAMS, 2001).

Há descrições não confirmadas da introdução isolada de abelhas do sul da África na Venezuela em 1974 (KERR *et al.*, 1982) e no México em 1976 (NUNAMAKER *et al.*, 1984). COBEY & LAWRENCE (1985) também reportaram a introdução de abelhas Africanas na Califórnia (EUA), em 1985. Portanto, a introdução clandestina de subespécies provenientes do continente Africano pode ter contribuído para a formação das populações de abelhas Africanizadas que hoje se encontra nas Américas. Porém, a ausência de relatos seguros sobre a entrada destas abelhas não nos permite afirmar a extensão da contribuição destas possíveis introduções.

A liberação dessas abelhas muito produtivas, porém igualmente defensivas, criou um grave problema para o Brasil. O pavor desse inseto invadiu o mundo devido a notícias sensacionalistas nas TVs, jornais e revistas internacionais, que não condiziam exatamente com a verdade, mas ajudavam nas vendas. Nesse período, nenhum animal foi mais comentado em livros, entrevistas, reportagens e filmes do que as "abelhas assassinas" ou "abelhas brasileiras", como eram chamadas. Com isso, muitos produtores considerados amadores abandonaram a atividade, e os que permaneceram tiveram que se adaptar a novas técnicas e manejo, profissionalizando-se cada vez mais para controlar a defensividade destas abelhas.

Na tentativa de amenizar a situação, entre 1965 a 1972 foram distribuídas entre os apicultores 23.000 rainhas italianas virgens em diferentes áreas do Brasil. As rainhas italianas virgens, foram acasaladas com zangões africanos e Europeus, obtendo uma prole mais produtiva e menos agressiva (DE JONG, 1994, GONÇALVES, 1974, 1984, 1996).

Hoje, as abelhas chamadas “Africanizadas”, por terem herdado muitas características das abelhas africanas, são consideradas como as responsáveis pelo desenvolvimento apícola, de modo que o Brasil, que era o 28º produtor mundial de mel (5 mil t/ano), passou para o 5º lugar (40 mil t/ano). A defensividade é considerada por muitos apicultores como um forte aliado para se evitar roubo de sua produção, e ainda existe a vantagem destas serem mais resistentes a várias pragas e doenças que assolam a atividade em todo o mundo (GONÇALVES, 1984).

1.2 O Processo de Africanização da abelha da Colômbia

Na época anterior à colonização espanhola, todas as espécies de abelhas existentes na Colômbia, como em todo o continente Americano, eram abelhas nativas e nenhuma delas tinha ferrão: os Meliponídeos. Destas, as culturas mesoamericanas cultivaram diversas variedades dos gêneros *Trigona* e *Melipona*, entre elas, a de maior importância, a espécie *Melipona beecheii* Bennett. Existem indícios de grande atividade de diversos grupos indígenas colombianos na coleta de mel e cera de ninhos silvestres, como os Chibchas do vale do Rio Cauca e dos Muiscas do Altiplano oriental (NATES, 1996).

Entretanto, com o descobrimento do continente chegaram também as abelhas Europeias com ferrão, procedentes de países como Espanha e Alemanha (*Apis mellifera mellifera*), Eslovênia (*Apis mellifera carnica*) e Itália (*Apis mellifera ligustica*). Estas abelhas foram bem recebidas pelas comunidades existentes, pois elas eram boas produtoras de mel e cera, e apresentavam comportamento

pouco defensivo. Em razão destas características, elas foram rapidamente espalhadas pelo país, devido à demanda de mel e, em especial, de cera para uso religioso, uma vez que a Espanha não supria a demanda exigida.

Por volta de 1927, a apicultura era exclusivamente uma atividade do clero e até o ano de 1930, a exploração desta indústria em sua maioria se realizou de forma rústica. O governo Nacional, através do Ministério da Agricultura, ao final do século XIX e primeiros anos do século XX, deu início à importação periódica de rainhas das raças *ligustica*, *carnica*, *caucasiana*, entre outras. Com estas raças, iniciou-se o fomento da atividade apícola no país. As abelhas que se adaptaram a partir dos cruzamentos naturais silvestres deram origem às erroneamente denominadas abelhas “criollas”. Posteriormente, teve início o esforço rumo à apicultura chamada moderna: a utilização da "colméia tipo Americana" ou colméia móvel que até hoje é amplamente utilizada (SALAMANCA *et al.*, 2000).

Com a chegada da abelha Africanizada ao país em 1978, invadindo o território nacional em quatro anos, o governo colombiano se preocupou inicialmente com o controle ou eliminação da mesma. Entretanto, hoje esta abelha se encontra amplamente espalhada pelo país, e encontra-se em quase todos os ecossistemas, com raras exceções. O primeiro relato da presença das abelhas Africanizadas na Colômbia veio de Puerto Carreño (Vichada), em 1978, sendo confirmada esta presença em abril de 1979 em Arauca. Este inseto penetrou o país pelos Llanos Orientales e Guajira, desde o Norte e avançaram rumo ao interior do país pelos vales dos rios Magdalena e Cauca, distribuindo-se assim, pouco a pouco, por todo o país (NATES, 1981).

Inicialmente, pensava-se que a abelha Africanizada só viveria em zonas planas, ao nível do mar e em algumas partes da zona cafeeira, mas elas invadiram também a Sabana de Bogotá, o departamento de Boyacá e as altas cordilheiras (NATES, 1981). Esta proliferação pode ser atribuída às condições climáticas dos países Americanos muito similares às da África; além disso, estas abelhas, em condições favoráveis, desenvolvem-se mais rapidamente e sobrevivem melhor em condições desfavoráveis que as abelhas Européias.

Além disso, muitas características devem ter contribuído para a rápida adaptação das Africanizadas, tais como a rapidez no vôo, alta atividade e nervosismo (KERR *et al.*, 1970), reprodução rápida, defesa eficaz contra predadores, defensividade sob condições adversas ou flutuações na disponibilidade do néctar, sua maior flexibilidade na escolha dos locais de nidificação e maior resistência a ácaros e doenças que as raças européias (GONÇALVES, 1974). Outro fator que certamente contribuiu para esta expansão relaciono-se ao grande número de enxames primários e secundários produzidos por uma colônia em um curto espaço de tempo (KERR *et al.*, 1970; FLETCHER, 1978).

As diferenças interpopulacionais destas abelhas podem estar relacionadas a uma distribuição não uniforme das subespécies Européias de *Apis mellifera* antes da Africanização. Diferenças na colonização dos países americanos, por exemplo o Brasil, em que a presença de imigrantes italianos e alemães nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, que praticavam apicultura com abelhas européias, em comparação com uma atividade quase ausente no nordeste e centro do Brasil (NOGUEIRA-NETO, 1972), devem ter contribuído para o aparecimento destas diferenças.

GONÇALVES (1998) destaca que o uso das abelhas Africanizadas na apicultura comercial praticada na América do Sul vem sendo cada vez mais freqüente, existindo inclusive apicultores no Brasil e outros países que preferem estas abelhas coletadas na natureza em vez das Européias puras, devido à sua produtividade, alta capacidade de adaptação às condições ambientais tropicais do Brasil e resistência ao ácaro *Varroa jacobsoni*.

1.3 Métodos de identificação de subespécies e híbridos

Trabalhar com marcadores genéticos significa utilizar características herdáveis em indivíduos de uma dada população, considerando que todos os marcadores reflitam diferenças nas seqüências de DNA. Os marcadores unilocais são caracteristicamente co-dominantes, ou seja, em um indivíduo diplóide,

ambos os alelos de um determinado loco são identificados, o que os torna altamente informativos. São marcadores unilocais os RFLPs e as seqüências minisatélites e microsátélites de DNA repetitivo. Os marcadores multilocais permitem a visualização de muitos genes anônimos, simultaneamente. Entretanto, sua característica dominante, onde somente um dos alelos é identificado, os tornam pouco informativos. No entanto, esses marcadores, tais como RAPD e AFLP, são largamente utilizados em estudos populacionais, pois, com base em eventos recentes, permitem a inferência de relações de parentesco entre indivíduos de uma dada população e da história de divergência entre populações de uma mesma espécie (SUNNUCKS, 2000).

Com a ocorrência da Africanização, vários métodos foram desenvolvidos com o intuito de permitir a diferenciação das abelhas Européias, Africanas e determinar o grau de hibridização entre as abelhas Européias aqui residentes e as Africanas introduzidas posteriormente. Dentre esses estudos, destacam-se as análises morfométricas, aloenzimáticas, microsátélites e DNA mitocondrial.

1.3.1 Análises morfométricas – Os primeiros trabalhos que utilizaram dados morfométricos para a diferenciação de várias subespécies de *Apis mellifera* L. foram conduzidos por ALPATOV (1929) e por GOETZE (1941), ao estudar abelhas da Rússia e Europa, respectivamente. O estudo das medidas de ângulo de certas nervuras, e comprimento e largura das asas foi introduzido por DU PRAW (1965). CORNUET *et al.* (1975) e RUTTNER *et al.* (1978) introduziram a análise simultânea de variáveis múltiplas empregando métodos de análise estatística multivariada.

DALY e BALLING (1978) escolheram 25 caracteres morfológicos, inclusive das asas, de forma a estabelecer várias funções discriminantes com capacidade de identificar indivíduos ou colônias com diferentes níveis de acerto. Esta função discriminante foi testada e todas as abelhas amostradas foram corretamente identificadas (RINDERER *et al.*, 1986; HEBERT *et al.*, 1988).

Um estudo baseado em sete medidas da asa posterior e anterior de várias populações de abelhas Africanizadas do Brasil mostrou uma diminuição do tamanho das asas em direção à região norte do país, principalmente com relação às asas anteriores. Estes dados confirmam que as abelhas que ocupam regiões mais próximas ao Equador possuem maior semelhança com a abelha Africana (ROTTA, 1999).

Apesar da análise morfométrica ser utilizada para testes rápidos na identificação da origem das colônias, nenhum caráter individual é capaz de diferenciar as subespécies Europeias e Africanas com confiabilidade aceitável devido ao fato de existir uma sobreposição dos valores em condições naturais com os produzidos por fatores de stress ambiental. Além disso, esta análise não pode distinguir claramente os híbridos após uma geração (HALL, 1986). Devido a isto, a utilização de outros métodos torna-se essencial.

1.3.2 Polimorfismos bioquímicos - Os estudos moleculares acerca da variação genética nas diversas espécies tiveram início com o desenvolvimento da eletroforese de proteínas, nos anos 50. Este método se baseia na migração diferencial de moléculas protéicas com cargas diferentes quando submetidas a um campo elétrico. As pesquisas nesse campo concentraram-se na busca de múltiplas formas moleculares (alélicas ou não) da mesma enzima (alozimas e/ou isozimas) que ocorrem em uma espécie e que desempenham, portanto, a mesma atividade catalítica, mas que podem ter diferentes propriedades cinéticas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Este método permite inferir que as diferenças apresentadas entre as isoenzimas sejam o resultado de diferenças ao nível das seqüências de DNA que as codificam.

Uma das vantagens técnicas deste marcador é a expressão co-dominante das bandas geradas no gel sob eletroforese. Para interpretação do padrão de bandas é necessário o conhecimento da estrutura quaternária da enzima. Assim, uma enzima monomérica (constituída por uma única cadeia polipeptídica) apresentará duas bandas no heterozigoto, uma enzima dimérica (formada pela

união de duas cadeias polipeptídicas) apresentará três bandas no heterozigoto e uma enzima tetramérica apresentará cinco (SOLFERINI & SCHEEPMARKER, 2001). As isoenzimas têm sido usadas em pesquisas de biologia evolutiva principalmente através do estudo detalhado de um loco e as suas variantes alélicas (alozimas) e a utilização de muitos locos para estudos populacionais. Entretanto, considerando que mutações no material genético nem sempre levam a alterações na estrutura protéica e nem toda alteração na seqüência de aminoácidos provoca diferenças na mobilidade electroforética, os níveis de variabilidade podem ser subestimados (SOLFERINI & SCHEEPMARKER, 2001). SUNNUCKS (2000) considera que este marcador molecular revela pouca variação e gera informações genealógicas limitadas. O autor ressalta, portanto, as vantagens do uso de DNA para estudos em populações.

Em *Apis mellifera*, o emprego da eletroforese em gel de amido permitiu a detecção de muitas variantes protéicas, permitindo a caracterização genética de raças e híbridos. Esta metodologia possibilitou o estudo de vários padrões iso e aloenzimáticos de *Apis mellifera* a partir dos anos 70. Os primeiros trabalhos realizados por MESTRINER (1969) e MESTRINER & CONTEL (1972), demonstraram a ocorrência de variantes eletroforéticas da proteína P_3 e de esterase (*Est*). Outros sistemas polimórficos foram descritos, entre os quais álcool desidrogenase (*Adh*) (MARTINS *et al.*, 1977), malato desidrogenase (*Mdh*) (CONTEL *et al.*, 1977), as esterases 1, 3, 5 e 6 (BITONDI & MESTRINER, 1983; DEL LAMA, *et al.*, 1985a; BIASIOLO & COMPARINI, 1990), fosfoglicomutase (*Pgm*) e hexoquinase (*Hk*) (DEL LAMA *et al.*, 1985b, 1988), demonstrando que alguns destes alelos apresentavam freqüências bem distintas nas diferentes subespécies. *Mdh* e *Hk* são freqüentemente utilizados como marcadores para caracterizar populações de *A. mellifera* ou determinar sua composição racial (BADINO *et al.*, 1983; SHEPPARD & MCPHERON, 1986; SPIVAK *et al.*, 1988; LOBO *et al.*, 1989; LOBO, 1995; DEL LAMA *et al.*, 1988, 1990, 2004; ROTTA, 1999; HATTY & OLDROYD, 1999; DINIZ *et al.*, 2003).

As análises morfométricas e alozímicas permitiram demonstrar que as populações de abelhas Africanizadas são heterogêneas, apresentando níveis de introgressão gênica intermediários entre as abelhas Européias e Africanas (LOBO *et al.*, 1989; DEL LAMA *et al.*, 1990; ROTTA, 1999).

1.3.3 DNA mitocondrial - Células de eucariotes apresentam DNA nuclear e DNA de organelas, tais como mitocôndrias em animais e cloroplastos em plantas, denominados “genomas extranucleares” (ZAHA *et al.*, 1996). O DNA de cloroplastos e mitocôndrias é constituído de moléculas circulares, duplas, apresentando cerca de 120-220 kb e 15-17 kb, respectivamente (BROWN, 1983; PALMER, 1985 e 1987, PARKER *et al.*, 1998). O DNA mitocondrial animal codifica aproximadamente 5% de toda maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria, codificando RNAs mensageiros para proteínas envolvidas diretamente no processo de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, as subunidades ribossômicas, os 22 RNAs transportadores e uma região não codificadora conhecida como A+T nos invertebrados e como D-loop nos vertebrados, que contém o controle da replicação e transcrição desse genoma (ARIAS & INFANTE-MALACHIAS, 2001). Ao contrário do DNA nuclear de herança biparental, o DNA de organelas encontra-se no citoplasma e, portanto, apresenta herança uniparental. Suas seqüências são extremamente conservadas. Assim, comparações de genótipos nucleares e mitocondriais podem ajudar a reconhecer indivíduos híbridos, acasalamentos preferenciais e efeitos estocásticos sobre variantes para as quais o taxón ancestral era polimórfico, podendo-se gerar árvores filogenéticas (SUNNUKCS, 2000).

Segundo PEREIRA (2000), o DNA mitocondrial em diferentes organismos tem sido amplamente utilizado para estudos populacionais. O autor também afirma que a região controle do genoma mitocondrial é freqüentemente usada em estudos de populações devido à alta variabilidade das seqüências nucleotídicas, e genes codificantes de proteínas tais como citocromo b (Cyt b) são geralmente usados para análises filogenéticas. Além disso, outras regiões do DNA

mitocondrial animal podem exibir considerável variação intra e entre populações (PARKER *et al.*, 1998).

Esta variação intra ou interpopulacional pode ser estudada por meio da técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Nesta técnica, as variações (polimorfismos) apresentadas são baseadas na aceitação de que o sítio de corte de uma mesma enzima encontra-se em diferentes pontos do DNA de indivíduos diferentes. Assim, não é necessário o conhecimento prévio das seqüências de DNA a serem utilizadas e isto constitui uma das vantagens observadas neste método. As variações são explicadas pela diferença entre os tamanhos dos fragmentos gerados pela digestão com enzimas escolhidas pela especificidade dos seus sítios de corte (chamadas enzimas de restrição). Se há a segregação Mendeliana de tais fragmentos, conclui-se que eles representam um loco de RFLP e, portanto, podem ser utilizados como marcadores genéticos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Resumidamente, a técnica consiste em submeter o DNA de interesse à ação de enzimas de restrição, gerando fragmentos de diversos tamanhos (RFLP), que são separados em eletroforese em gel de agarose ou de acrilamida.

Uma característica importante do marcador RFLP é sua expressão codominante, que o torna vantajoso para estudos de segregação alélica, estimativa da variabilidade genética populacional e geração de árvores filogenéticas. O uso mais amplo das enzimas de restrição nos estudos de população tem sido o estudo da diversidade alélica e diferenciação de populações através do DNA mitocondrial, em que freqüências alélicas podem ser estimadas pela presença ou ausência de sítios de restrição entre os indivíduos (PARKER *et al.*, 1998). Grandes moléculas como o DNA nuclear não podem ser analisadas pelo uso direto de enzimas de restrição devido à grande quantidade de sítios de clivagem enzimática, gerando padrões de bandas de difícil interpretação.

A caracterização molecular baseada no DNA mitocondrial tem se convertido em técnica amplamente utilizada para o estudo da diferenciação de subespécies e raças de *Apis mellifera* (SMITH *et al.*, 1991; GARNERY *et al.*, 1992, 1995; DE

LA RÚA *et al.*, 1998, 1999, 2001). Além disso, a análise do DNA mitocondrial pode contribuir para a diferenciação das populações de abelhas Africanizadas e, conseqüentemente, para o conhecimento da estrutura genética destas populações. Essa molécula circular e de herança materna permite caracterizar a abelha rainha através das operárias e, assim, toda a colméia, podendo ser considerada um marcador de toda a colônia (CÁNOVAS *et al.*, 2002).

Uma controvérsia sobre a contribuição relativa de *Apis mellifera scutellata* e das diferentes subespécies Europeias na composição genética das abelhas Africanizadas tem sido apresentada como a aparente discordância dos dados de DNA mitocondrial (SMITH *et al.*, 1989; HALL & MURALIDHARAM, 1989; SHEPPARD *et al.*, 1991 a,b) e os alozímicos ou morfológicos (LOBO *et al.*, 1989; DEL LAMA *et al.*, 1988; SHEPPARD *et al.*, 1991 a,b). Os caracteres alozímicos e morfológicos analisados indicam que perto de 20 a 30% dos genes de populações estabelecidas de abelhas Africanizadas são do ancestral Europeu (LOBO *et al.*, 1989; DEL LAMA *et al.*, 1990), mas, os haplótipos de DNA mitocondrial para essas populações são atribuídos quase exclusivamente a *Apis mellifera scutellata* (SMITH *et al.*, 1989; HALL & MURALIDHARAM, 1989; SHEPPARD *et al.*, 1991b). A possível explicação da baixa freqüência de haplótipos Europeus do DNAm encontrado nas populações de abelhas Africanizadas é devido ao fitness assimétrico dos híbridos de linhagens Europeias e Africanas.

Outro dado muito interessante, apresentado por SHEPPARD *et al.*, (1999), mostra que o DNAm das colônias coletadas na Argentina são compostas de uma mistura de haplótipos derivados de subespécies de abelhas do norte e sul do Saara, África. Cerca de 25% do DNAm Africano encontrado nas colônias Africanizadas expressa um padrão encontrado em abelhas do Norte da África (*Apis mellifera intermissa*, do Marrocos), mas não em abelhas do Sub-Saara (*Apis mellifera scutellata*). Resultados similares foram encontrados por FERREIRA (2002), analisando abelhas Africanizadas de 29 localidades do Brasil. Esses dados podem explicar as diferenças encontradas entre os estudos baseados em análises alozímicas, morfométricas e do DNAm, reportados até agora.

1.3.4 Microsatelites - No genoma de diversas espécies ocorrem seqüências repetitivas organizadas em tandem cujos tamanhos podem variar. São chamados VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) e representam locos individuais onde alelos são constituídos por repetições em tandem que variam no número de unidades do motivo (NAKAMURA *et al.*, 1987). As seqüências denominadas DNA microsatélites têm unidades de repetição de 1 a 5 nucleotídeos (SCHLÖTTERER & PEMBERTON, 1998). Estes marcadores, também chamados “simple sequence repeats (SSRs)”, são hipervariáveis, co-dominantes e revelam variações de comprimento entre os alelos (PARKER *et al.*, 1998; SUNNUCKS, 2000). Em estudos de populações, o uso de VNTRs é considerado um dos métodos mais efetivos para avaliar o nível de variabilidade genética em casos de reduções do número de alelos e de heterozigidade (FERGUNSON *et al.*, 1995). A metodologia de utilização de microsatélites baseia-se na amplificação por PCR das seqüências simples repetidas utilizando-se um par de oligonucleotídeos iniciadores (primers) de seqüências complementares àquelas que as flanqueiam.

Tendo em vista a expressão co-dominante e o multialelismo, os marcadores microsatélites são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo, ideais para mapeamento genético e físico de genomas, identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os polimorfismos nucleares e de DNA mitocondrial (HALL, 1986, 1990; SMITH, 1988; SMITH *et al.*, 1989; HALL & MURALIDHARAM, 1989; OLDROYD *et al.*, 1992; SHEPPARD *et al.*, 1991 a,b; CLARKE *et al.*, 2001) e mais recentemente, os microsatélites (ESTOUP *et al.*, 1993, 1994; FRANCK *et al.*, 1998) são marcadores moleculares muito utilizados na genética populacional de *A. mellifera* considerando ainda os baixos níveis de variação nos locos enzimáticos conhecidos para a espécie.

A utilização dos microsatélites em *Apis mellifera* tem fins diversos, seja para a caracterização de zangões numa área de congregação (BAUDRY, *et al.*,

1998), caracterização de áreas de congregação de colônias (OLDROYD, *et al.*, 1995; NEUMANN, *et al.*, 1999a), freqüências de paternidade e/ou maternidade (HABERL & TAUTZ, 1999; NEUMANN *et al.*, 1999b), historia evolutiva de populações ou subespécies (FRANCK, *et al.*, 2000), caracterização de machos diplóides originados pela técnica de inseminação artificial (POLACZEK, *et al.*, 2000), migração de colônias (NEUMANN *et al.*, 2000a), reconhecimento de subfamílias dentro de uma colônia (ARNOLD *et al.*, 1996; BEYE *et al.*, 1998; ESTOUP *et al.*, 1994; NEUMANN *et al.*, 2000b), evolução da poliandria em insetos sociais (FRANCK *et al.*, 1999), introgressão de genes de uma subespécie em outra no processo de Africanização (CLARKE, *et al.*, 2002) ou simplesmente, em estudos de diversidade e da estrutura genética de populações naturais ou filogeografia (FRANCK *et al.*, 1998, 2001; ESTOUP *et al.*, 1995a, b; ROWE *et al.*, 1997).

Recentemente, SOLIGNAC *et al.* (2003) publicaram a seqüência principal de 552 microsátélites com seus respectivos iniciadores e o comprimento dos alelos. Este fato proporciona uma excelente ferramenta de trabalho para analisar diferentes populações ou subespécies de *Apis mellifera*, tendo diferentes alternativas, de acordo com o objetivo do trabalho.

2. PROPOSIÇÃO E JUSTIFICATIVA

Poucos insetos receberam tanta atenção quanto *Apis mellifera*, pois além de sua importância econômica na produção de mel, cera, geléia real, veneno e polinização, proporciona um excelente modelo de estudo do processo de hibridação devido à sobreposição de subespécies pela migração ou introdução de abelhas em algumas regiões do mundo. Como visto anteriormente, a partir de 1957, ocorreu um processo de hibridação no continente Americano entre as abelhas Européias introduzidas anteriormente e as Africanas recém traídas. Com o processo de “Africanização”, surgiu a necessidade de reconhecer os híbridos e seu grau de mistura racial, levando ao desenvolvimento de métodos capazes de caracterizar as diferentes subespécies que contribuíram para a formação das populações de abelhas Africanizadas.

A biologia molecular tem sido a técnica preferencialmente escolhida para os estudos de Genética de Populações e que tem acumulado avanços importantes, gerando técnicas cada vez mais precisas para o exame de segmentos de DNA, em adição à descoberta de variados marcadores moleculares aplicáveis aos mais diversos problemas encontrados no estudo de populações e às análises estatísticas que permitem desde a estimativa do grau de variabilidade genética de uma dada população à construção de árvores filogenéticas, relacionando espécies próximas e elucidando questões de parentesco. Dentre os métodos utilizados, as análises morfométricas e os polimorfismos aloenzimáticos têm revelado a contribuição de linhagens Européias e Africanas no híbrido formado, com elevado predomínio do componente Africano (*scutellata*).

Desde a chegada da abelha Africanizada à Colômbia em 1978, esparsos são os estudos populacionais que demonstram o grau de hibridação entre os enxames Africanizados originados no Brasil e as abelhas residentes neste país. Além disso, a Colômbia apresenta uma grande biodiversidade, partindo de ecossistemas Andinos até desérticos, proporcionando diferentes habitats, os quais

podem ser explorados em diferentes graus pelas abelhas Africanizadas.

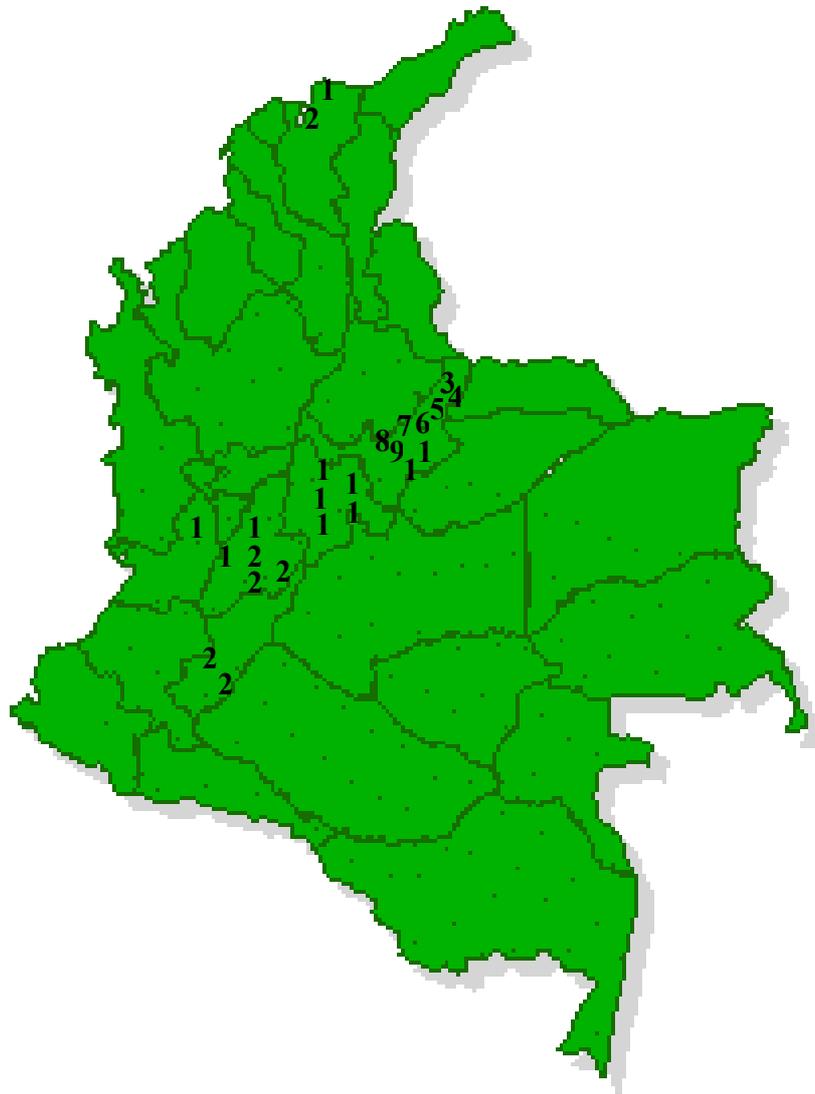
Este trabalho teve como objetivo central estudar a estrutura genética das populações de *Apis mellifera* presentes hoje na Colômbia, utilizando marcadores nucleares. Através de análises alozímicas, associadas à análise do DNA mitocondrial, este trabalho objetivou determinar o grau de variabilidade genética interpopulacional e a composição racial destas populações, comparando-as com as exibidas pelas populações do Brasil.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

O material analisado foi constituído de operárias adultas de *Apis mellifera* provenientes da Colômbia. As amostras foram coletadas em 24 localidades de 6 estados diferentes do país, num total de 319 colônias, como mostra a Figura 02. Foi realizada uma coleta preliminar de 31 colônias, provenientes de 5 localidades, ao final de 2002 e início de 2003. Posteriormente, foi feita uma segunda coleta, completando as 24 localidades amostradas, realizada ao final de 2003 e início de 2004.

As amostras foram obtidas pelo Professor Dr. Guillermo Salamanca G. da Facultad de Ciências Básicas de la Universidad Del Tolima (Ibagué, Colômbia) e pelo Professor Dr. Jorge Tello da Facultad de Ciencias da Universidad Nacional de Colombia, (Bogotá, Colômbia), respectivamente. As amostras foram mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e posteriormente trazidas ao Brasil em container contendo gelo seco. Após a chegada a São Carlos, as amostras foram estocadas a -20°C até o momento da análise.



- | | | |
|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 1. Sierra Nevada (Magdalena) | 9. Duitama (Boyacá) | 17. La Union (Valle del C.) |
| 2. Parque Tairona (Magdalena) | 10. Nobsa (Boyacá) | 18. Anzoategui (Tolima) |
| 3. Tutazá (Boyacá) | 11. Tibasosa (Boyacá) | 19. Anaimé (Tolima) |
| 4. Paz del Río (Boyacá) | 12. Pacho (Cundinamarca) | 20. Ibagué (Tolima) |
| 5. Belén (Boyacá) | 13. Guasca (Cundinamarca) | 21. Coello (Tolima) |
| 6. Cerinza (Boyacá) | 14. Mosquera (Cundinamarca) | 22. Rovira (Tolima) |
| 7. Santa Rosa de Viterbo (Boy) | 15. Suba (Cundinamarca) | 23. Teruel (Huila) |
| 8. Paipa (Boyacá) | 16. Fusagasuga (Cundinamarca) | 24. Rivera (Huila) |

FIGURA 02. Distribuição das localidades amostradas na Colômbia. Os departamentos aos quais pertence as diferentes localidades são indicados em parênteses.

3.2 Métodos

3.2.1 Análise aloenzimática – Foram analisadas 150 colônias, provenientes de 16 localidades diferentes da Colômbia. Extratos de mesossoma de seis operárias adultas de cada colônia foram obtidos utilizando-se 200 µl de 2-mercaptoetanol 0,2%, seguidos de centrifugação do macerado a 2500 rpm por 15 minutos, à temperatura ambiente. Os extratos de cada amostra foram então embebidos em papel de filtro (Whatman n. 03, 5 x 7 mm) e aplicados no gel. Os fenótipos de Mdh-1, Hk-1, Est-1, Est-3, Est-5 e Pgm-1 foram estabelecidos em eletroforese horizontal em gel de amido de milho (Penetrose 30TM) a 14%, preparado em tampão tris-citrato pH 7.5 (diluição de 10x para o gel), de acordo com procedimentos descritos anteriormente (DEL LAMA *et al.*, 1985a, 1988, 1990).

Finda a corrida eletroforética a uma corrente constante de 5mA/cm por 5 horas, o gel foi cortado horizontalmente e as fatias submetidas à coloração histoquímica para revelação da atividade enzimática (DEL LAMA *et al.*, 1985, 1988, 1990).

3.2.2 Polimorfismos do DNA mitocondrial

Foram analisadas 319 colônias, provenientes de 24 localidades da Colômbia, para os locos 16S e região intergênica CO I – CO II do DNA mitocondrial. A análise do loco *COI* para as enzimas de restrição *Taq I* e *Bcl I* envolveu 218 colônias das mesmas 24 localidades.

Para a determinação dos padrões do DNA mitocondrial de cada colônia foi necessário, inicialmente, a extração do DNA total. Esta extração foi feita a partir do mesossoma de operárias adultas (uma por colônia) de acordo com o método de clorofórmio-etanol proposto por SHEPPARD & MCPHERON (1991). A este protocolo original foi adicionado um passo de incubação do macerado por uma hora a 65°C na presença de 10µl de proteinase K (10 mg/ml). O passo seguinte foi a utilização de uma alíquota da solução de DNA para amplificação via PCR, de

regiões do DNA mitocondrial utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos:

- Região intergênica CO I – CO II - sítios *Dra* I (GARNERY *et al.*, 1992)
E₂: 5' - GGCAGAATAAGTGCATTG– 3'
H₂: 5'- CAATATCATTGATGACC – 3'
- Loco 16S - sítios *Dra* I (HALL & SMITH, 1991)
F: 5' - TTTTGTACCTTTTGTATCAGGGTTG – 3'
R: 5'- CTATAGGGTCTTATCGTCCC – 3'
- Loco COI - sítios *Taq* I, *Bcl* I (HALL & SMITH, 1991)
F: 5' - TTAAGATCCCCAGGATCATG – 3'
R: 5'- TGCAAATACTGCACCTATTG – 3'

As reações de amplificação ocorreram em volume final de 25 µl, em solução contendo 250 mM de cada dNTP, 1 U de *Taq* Polymerase Promega, 25 mM MgCl₂, 0.8 µM de cada primer para a amplificação da região intergênica COI - COII (sítios *Dra* I) ou 1.0 µM para o loco 16S (sítios *Dra* I) e 1.0 µl da solução de DNA total, e água esterilizada até completar o volume final desejado. Os tubos de reação foram submetidos a 30 ciclos de amplificação otimizados em torno de um ciclo básico (1 min a 90°C, 45s a 54°C, 2 min a 62°C) para amplificação dos fragmentos, correspondentes à região intergênica COI - COII e 16 S. Para cada reação de amplificação foi utilizado um controle, onde era aplicado 1µl de H₂O ao invés de DNA.

Uma alíquota de 1 µl da mistura de PCR foi então submetida à eletroforese em géis de poliacrilamida, em condições não desnaturantes, a concentrações de 7% para estimativa do tamanho do fragmento correspondente à região intergênica COI - COII. A digestão pelas nucleases foi realizada adicionando-se 2 µl do amplificado em mistura de reação contendo 2 U, aproximadamente, de cada

enzima de restrição, em tampão apropriado, totalizando 20 µl de solução. Após agitação, as misturas foram submetidas à digestão pelas nucleases por 4 horas a 37°C ou 60°C (*Taq I*). Como controle de digestão, foi utilizada uma alíquota do amplificado em cada gel.

A análise dos fragmentos gerados pelas endonucleases foi conduzida em géis de poli-acrilamida a 7% para *Bcl I* e 12% para *Dra I* e *Taq I* (BIO RAD PROTEAN II xi Cell). Os fragmentos amplificados foram visualizados no gel através de coloração por prata, feita da forma descrita a seguir. Para a fixação dos fragmentos, o gel foi imerso por sete minutos em 200 ml de uma solução de etanol a 10% e ácido acético a 0,5% (solução fixadora). Em seguida, o gel foi lavado três vezes em água. Então, trocou-se novamente a solução fixadora, repetindo-se tal procedimento mais uma vez. A impregnação com prata foi realizada em 200 ml de nitrato de prata (AgNO₃) a 0.15% por 20 minutos. Em seguida, o gel foi lavado 3 vezes com muita água corrente. O gel foi, então, colocado em 200 ml de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 1.5% + 2 ml de formaldeído (SANTOS *et al.*, 1993). O processo de desenvolvimento da imagem foi controlado visualmente. Depois do aparecimento dos fragmentos (“alelos”), o gel foi lavado e recolocado na solução fixadora. Em seguida, o gel foi lavado e colocado em glicerol, onde permaneceu por 20 minutos. Posteriormente, cada uma de suas faces foi envolta em papel celofane (previamente umedecido em água por 20 min). Neste passo, é muito importante que não exista bolhas de ar entre o papel e o gel. Então, o gel foi disposto em secador de gel (Bio Rad Gel Dryer, Model 583), o qual encontrava-se ligado a uma bomba de vácuo. Depois de uma hora, o gel estava seco e plastificado. A análise dos padrões gerados por cada nuclease foi realizada separadamente para cada região do genoma mitocondrial e, subseqüentemente, em conjunto, de modo a distinguir o maior número de haplótipos mitocondriais.

3.2.3 Microsatélites – Nas análises de microsatélites foram amostradas 31 colônias, provenientes de 5 localidades diferentes da Colômbia (primeira coleta). A diferenciação genética entre as populações estudadas foi estimada a partir dos

locos microsátélites *RJP57-1* e *A43* de acordo com o protocolo descrito por BEYE *et al.* (1998) e ESTOUP *et al.* (1995), respectivamente. O primeiro gene codifica uma das principais proteínas que compõem a geléia real e o segundo ainda não teve sua possível função gênica estabelecida.

A análise destes dois marcadores envolveu, inicialmente, a extração do DNA total, feita a partir do mesossoma de operárias adultas (duas por colônia) de acordo com o método de clorofórmio-etanol proposto por SHEPPARD & MCPHERON (1991). Após a extração, as amostras foram ressuspensas em 50µl de solução TE 1X. Para a realização das amplificações destes locos via PCR, as reações ocorreram em um termociclador BIORAD, modelo Gene Cyclor.

A mistura de reação para o microssatélite *A43* foi assim preparada: 2,5 µl tampão 10X + 17.05 µl H₂O + 2.0 µl P1+P2 500nM cada + 0.75 µl DNTPs 250 µM cada + 1.5 µl MgCl₂ 25 mM + 0,2 µl Taq DNA polimerase Promega (5U/µl). A mistura de reação de PCR para o microssatélite *RJP57-1* foi assim constituída: 2,5 µl tampão 10X + 14.3 µl H₂O + 2.0 µl P1+P2 500nM cada + 2.5 µl DNTPs 250 µM cada + 2,5 µl MgCl₂ 25 mM + 0,2 µl Taq DNA polimerase (5U/µl). Alíquotas (24 µl) desta mistura foram dispostas em cada tubo eppendorf de 0.2 ml e, em seguida, 1 µl de DNA de cada amostra foi transferido para estes tubos, resultando em volume final da reação de 25 µl. Oligonucleotídeos iniciadores e condições específicas de amplificação para os dois locos são apresentados no quadro abaixo:

Loco	Primers	Condições de PCR	
		Temperatura	MgCl ₂ (mM)
A43	5'CACCGAAACAAGATGCAAG3' 5'CCGCTCATTAAGATATCCG3'	55	1.5
*RJP57-1	5'TGTAGATGACTTAATGAGAAACAC3' 5'ATGTAATTTTGAAGAATGATGAACTTG3'	54	2.5

* Condições de PCR para *A43* e *RJP57-1* segundo ESTOUP *et al.* (1995a) e BEYE *et al.* (1998), respectivamente.

As corridas eletroforéticas foram feitas em gel de poliacrilamida a 7% em condições desnaturantes (presença de uréia), 20cm x 20cm, com volume final igual a 40 ml e capacidade para 20 amostras (BIO RAD PROTEAN II xi Cell), conforme o protocolo abaixo:

Acrilamida 40%	7,0 ml
TBE 10x	4,0 ml
Uréia	16,8g
Persulfato de Amônia	0,05 g
TEMED	20,0 µl
H2O, qsp	40 ml

Após a preparação do gel, 5 µl de indicador de corrida (azul de bromofenol) foi misturado a 5 µl do DNA amplificado. Em seguida, todas as 19 amostras foram transferidas para o gel, utilizando-se um dos canais para o marcador de peso molecular. O gel foi colocado em cuba contendo tampão TBE 1X, ligado a uma fonte estabilizadora de tensão durante 3h30min a uma voltagem de 200V e corrente de 50 mA.

A coloração dos géis foi feita com prata, como descrita anteriormente (SANTOS *et al.*, 1993).

Os “alelos” de cada loco foram caracterizados em função dos diferentes tamanhos dos fragmentos gerados (de acordo com o número de repetições do motivo), denominados de acordo com a mobilidade anódica, sendo o de maior mobilidade denominado de **A**, e assim sucessivamente. Posteriormente, foi preparada uma mistura dos diferentes tipos alélicos encontrados em cada um desses géis, os quais foram submetidos a uma nova corrida eletroforética, possibilitando confrontar os diversos alelos observados em cada um dos géis.

3.3 Estimativa de Parâmetros Genéticos

3.3.1 Freqüência Gênica

Através da contagem direta dos fenótipos de sistemas codominantes, foram determinados os genótipos e as freqüências alélicas, tanto para os dados diplóides como haplóides.

3.3.2 Teste de Qui-quadrado de Equilíbrio (X^2)

O teste de qui-quadrado de aderência foi aplicado para verificar se as freqüências genotípicas observadas estavam de acordo com as freqüências esperadas segundo o modelo de equilíbrio genético de Hardy-Weinberg. O nível de significância foi de 5% e o número de graus de liberdade foi calculado pelo número de classes fenotípicas menos o número de informações necessárias ao cálculo dos valores esperados (BEIGUELMAN, 1977).

O valor de qui-quadrado foi calculado pelo programa POPGENE W32 *version 1.31* (YEH *et al.*, 1999).

3.3.3 Teste de Homogeneidade

O teste de homogeneidade foi realizado para verificar se as amostras de abelhas da Colômbia poderiam ser consideradas homogêneas quanto às suas freqüências alélicas. Os testes foram feitos, loco a loco, através do programa POPGENE W32.

3.3.4 Desequilíbrio de ligação

Para verificar a existência de prováveis associações alélicas preferenciais nas gametas formados foram efetuadas estimativas de desequilíbrio de ligação (D_{AB}) para pares de alelos dos locos *Mdh-1* e *Hk-1*, segundo WEIR (1979), calculado pelo programa computacional POPGENE W32.

3.3.5 Estatística F de WRIGHT

Com a utilização do programa computacional POPGENE W32, foram estimados os coeficientes da estatística-F de Wright loco a loco, que permite uma análise da estrutura das populações estudadas. De acordo com esta estatística, o coeficiente F_{IS} mede a redução da heterozigosidade de um indivíduo devida ao acasalamento não aleatório dentro de uma subpopulação. A subdivisão da população pode ter como efeito a redução na heterozigosidade devido à deriva genética; este efeito foi medido pelo índice de fixação (F_{ST}). Além disso, foi estimado o índice F_{IT} que mede a variabilidade genética individual em relação à população total. Este coeficiente estima a redução da variabilidade devida aos acasalamentos preferenciais dentro das subpopulações (F_{IS}) e à subdivisão da população (F_{ST}). A significância dos coeficientes F_{ST} e F_{IS} e seus respectivos graus de liberdade foram estimados segundo NEI (1977) e WORKMAN & NISWANDER (1970), respectivamente.

3.3.6 Teste de Correlação Linear

Foi aplicado teste de correlação linear para verificar se há associação entre as frequências dos alelos de *Mdh-1* e *Hk-1* nas diferentes populações e a altitude do local de onde estas amostras procediam. Este teste foi feito utilizando o programa BioEstat 2.0 (AYRES *et al.*, 2000).

3.3.7 Distância Genética

Estimativas de distância genética entre populações foram realizadas utilizando-se o programa POPGENE W32. Para tal, dois métodos foram empregados e comparados: NEI (1972) e NEI (1978). Os valores encontrados foram utilizados para a construção dos respectivos dendrogramas. Estas estatísticas propostas por Nei utilizam as diferenças de frequências alélicas para estimar o número médio das diferenças de códons por loco. Esta medida (D) está baseada na identidade dos genes nas populações que estão sendo comparadas.

4. RESULTADOS

4.1 Análise Aloenzimática

Dentre os locos enzimáticos analisados, *Est-1*, *Est-3*, *Est-5* e *Pgm-1* foram pouco informativos. A maioria dos indivíduos analisados apresentou os fenótipos usualmente observados nas populações Africanizadas, *Est-1* F, *Est-3* M, *Est-5* S e *Pgm-1* F. Os fenótipos eletroforéticos *Est-1* FS, *Est-3* FM, *Est-5* SN e *Est-5* N e *Pgm-1* FS e *Pgm-1* FM foram observados em poucos indivíduos, resultando em freqüências muito baixas destes alelos (ver Tabela 1). Diferentemente destes marcadores, os fenótipos dos locos *Hk-1* e *Mdh-1* mostraram-se adequados para a caracterização e possível diferenciação destas populações. Os fenótipos de *Hk-1* e *Mdh-1* observados nas amostras de cada localidade estudada estão apresentados na Tabela 2. Foram observadas três variantes de *Hk* em todas as amostras. Duas variantes já descritas, *Hk-1*¹⁰⁰ (ou F) e *Hk-1*⁸⁷ (ou S) e uma terceira recentemente detectada, *Hk-1*⁹² (M). Os diferentes fenótipos observados estão ilustrados na Figura 3. A freqüência do alelo 100 variou entre 0.426 a 0.771, enquanto a do alelo 87 variou entre 0.21 a 0.50. O alelo 92, recentemente detectado neste laboratório, apresentou uma freqüência entre 0.021 a 0.241. As freqüências dos alelos de *Hk-1* nas amostras analisadas, comparadas através de qui-quadrado de homogeneidade, mostraram-se heterogêneas ($\chi^2_{\text{Hom}} = 163,6$; $P < 0.0001\%$) e, portanto, as populações não podem ser consideradas como uma população única para este marcador. Além disso, foi observado que somente a população de Guasca não se encontrava na condição de equilíbrio genético segundo o modelo de Hardy-Weinberg para *Hk-1* para um nível de significância de 5% (ver Tabela 3). Três variantes eletroforéticas de *Mdh* foram observadas neste trabalho: as variantes *Mdh-1*¹⁰⁰ (F), *Mdh-1*⁸⁰ (M) e *Mdh-1*⁶⁵ (S). As possíveis combinações destas variantes, distribuídas nos diferentes fenótipos, podem ser observadas na Figura 4. As variantes 100 e 80 foram encontradas em todas as amostras. A primeira, característica de *Apis mellifera scutellata*, apresentou

freqüência mais alta em quase todas as populações, variando entre 0.313 a 0.958, enquanto que a segunda, característica de *Apis mellifera mellifera*, apresentou freqüência variável entre 0.042 a 0.677. A variante 65 (S), característica de *Apis mellifera ligustica*, foi observada em quase todas as amostras, com exceção de Rovira e Sierra Nevada, com freqüências muito baixas (menores que 9%). O qui-quadrado de homogeneidade observado foi de 314,4 ($P < 0,001$) evidenciando que as freqüências alélicas de *Mdh-1* são heterogêneas entre as populações, similarmente ao observado para *Hk-1*. Foi observado que somente as populações de Guasca e Tierra Firme não se encontravam na condição de equilíbrio genético de acordo com o modelo de Hardy-Weinberg para o loco *Mdh-1* (Tabela 3). As freqüências dos alelos de *Mdh-1* e *Hk-1* foram associadas às latitudes (Figuras 5 e 6, respectivamente) e altitudes (Figuras 7 e 8, respectivamente) das regiões amostradas com o propósito de verificar variação clinal. Os dados evidenciaram um gradiente altitudinal para os fenótipos de *Mdh-1* (cf. Figura 7), mas não foi observada variação latitudinal para estes locos nestas populações, corroborado pela distancia Genética de Nei, onde não evidencia uma distribuição geográfica das localidades. Empregando o programa POPEGENE (YEH *et al.*, 1999) foram estimados os valores da estatística-F de WRIGHT, Fis, Fst e Fit (Tabela 4) para os locos *Mdh-1* e *Hk-1* e suas respectivas significâncias. Para estes locos, os valores de Fis não foram significativos ($\chi^2 = 2,70$ GL= 30 para *Hk-1*; $\chi^2 = 3,13$ GL= 30 para *Mdh-1*). Os valores de Fst mostraram-se altamente significativos ($\chi^2 = 283,4$ e GL= 30 para *Hk-1*; $\chi^2 = 1156,9$ e GL= 30 para *Mdh-1*). A verificação da ocorrência de desequilíbrio de ligação entre estes locos para todas as populações evidenciou que somente a amostra proveniente de Terra Firme está em desequilíbrio de ligação (LD = 1; $P < 0,0408$). A partir do valor do Fst, o fluxo gênico estimado (NEI, 1987) entre as populações da Colômbia, como esperado, foi mais elevado para o loco *Hk-1*, apresentando um numero de migrantes (Nm) igual a 6.09 indivíduos para um N amostral de 1798, comparado ao valor estimado para o loco *Mdh-1* de um Nm = 2,48 indivíduos para um tamanho amostral de 1802 (Tabela 5).

TABELA 1. Fenótipos observados e frequências alélicas estimadas para os locos *Est-1*, *Est-3*, *Est-5* e *Pgm-1* em operárias adultas de 150 colônias de *Apis mellifera* provenientes de 16 localidades da Colômbia (n = número de indivíduos).

locos	fenótipos	n	alelos	freqüência
<i>Est-1</i>	FF	794	F	0,993
	FS	11	S	0,007
<i>Est-3</i>	MM	803	M	0,996
	MS	7	S	0,004
<i>Est-5</i>	SS	787	S	0,987
	SN	17		
	NN	2	N	0,013
<i>Pgm-1</i>	FF	848	F	0,978
	FS	28	S	0,015
	FM	14	M	0,007

TABELA 2. Fenótipos de Mdh-1 e Hk-1 observados após eletroforese em gel de amido a 14%, a partir de mesossoma de operárias adultas de *Apis mellifera*, coletadas em diferentes regiões da Colômbia.

Localidade	N. Colôn	Fenótipos da <i>Mdh-1</i>						Tot	Fenótipos da <i>Hk-1</i>						Tot
		F	FM	FS	M	S	SM		F	FS	FM	S	M	SM	
Sierra Nev.	5	20	7	1	2			30	10	11	7	1	1		30
Guasca	16	16	53	4	20	1	2	96	42	43	9	1		1	96
Paz del R *	8	6	18		23		1	48	9	26		11			46
Mosquera	12	24	31		15		2	72	45	20	1	4		2	72
Anaime	20	62	52	1	5			120	29	49	8	24	3	7	120
Anzoategui	4	19	1	4				24	6	14	2			2	24
Teruel	9	37	12	3			2	54	7	21	11	4	5	6	54
El salado	20	79	26	10	5			120	36	58	10	9	1	6	120
Ibagué *	5	22	7		1			30	6	18		6			30
Tierra Firme	8	34	8	1	1	4		48	18	19	4	6	1		48
Acopi	10	39	16	3	2			60	20	17	8	10	1	4	60
Rovira *	8	37	8	2				47	13	22		13			48
Coello	12	46	18	2	4		2	72	18	30	12	5	1	6	72
Coello *	6	26	9		1			36	11	16		9			36
Rivera	3	15	3					18	7	5	1	5			18
Parq. Tair.	4	22	2					24	7	9	3	2	1	2	24
Total	150	504	271	31	79	5	9	899	284	378	76	110	14	36	898

* Primeira coleta (2002/2003)

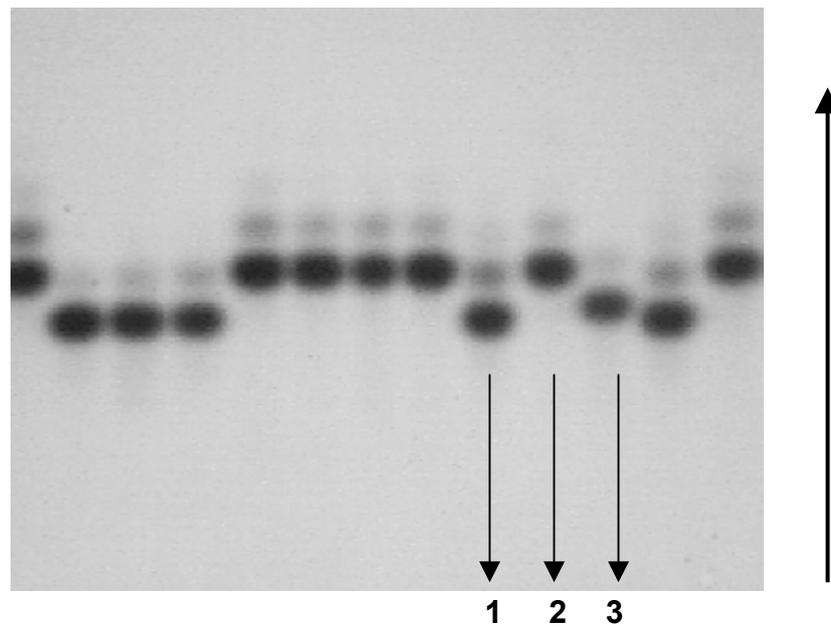


FIGURA 03. Padrões de Hk-1 obtidos após eletroforese em gel de amido 14%, observados em amostras de *Apis mellifera* da Colômbia. As amostras com os números de 1 a 3 correspondem aos fenótipos SS, FF e MM, respectivamente.

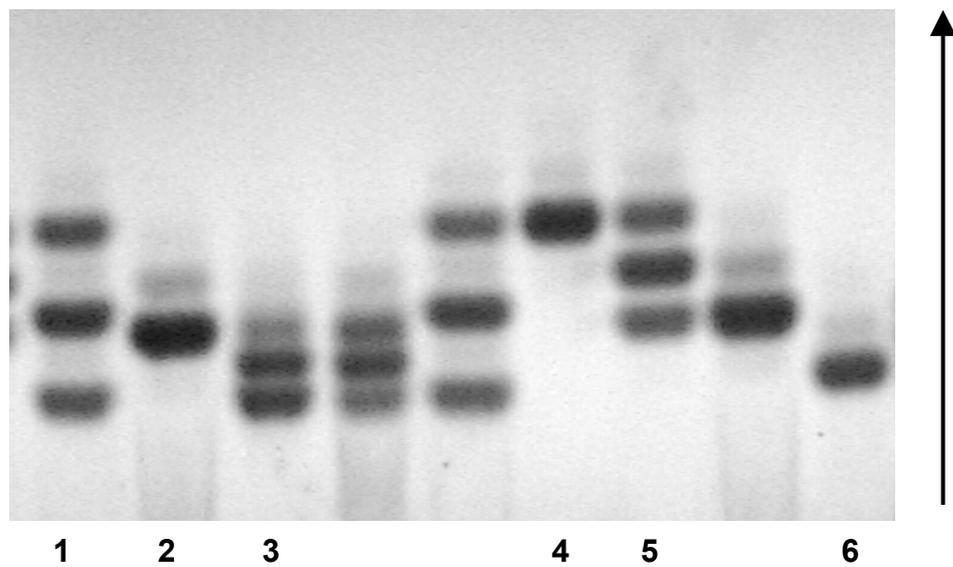


FIGURA 04. Padrões de *Mdh-1* obtidos após eletroforese em gel de amido 14% observados em amostras de *Apis mellifera* da Colômbia. As amostras com os números de 1 a 6 correspondem aos fenótipos FS, MM, SM, FF, FM, e SS, respectivamente.

TABELA 3. Freqüências dos alelos de *Mdh-1* e *Hk-1* estimadas em populações de *Apis mellifera* de diferentes regiões da Colômbia e valores de χ^2 para verificação de equilíbrio genético nestos locos de acordo com o modelo de Hardy-Weinberg.

Localidade	N. Colônias	Altitude (Msnm)	Freq Alel. <i>Mdh-1</i>			χ^2	Freq Alel. <i>Hk-1</i>			χ^2
			F	M	S		F	S	M	
Sierra Nev.	5	3000	0.8000	0.1833	0.0167	1,917	0.6333	0.2167	0.1500	3,692
Guasca	16	2800	0.4635	0.4948	0.0417	<u>9,171</u>	0.7083	0.2396	0.0521	<u>9,128</u>
Paz del R *	8	2650	0.3125	0.6771	0,0104	1,269	0.4783	0.5217		0,680
Mosquera	12	2600	0.5486	0.4375	0.0139	3,360	0.7708	0.2083	0.0208	4,654
Anaime	20	1850	0.7375	0.2583	0.0042	2,382	0.4792	0.4333	0.0875	6,282
Anzoategui	4	1600	0.8958	0.0208	0.0833	0,254	0.5833	0.3333	0.0834	5,654
Teruel	9	1600	0.8241	0.1296	0.0463	4,050	0.4259	0.3333	0.2407	5,720
El salado	20	1200	0.8083	0.1500	0.0417	4,612	0.5833	0.3417	0.0750	4,573
Ibagué *	5	1000	0.8438	0.1562		0,155	0.5000	0.5000		0,381
Tierra Firme	8	1100	0.8021	0.1042	0.0938	<u>41,89</u>	0.6146	0.3333	0.0521	0,795
Acopi	10	900	0.8083	0.1667	0.0250	0,763	0.5417	0.3417	0.1167	3,295
Rovira *	8	850	0.8936	0.0851	0,0213	0.593	0.4896	0.5104		0.128
Coello	12	400	0.7778	0.1944	0.0278	3,889	0.5417	0.3194	0.1389	2,300
Coello *	6	400	0.8472	0.1528		0.089	0.5278	0.4722		0.539
Rivera	3	400	0.9167	0.0833		0,096	0.5556	0.4167	0.0278	4,026
Parque Tair.	4	1-15	0.9583	0.0417		0,022	0.5217	0.3261	0.1522	0,976
Total	150		0,7286	0,2436	0,0277		0,5679	0,3554	0,0768	

* Primeira coleta (2002/2003)

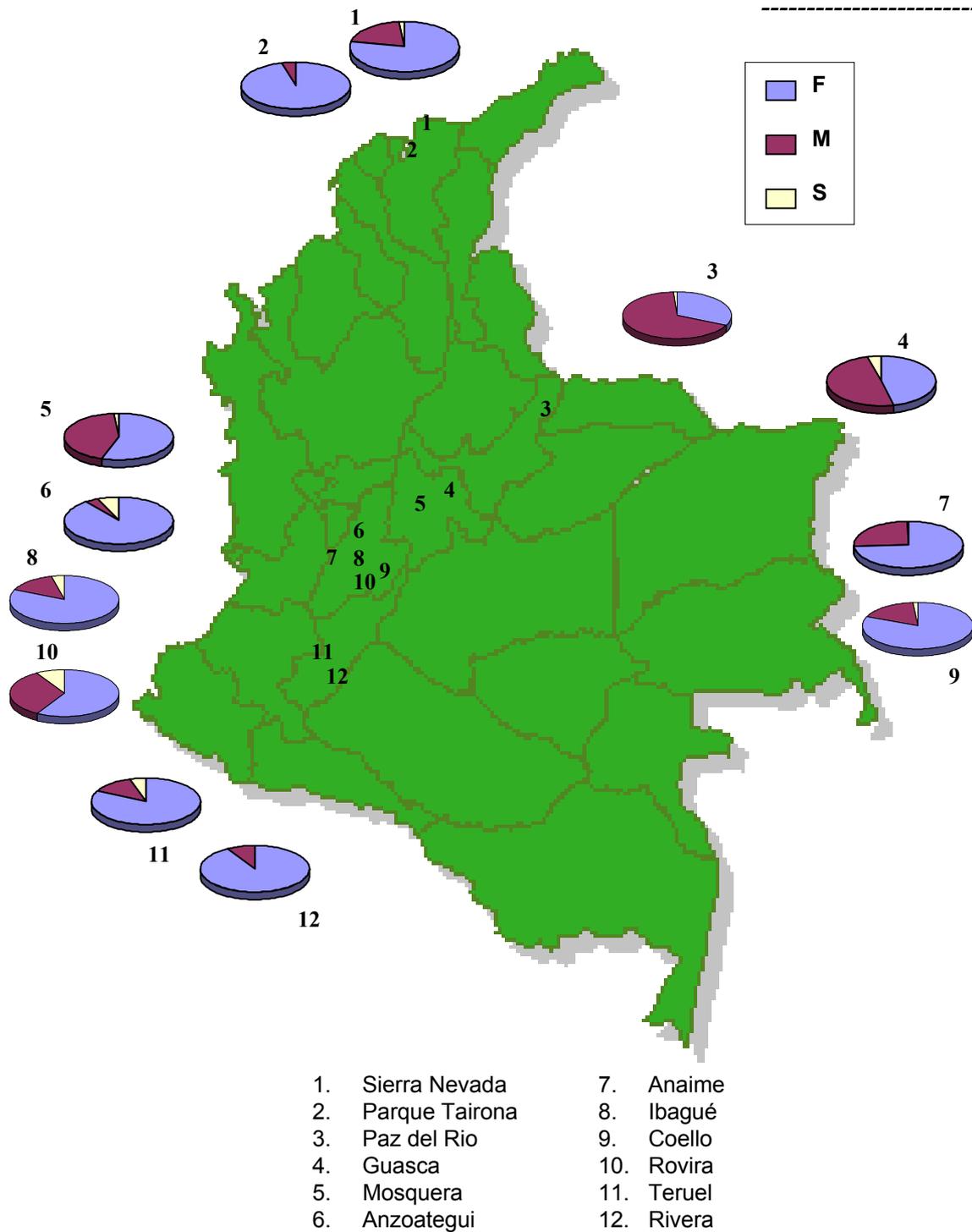


FIGURA 05. Distribuição latitudinal das freqüências alélicas da *Mdh-1* em amostras da Colômbia

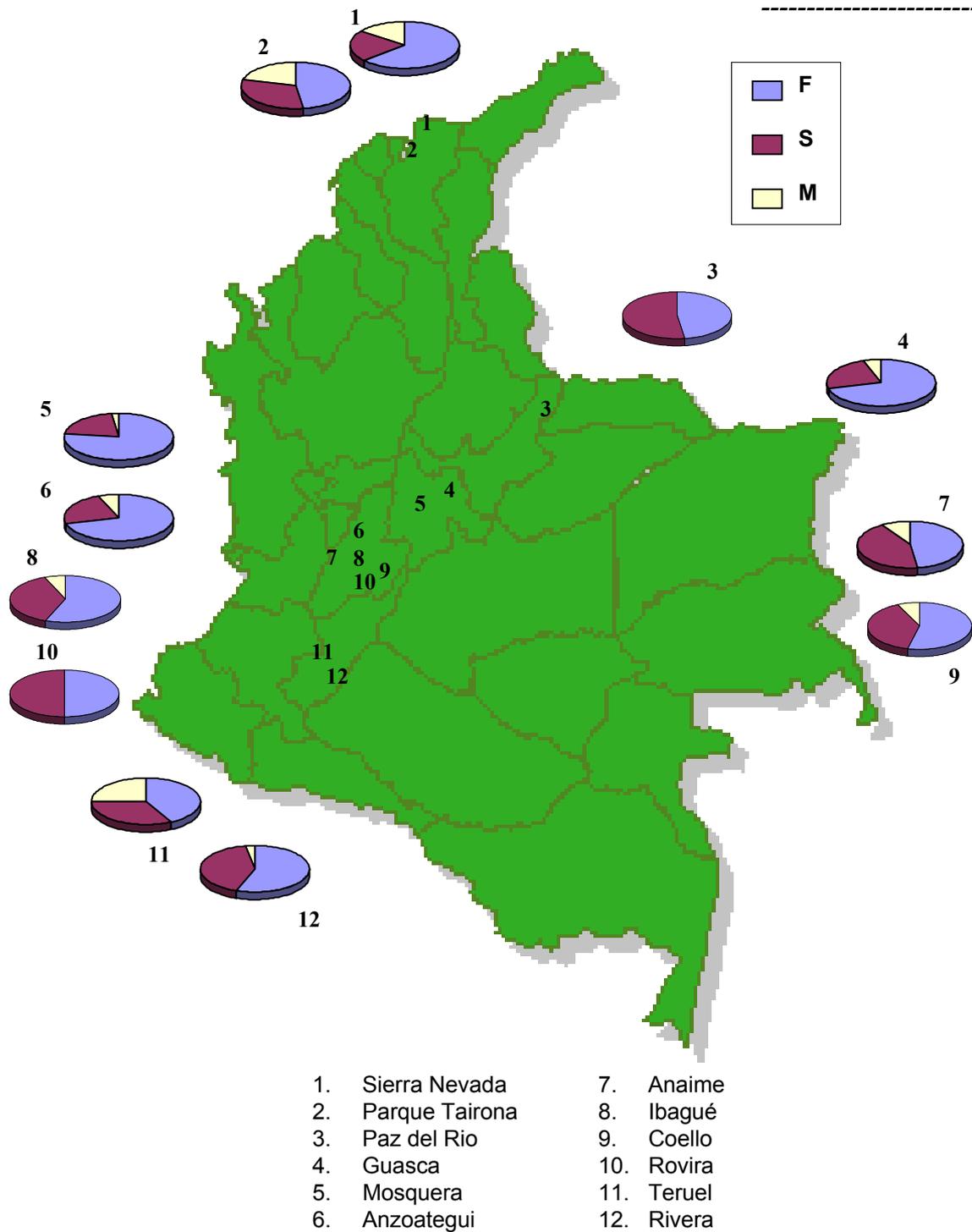


FIGURA 06. Distribuição latitudinal das freqüências alélicas da *Hk-1* em amostras da Colômbia

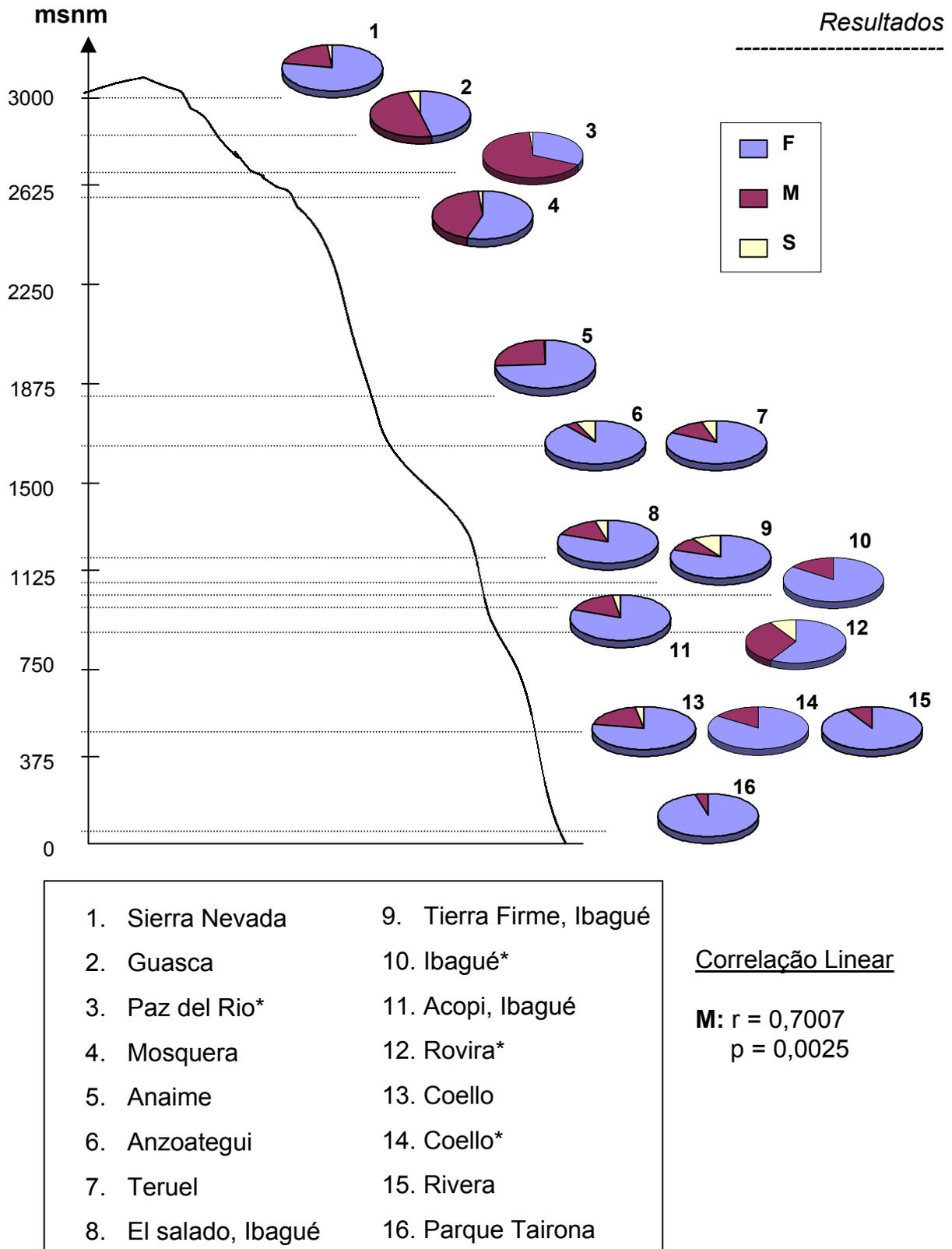


FIGURA 07. Associação entre as freqüências alélicas de *Mdh-1* e a altitude das localidades amostradas da Colômbia

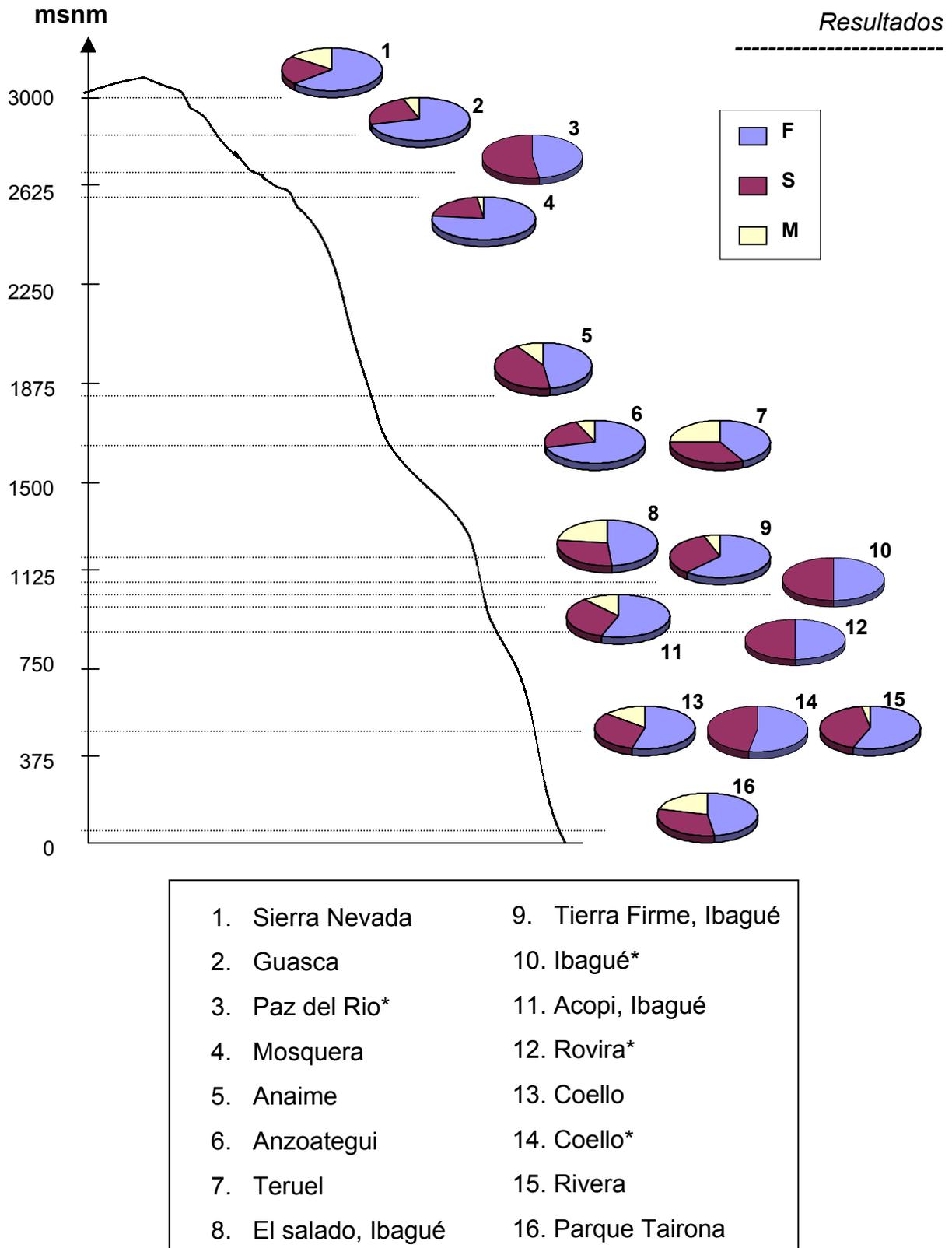


FIGURA 08. Associação entre as frequências alélicas de *Hk-1* e a altitude das localidades amostradas da Colômbia

TABELA 4. Valores da Estatística-F de WRIGHT, estimados a partir dos locos *Mdh-1* e *Hk-1* em populações de *Apis mellifera* provenientes de diferentes localidades da Colômbia.

Loco	N amostral	Fis	Fit	Fst
Hk	1798	-0,0338	0,0070	0,0394
Mdh	1802	0,0417	0,1955	0,1605
Média	1800	-0,0039	0,0877	0,0913

TABELA 5. Fluxo gênico estimado segundo NEI (1987) a partir dos locos *Mdh-1* e *Hk-1* em populações de *Apis mellifera* provenientes de diferentes localidades da Colômbia.

Loco	No. Amostral	Nm*
<i>Hk-1</i>	1798	6.0915
<i>Mdh-1</i>	1800	2.4882

*Nm = Fluxo gênico estimado a partir de $F_{st} = 0,25 (1 - F_{st}) / F_{st}$

4.2 Polimorfismos do DNA mitocondrial

4.2.1 Loco 16S - As análises mitocondriais para o loco 16S (sítio *Dra I*), revelaram a presença de dois padrões, um encontrado em abelhas de origem materna Africana (*scutellata*) e o outro em abelhas de origem Européia (*ligustica*), apresentados na Figura 9. Os resultados observados para as amostras de cada localidade da Colômbia mostram que o padrão Africano é o mais freqüente (87,5%), enquanto o padrão *ligustica* foi encontrado em menor freqüência (12,5%). Estes resultados estão apresentados na Tabela 6 e a distribuição latitudinal e altitudinal destes padrões por localidade estão ilustradas na Figura 10 e Figura 11, respectivamente.

4.2.2. Região intergênica CO I – CO II - As análises para a região intergênica CO I – CO II evidenciaram a ocorrência de cinco fragmentos de tamanhos distintos, por nós designados A, B, C, D e D', de acordo com a ordem de visualização deste nos géis (Figura 12). As análises de restrição destes fragmentos com *Dra I* revelaram oito padrões, denominados A, B, B', D, E, G, C e C' (Figura 13). Após fazer a associação entre tamanho e padrão de digestão, oito haplótipos distintos foram encontrados, seis característicos do tipo "Africano" (A/D, B/B, B/E, B/G, B/B* e C/A) e dois haplótipos (D/C, D*/C*) associados ao padrão Europeu *ligustica* (ver Tabela 6). A possível distribuição latitudinal e altitudinal destes haplótipos está ilustrada na Figura 14 e Figura 15, respectivamente.

TABELA 6. Padrões do DNA mitocondrial correspondentes aos locos 16S e da região intergênica CO I – CO II verificados em operárias adultas de *Apis mellifera* provenientes de diferentes localidades da Colômbia.

N	Localidade	Colônias	16S – Dra I		Região COI-COII - Dra I							
			A	L	A/D	B/B	B/E	B/G	B/B*	C/A	D/C	D*/C*
1	Sierra Nevada	5	5			2			1	2		
2	Parque Tairon.	4	4			3				1		
3	Tutazá	9	6	3		3				3	3	
4	Paz del Rio	4	4			4						
	Paz del Rio*	8	8			4	1			3		
5	Belen	4	4			3				1		
6	Cerinza	6	6			1	1			4		
7	Sant. Rosa Vit.	10	8	2		1	1			6	1	1
8	Paipa	4	4				1			3		
9	Duitama	5	4	1		1	2			1		1
10	Nobsa	3	3			1				2		
11	Tibasosa	3	3			1				2		
12	Pacho	63	63		2	22	1			38		
13	Guasca	16	15	1		7				8	1	
14	Mosquera	32	20	12		16				4	9	3
15	Suba	24	12	12	2	2	1			7	1	11
16	Fusagasuga	11	11			1	1			9		
17	La Union*	4	3	1		2				1	1	
18	Anzoategui	4	4							4		
19	Anaime	20	20			19	1					
20	El Salado	20	19	1		6				13	1	
	Ibagué*	5	5			3				2		
	Tierra Firme	8	8			2	1			5		
	Acopi	10	6	4		4				2	1	3
21	Coello	12	12			7				5		
	Coello*	6	6			4				2		
22	Rovira*	8	8			4				4		
23	Teruel	8	8			3		1		4		
24	Rivera	3	3			1				2		
	Total	319	282	37	4	127	11	1	1	138	18	19

* Primeira coleta (2002/2003)

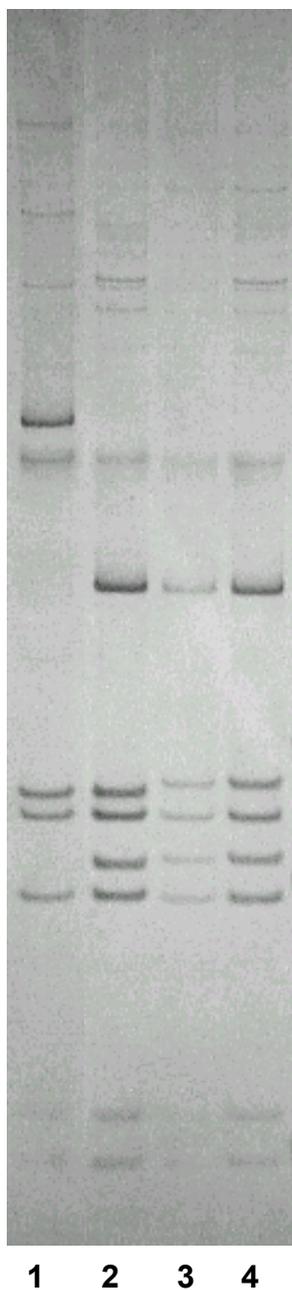
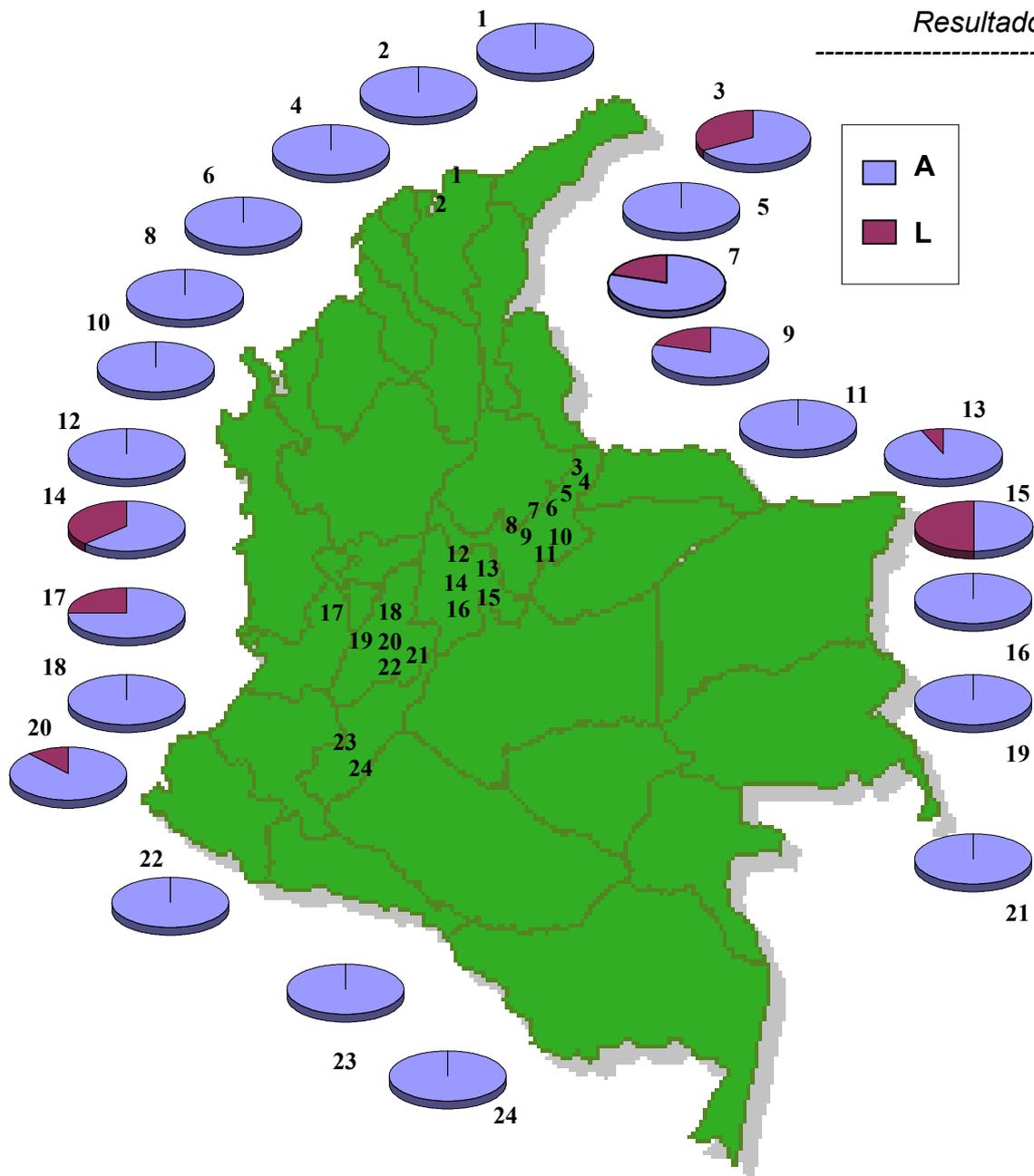


FIGURA 09. Padrões do loco 16S (*Dra I*) observadas em amostras de *Apis mellifera* da Colômbia. A amostra 1 corresponde ao padrão *mellifera*, 2 ao *igustica*, 3 e 4 correspondem ao padrão Africano.

Resultados



- | | | |
|--------------------------|----------------|----------------|
| 1. Sierra Nevada | 9. Duitama | 17. La Union |
| 2. Parque Tairona | 10. Nobsa | 18. Anzoategui |
| 3. Tutazá | 11. Tibasosa | 19. Anaimé |
| 4. Paz del Río | 12. Pacho | 20. Ibagué |
| 5. Belén | 13. Guasca | 21. Coello |
| 6. Cerinza | 14. Mosquera | 22. Rovira |
| 7. Santa Rosa de Viterbo | 15. Suba | 23. Teruel |
| 8. Paipa | 16. Fusagasuga | 24. Rivera |

FIGURA 10. Distribuição latitudinal dos Haplótipos do loco 16S (*Dra I*) em amostras da Colômbia

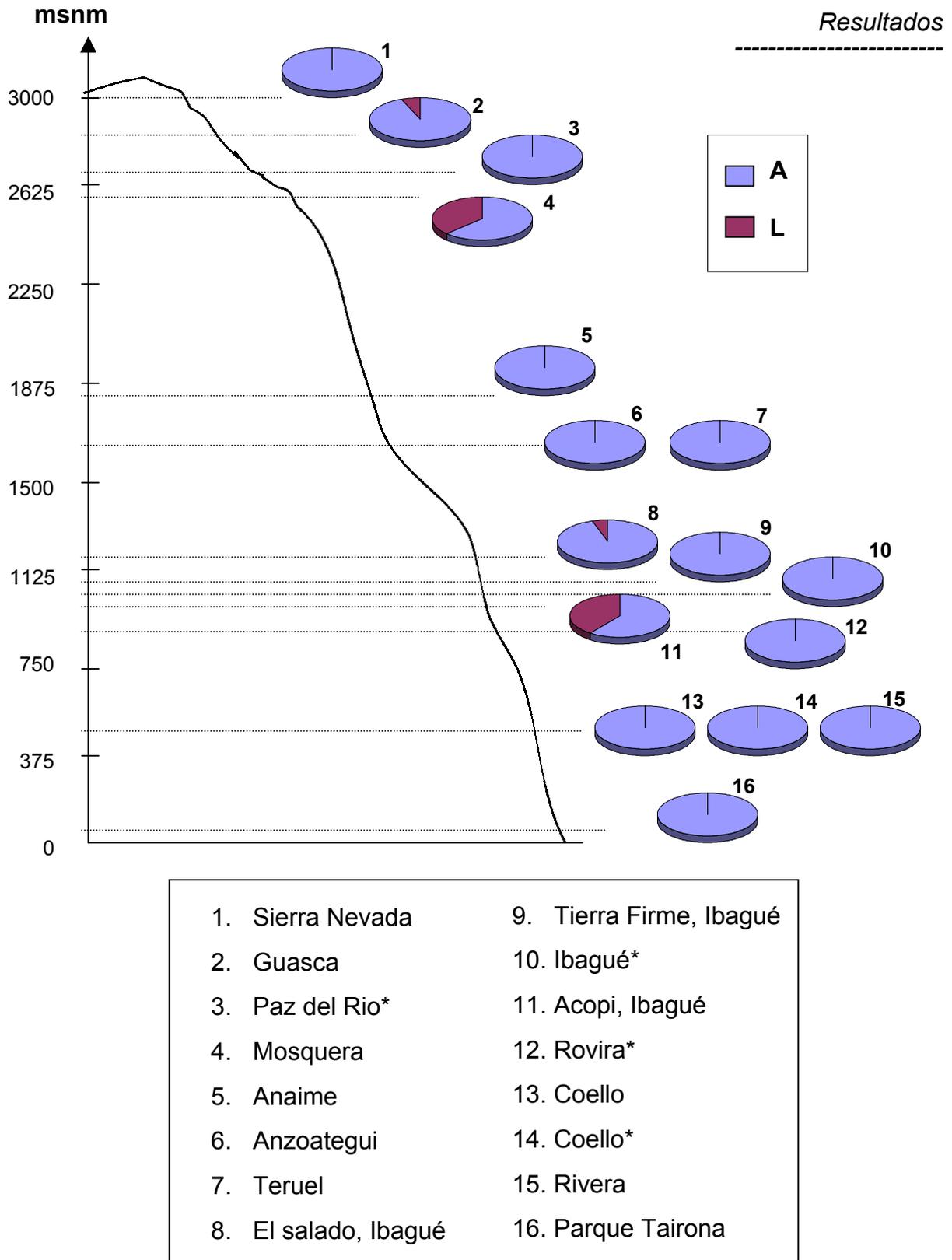


FIGURA 11. Distribuição dos padrões de 16S em amostras da Colômbia de diferentes altitudes.

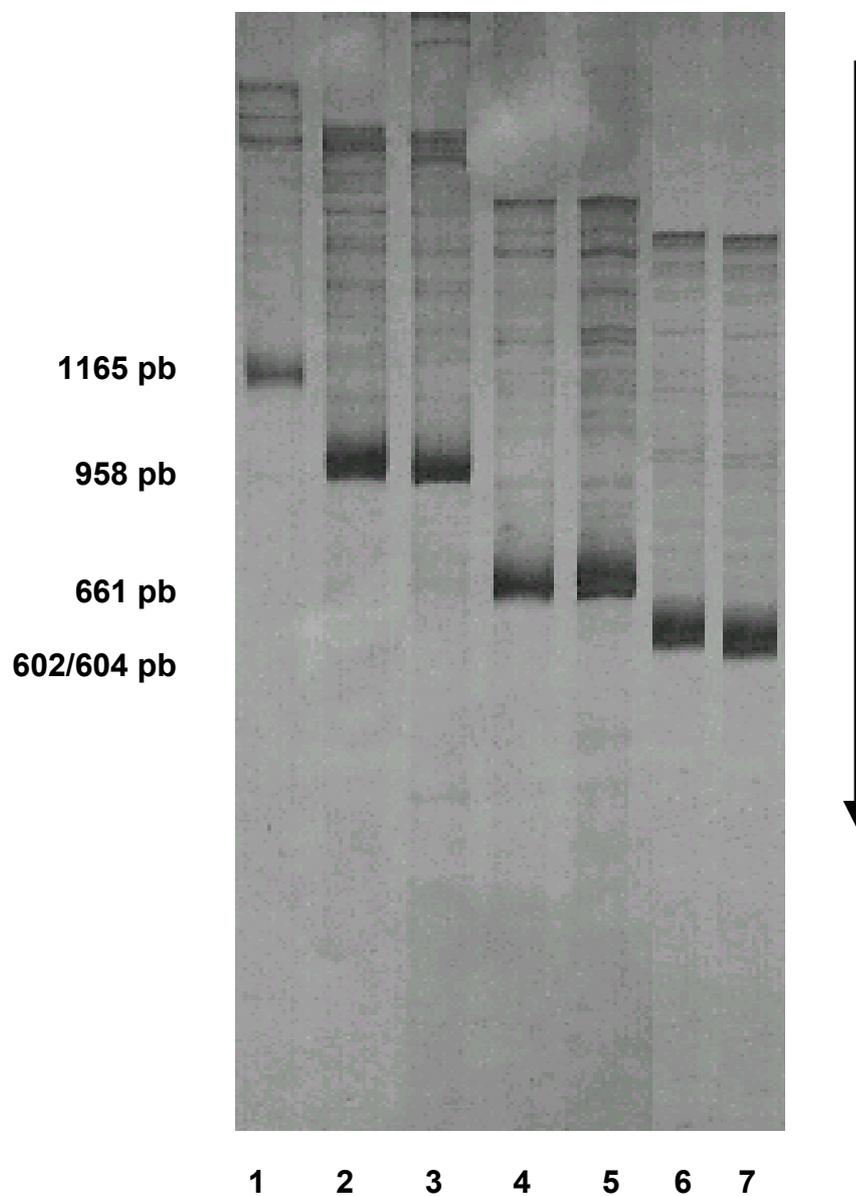


FIGURA 12. Padrões de amplificação da região intergênica COI-COII do DNA mitocondrial de *Apis mellifera* em amostras da Colômbia, revelados em gel de poli-acrilamida a 6% corado com prata. A amostra 1 apresenta o padrão A, 2-3 o padrão B, 4 e 5 o padrão C, 6 o padrão D* e o 7 o padrão D. As amostras 6 e 7 apresentam o padrão *ligustica*.

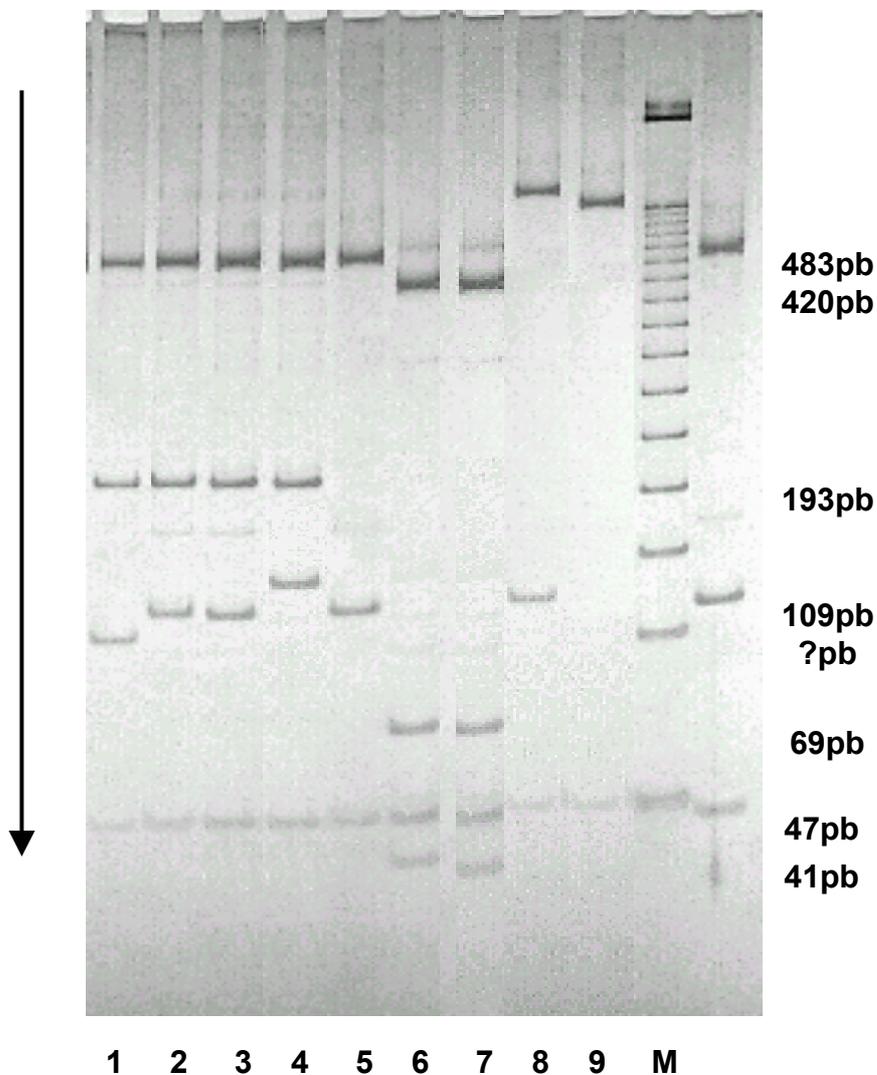


FIGURA 13. Padrões de digestão da região intergênica COI-COII (*Dra* I) do DNA mitocondrial de *Apis mellifera* em amostras da Colômbia, revelados em gel de poliacrilamida a 12% corado com prata. A amostra 1 apresenta o padrão **E**, 2-3 o padrão **B**, 4 o padrão **B***, 5 o padrão **A**, 6 o padrão **C**, 7 o padrão **C*** (C e *C* ligustica*), 8 o padrão **D** e 8 o padrão **G**. O marcador molecular (M) é de 25 pb.

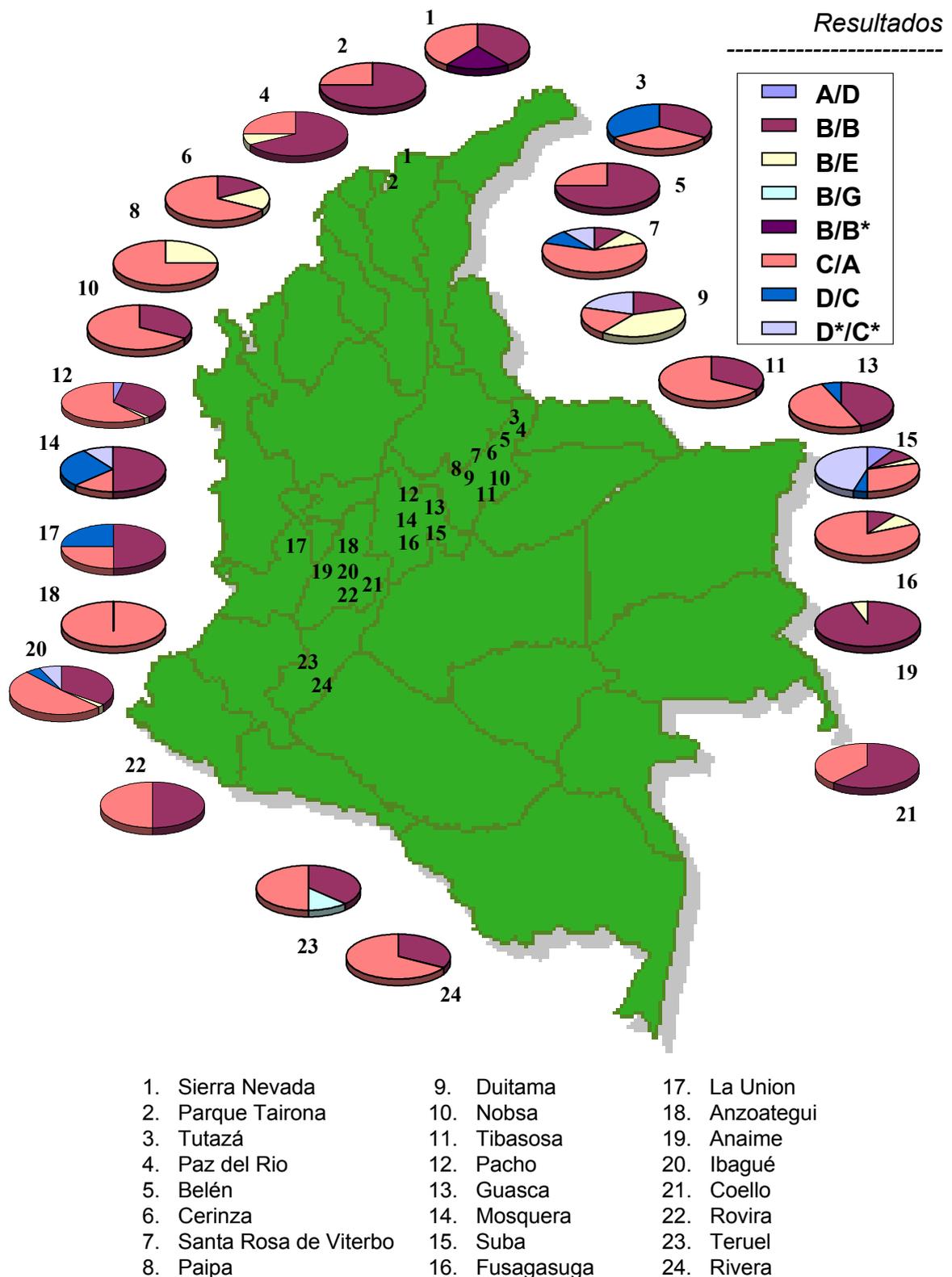
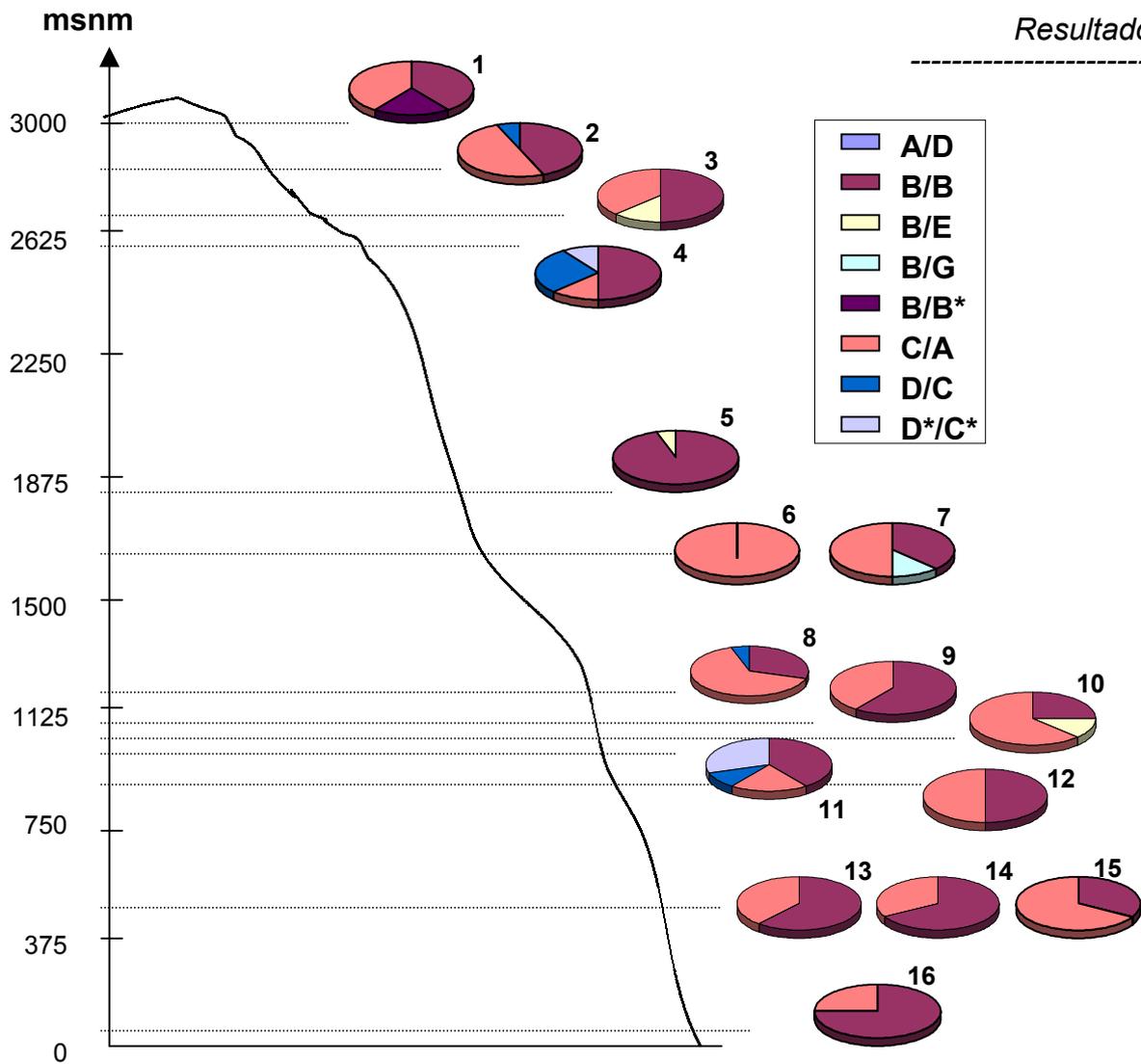


FIGURA 14. Distribuição latitudinal dos haplótipos da Região Intergênica COI-COII (*Dra I*) em amostras da Colômbia.



1. Sierra Nevada	9. Tierra Firme, Ibagué
2. Guasca	10. Ibagué*
3. Paz del Rio*	11. Acopi, Ibagué
4. Mosquera	12. Rovira*
5. Anaimé	13. Coello
6. Anzoategui	14. Coello*
7. Teruel	15. Rivera
8. El salado, Ibagué	16. Parque Tairona

FIGURA 15. Distribuição dos haplótipos da Região Intergênica COI-COII (*Dra I*) em amostras da Colômbia de diferentes altitudes.

4.2.3 Loco CO I - Com o objetivo de associar os padrões obtidos a partir do loco 16S e da região intergênica CO I – CO II com uma terceira região do DNA mitocondrial, foi feita a amplificação por PCR da região CO I de algumas colônias amostradas, sendo posteriormente submetidas à digestão com as enzimas de restrição *Taq I* e *Bcl I*. Foi possível detectar padrões distintos no interior das subespécies, o que evidencia que as raças que formaram as populações de *Apis mellifera* da Colômbia eram compostas de várias linhagens maternas. As análises de parte das amostras provenientes de todas as localidades evidenciaram um grande polimorfismo presente nas abelhas da Colômbia para esta região do DNA mitocondrial. Cinco mitótipos foram detectados com *Taq I* (A, B, C, D e E), em que os padrões B (41,7%) e C (37,1%) foram os mais freqüentes (Figura 16), e 4 para *Bcl I* (B, C, D e E), em que os padrões B (49,0%) e D (38,9%) foram os mais freqüentes (Figura 17). Estes achados encontram-se sumarizados na Tabela 7.

Desconsiderando as colônias de padrão *ligustica*, podemos observar um incremento na freqüência do padrão C (44,5%) em relação ao padrão B (30,7) para *Taq I*, e do aumento de freqüência do padrão D (46,7%) em relação ao padrão B (39,0%). Estas freqüências haplotípicas são apresentadas na Tabela 8. Para esta região, também foi feita uma análise da distribuição latitudinal e altitudinal destes mitótipos nas abelhas da Colômbia para as endonucleases *Taq I* (Figura 18 e Figura 19) e *Bcl I* (Figura 20 e Figura 21), respectivamente. Além disso, foi realizada uma análise de associação entre os distintos haplótipos observados para a região intergênica CO I – CO II, e o loco COI (*Taq I*) e COI (*Bcl I*), observados na Colômbia, considerando o total de colônias analisadas e somente as que apresentaram o padrão “Africano”, desconsiderando as colônias de padrão *ligustica*. As diferentes associações haplotípicas resultantes encontram-se sumarizadas nas Tabelas 9, 10 e 11. De acordo com estes achados, 27 haplótipos diferentes foram encontrados para o total das colônias (Tabela 12) e 25 haplótipos considerando somente as colônias “Africanas” (Tabela 13). Portanto, somente dois haplótipos são exclusivamente observadas em colônias com o padrão *ligustica*.

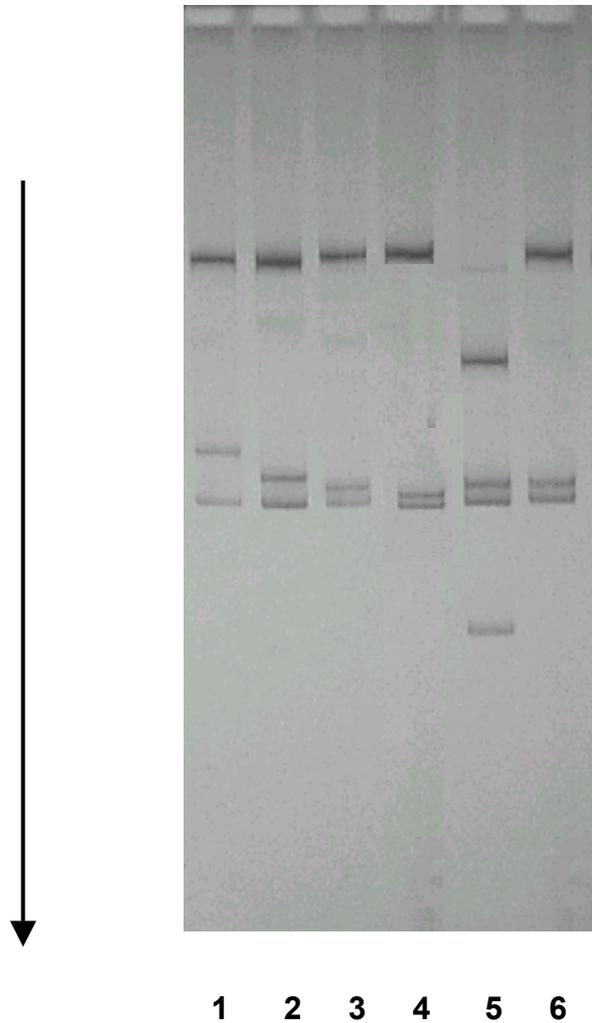


FIGURA 16. Padrões de digestão da região *COI* (*Taq I*) do DNA mitocondrial de *Apis mellifera* da Colômbia em gel de poliacrilamida a 12% corado com prata. A amostra 1 apresenta o padrão **A**, 2 o padrão **B**, 3 e 6 o padrão **C**, 4 o padrão **D** e o 5 o padrão **E**.

TABELA 7. Padrões do DNA mitocondrial correspondentes aos locos 16S e CO I do DNA mitocondrial, observados em operárias adultas de *Apis mellifera* provenientes de diferentes localidades da Colômbia.

N	Localidade	Colônias	16 S – Dra I		COI – Taq I					COI – Bcl I			
			A	L	A	B	C	D	E	B	C	D	E
1	Sierra Nevada	5	5				4		1	1	1	3	
2	Parque Tairona	4	4				3	1		1		3	
3	Tutazá	5	3	2		3	1	1		3	2		
4	Paz del Rio	4	4				3		1	1		3	
	Paz del Rio*	8	8				3	4	1	1		7	
5	Belen	4	4			1	3			4			
6	Cerinza	6	6			1	5			3		3	
7	Santa Rosa Vit.	6	4	2	1	2		3		2		3	1
8	Paipa	4	4		1		1	2		1		2	1
9	Duitama	5	4	1		1	3	1		3		2	
10	Nobsa	3	3		1	1	1			1	1		1
11	Tibasosa	3	3				1	2		3			
12	Pacho	34	34		3	10	15	6		12	4	15	3
13	Guasca	6	5	1	1	1	4			2	1	2	1
14	Mosquera	25	13	12		20	4		1	16	5	4	
15	Suba	24	12	12		17	6	1		17		7	
16	Fusagasuga	10	10		3	5	1	1		5		2	3
17	La Union*	4	3	1	1	1	1		1	2		1	1
18	Anzoategui	4	4			3		1		3		1	
19	Anaime	5	5			5				1		4	
20	El Salado	6	5	1		2	3	1		2		4	
	Ibagué*	5	5			2	3			3		2	
	Tierra Firme	5	5		1	3	1			3		1	1
	Acopi	6	2	4		4	1		1	6			
21	Coello	5	5			3	2			3		2	
	Coello*	6	6			1	5			2		4	
22	Rovira*	8	8			4	3		1	5		3	
23	Teruel	5	5		2	1	2					3	2
24	Rivera	3	3			1	2			1		2	
	Total	218	182	36	14	92	81	24	7	107	14	83	14

* Primeira coleta (2002/2003)

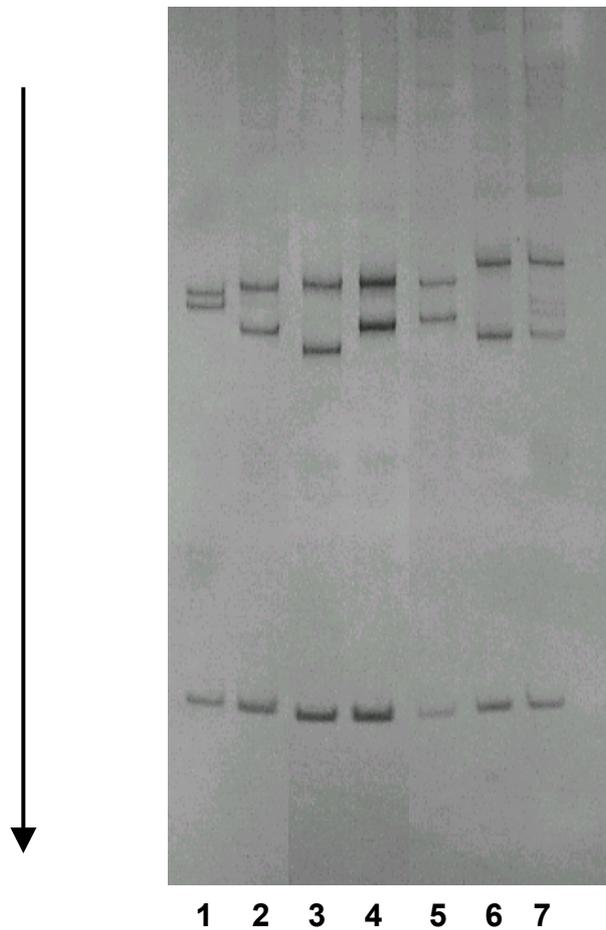


FIGURA 17. Padrões de digestão da região *COI* (*Bcl* I) do DNA mitocondrial em amostras de *Apis mellifera* da Colômbia, reveladas em gel de poliacrilamida a 7% corado com prata. A amostra 1 apresenta o padrão **A** (exclusiva de *A. mellifera mellifera*), 2 e 4 o padrão **B**, 3 o padrão **C**, 5 o padrão **D**, 6 e 7 o padrão **E**.

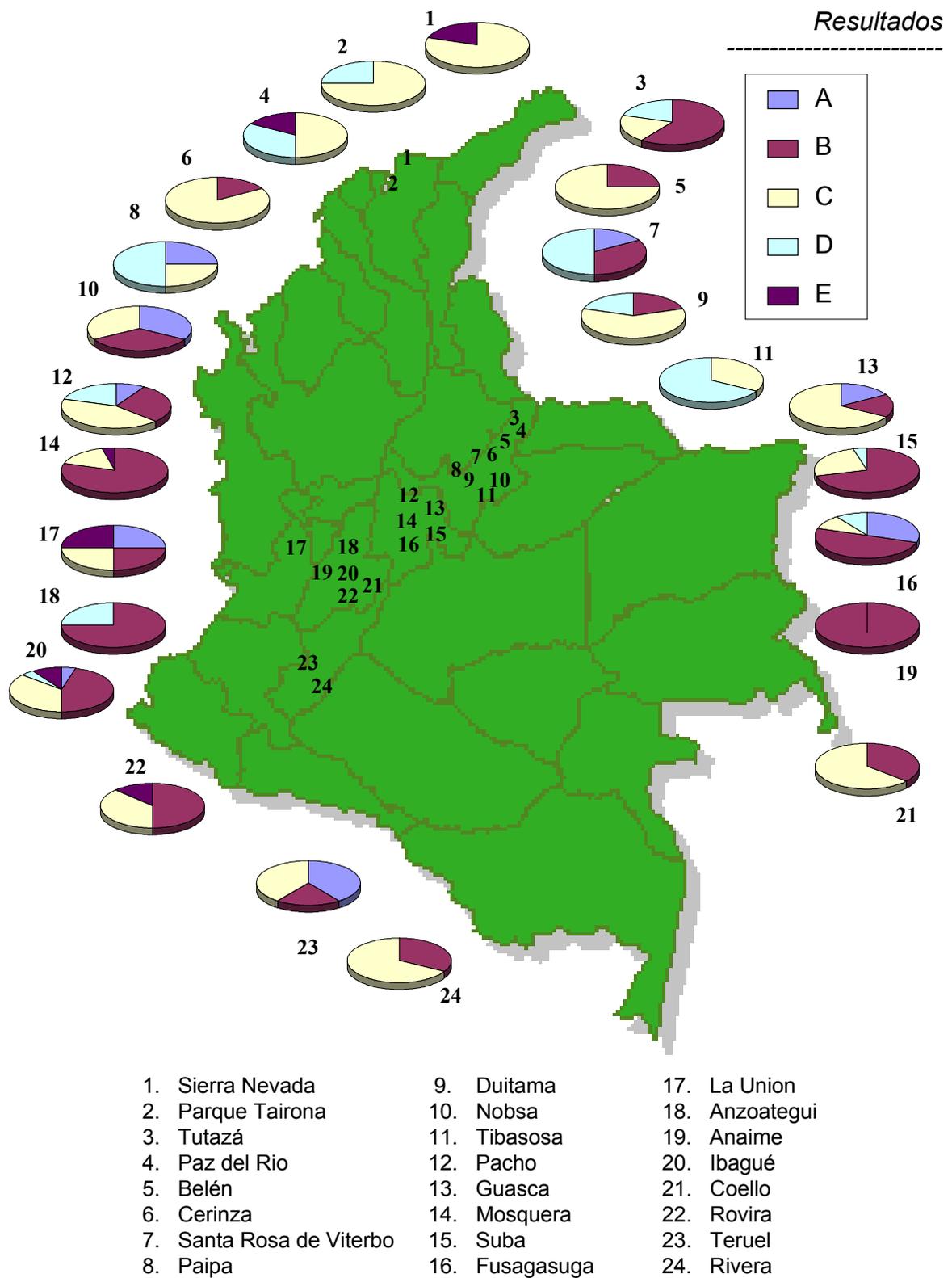
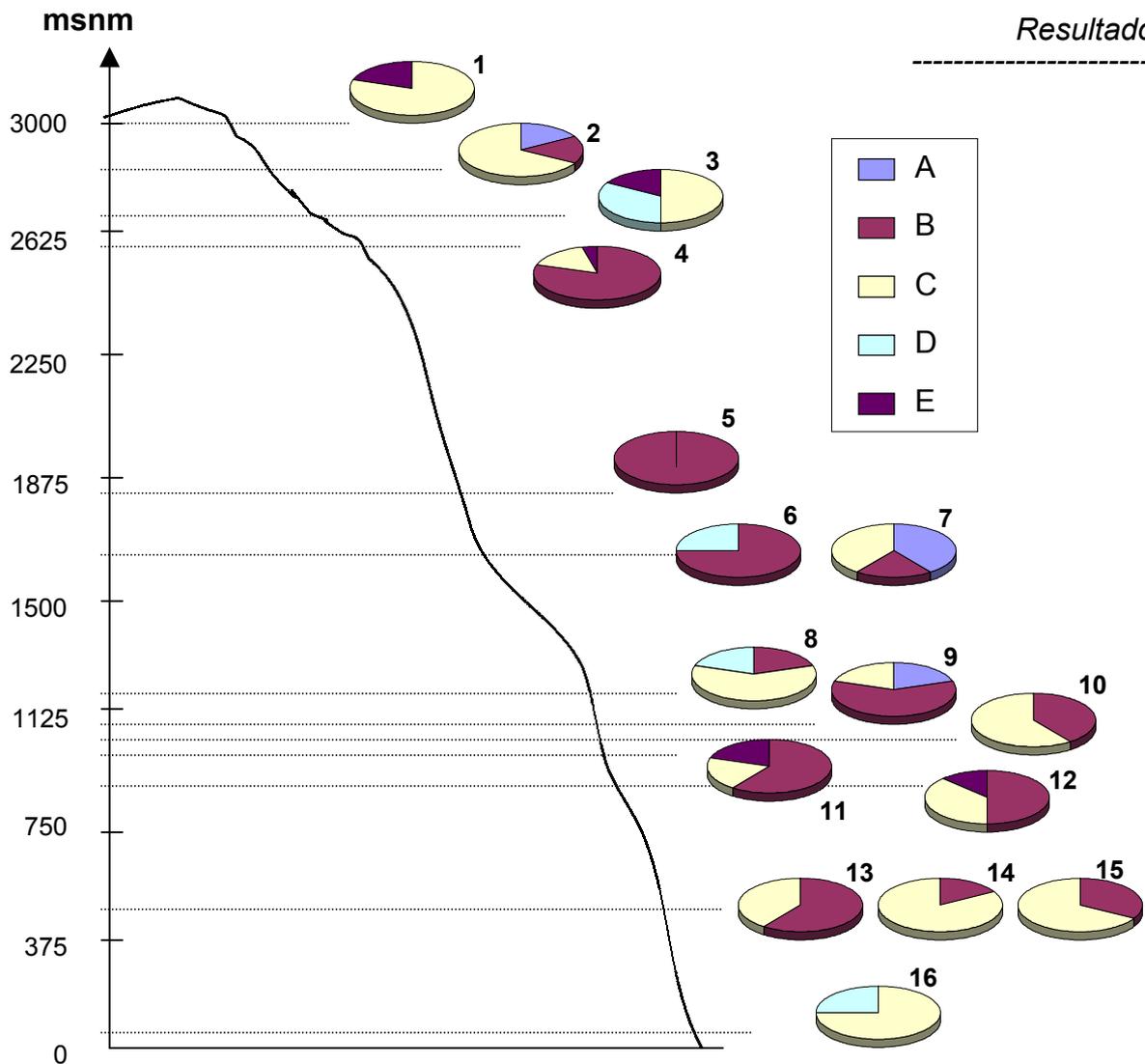


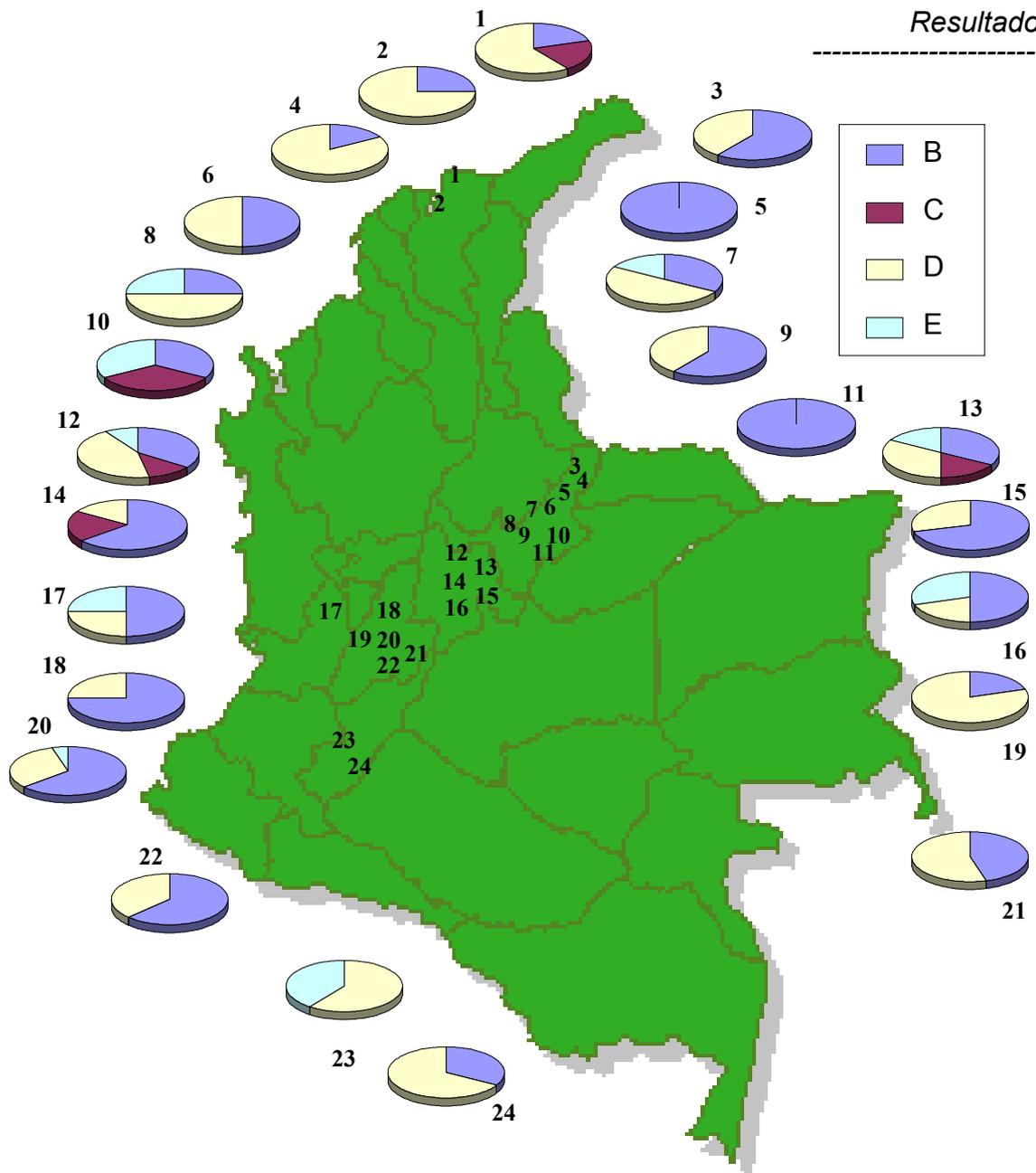
FIGURA 18. Distribuição latitudinal dos Haplótipos do loco *COI* (*Taq I*) em amostras da Colômbia



- | | |
|----------------------|-------------------------|
| 1. Sierra Nevada | 9. Tierra Firme, Ibagué |
| 2. Guasca | 10. Ibagué* |
| 3. Paz del Rio* | 11. Acopi, Ibagué |
| 4. Mosquera | 12. Rovira* |
| 5. Anaimé | 13. Coello |
| 6. Anzoategui | 14. Coello* |
| 7. Teruel | 15. Rivera |
| 8. El salado, Ibagué | 16. Parque Tairona |

FIGURA 19. Distribuição dos haplótipos do loco COI (*Taq I*) em amostras da Colômbia de diferentes altitudes.

Resultados



- | | | |
|--------------------------|----------------|----------------|
| 1. Sierra Nevada | 9. Duitama | 17. La Union |
| 2. Parque Tairona | 10. Nobsa | 18. Anzoategui |
| 3. Tutazá | 11. Tibasosa | 19. Anaimé |
| 4. Paz del Río | 12. Pacho | 20. Ibagué |
| 5. Belén | 13. Guasca | 21. Coello |
| 6. Cerinza | 14. Mosquera | 22. Rovira |
| 7. Santa Rosa de Viterbo | 15. Suba | 23. Teruel |
| 8. Paipa | 16. Fusagasuga | 24. Rivera |

FIGURA 20. Distribuição latitudinal dos Haplótipos do loco *COI* (*Bcl I*) em amostras da Colômbia

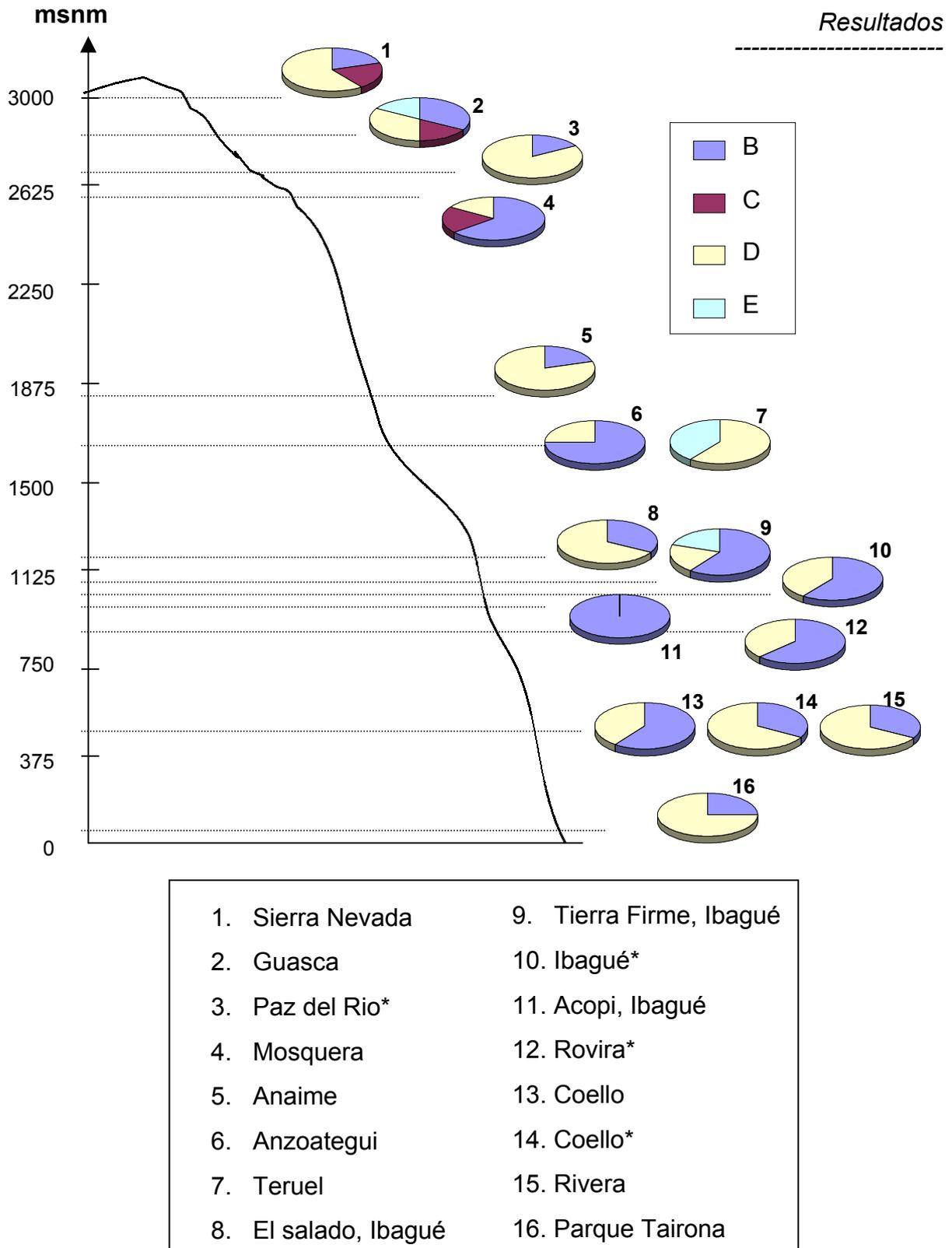


FIGURA 21. Distribuição dos haplótipos do loco *COI* (*Bcl* I) em amostras da Colômbia de diferentes altitudes.

TABELA 8. Freqüências haplotípicas da região intergênica COI-COII (*Dra* I) e o loco *COI* (*Taq* I e *Bcl* I) observadas em operárias adultas de *Apis mellifera* de diferentes regiões da Colômbia.

A - Considerando o total das colônias

Haplótipo	COI-COII (<i>Dra</i> I)	<i>COI</i> (<i>Taq</i> I)	<i>COI</i> (<i>Bcl</i> I)
A	(A/D) 0.0125	0.0642	
B	(B/B) 0.3950	0.4174	0.4908
C	(B/E) 0.0376	0.3716	0.0550
D	(B/G) 0.0031	0.1101	0.3899
E	(B/B*) 0.0031	0.0367	0.0642
F	(C/A) 0.4326		
G	(D/C) 0.0533		
H	(D*/C*) 0.0627		

B – Considerado somente as colônias com DNAmít “Africano”

Haplótipo	COI-COII (<i>Dra</i> I)	<i>COI</i> (<i>Taq</i> I)	<i>COI</i> (<i>Bcl</i> I)
A	0.0142	0.0769	
B	0.4468	0.3077	0.3901
C	0.0426	0.4451	0.0659
D	0.0035	0.1319	0.4670
E	0,0035	0.0385	0.0769
F	0.4894		

TABELA 9. Associação entre os haplótipos observados para a região intergênica CO I – CO II (sítios *Dra* I) e o loco COI (sítios *Taq* I) em operárias adultas de *Apis mellifera* de diferentes localidades da Colômbia.

COI-COII	COI/Taq I					Total Geral
	A	B	C	D	E	
A			3			3
B	1	19	45	2	6	73
C		1	8	1		10
E			1			1
F	13	36	24	21	1	95
Total Geral	14	56	81	24	7	182

TABELA 10. Associação entre os haplótipos observados para a região intergênica CO I – CO II (sítios *Dra* I) e o loco COI (sítios *Bcl* I) em operárias adultas de *Apis mellifera* de diferentes localidades da Colômbia.

COI-COII	COI/Bcl I				Total Geral
	B	C	D	E	
A			3		3
B	14	11	48		73
C	4		6		10
E		1			1
F	53		28	14	95
Total Geral	71	12	85	14	182

TABELA 11. Comparação entre os haplótipos observados no loco COI (*Taq* I) e COI (*Bcl* I), estabelecidos para operárias adultas de *Apis mellifera*, coletadas em diferentes regiões da Colômbia.

COI/Taq I	COI/Bcl I				Total Geral
	B	C	D	E	
A	1		1	12	14
B	40	10	6		56
C	22	2	55	2	81
D	2		22		24
E	6		1		7
Total Geral	71	12	85	14	182

TABELA 12. Associação entre os haplótipos observados para a região intergênica CO I – CO II (sítios *Dra* I) e no loco *COI* (sítios *Taq* I) e *COI* (sítios *Bcl* I) em operárias adultas de *Apis mellifera* de diferentes localidades da Colômbia, considerando o total das amostras analisadas para estas regiões do DNA mitocondrial.

	COI/ <i>Bcl</i> I	B					B Total	C		C Total	D					D Total	E		E Total	Total Geral
	COI/ <i>Taq</i> I	A	B	C	D	E		B	C		A	B	C	D	E		A	C		
COI-COII	A												3			3				3
	B		4	5		5	14	10	1	11	1	5	39	2	1	48				73
	C			3	1		4					1	5			6				10
	E								1	1										1
	F	1	36	14	1	1	53						8	20		28	12	2	14	95
	G		16				16													16
	H		19			1	20													20
Total Geral	1	75	22	2	7	107	10	2	12	1	6	55	22	1	85	12	2	14	218	

TABELA 13. Associação entre os haplótipos observados para a região intergênica CO I – CO II (sítios *Dra* I) e no loco *COI* (sítios *Taq* I) e *COI* (sítios *Bcl* I) em operárias adultas de *Apis mellifera* de diferentes localidades da Colômbia, desconsiderando as amostras de padrão “*ligustica*” para a região 16S (sítios *Dra* I).

	COI/Bcl I	B					B Total	C		C Total	D					D Total	E		E Total	Total Geral
	COI/Taq I	A	B	C	D	E		B	C		A	B	C	D	E		A	C		
COI-COII	A												3			3				3
	B		4	5		5	14	10	1	11	1	5	39	2	1	48				73
	C			3	1		4					1	5			6				10
	E								1	1										1
	F	1	36	14	1	1	53						8	20		28	12	2	14	95
	Total Geral	1	40	22	2	6	71	10	2	12	1	6	55	22	1	85	12	2	14	182

4.3 Microsatélites

No loco microsatélite *A43*, foi possível observar um total de 7 alelos, com tamanhos entre 125-150 pb (Figura 22). A distribuição destes alelos (Tabela 14) permitiu observar que os alelos 6 e 4 são os mais freqüentes e representam 39,6% e 23,2%, respectivamente, do total de alelos observados.

Para o loco *RJP57-1*, a contagem direta evidenciou a presença de 12 tipos alélicos diferentes, com tamanho variável entre 400 a 600 pb (Figura 23). O alelo mais freqüente nas populações da Colômbia foi o alelo 6 (25,0%) e o 3 (19,8%) (Tabela 15).

As freqüências observadas e esperadas de homo e heterozigotos nas populações de *Apis mellifera* da Colômbia para os dois locos de microsatélites segundo LEVENE (1949) e NEI (1973) estão apresentadas nas Tabelas 16 e 17. A partir dos fenótipos para os microsatélites *A43* e *RJP57-1*, foram estimadas as freqüências alélicas para ambos os locos e, a partir destas, foi estimado o qui-quadrado de equilíbrio genético segundo o modelo de Hardy-Weinberg. As populações de Paz Del Rio para o loco *A43* ($\chi^2 = 13.0$; $P = 0.043$; $GL=6$) e Ibagué para o loco *RJP57-1* ($\chi^2 = 37.81$; $P=0.014$; $GL=21$) mostraram-se não se encontrar na condição de equilíbrio (Tabelas 14 e 15).

Para verificar se as diferentes populações de *Apis mellifera* analisadas podem ser consideradas como uma população única ou um conjunto de subpopulações foi realizado um teste de homogeneidade de freqüências alélicas. O valor encontrado para o χ^2_{hom} para o loco *A43* foi 38.8 ($P = 0.028$), indicando que as amostras analisadas não podem ser consideradas como uma população única. Para o loco *RJP57-1*, o valor encontrado ($\chi^2_{\text{hom}} = 86.124$; $P= 0.0001$) indicou, de igual forma, que a população encontra-se subdividida ou estruturada.

A distribuição latitudinal e altitudinal dos alelos observados nestas amostras da Colômbia para os locos *A43* e *RJP57-1* encontram-se ilustradas nas Figuras 24-25 e 26-27, respectivamente.

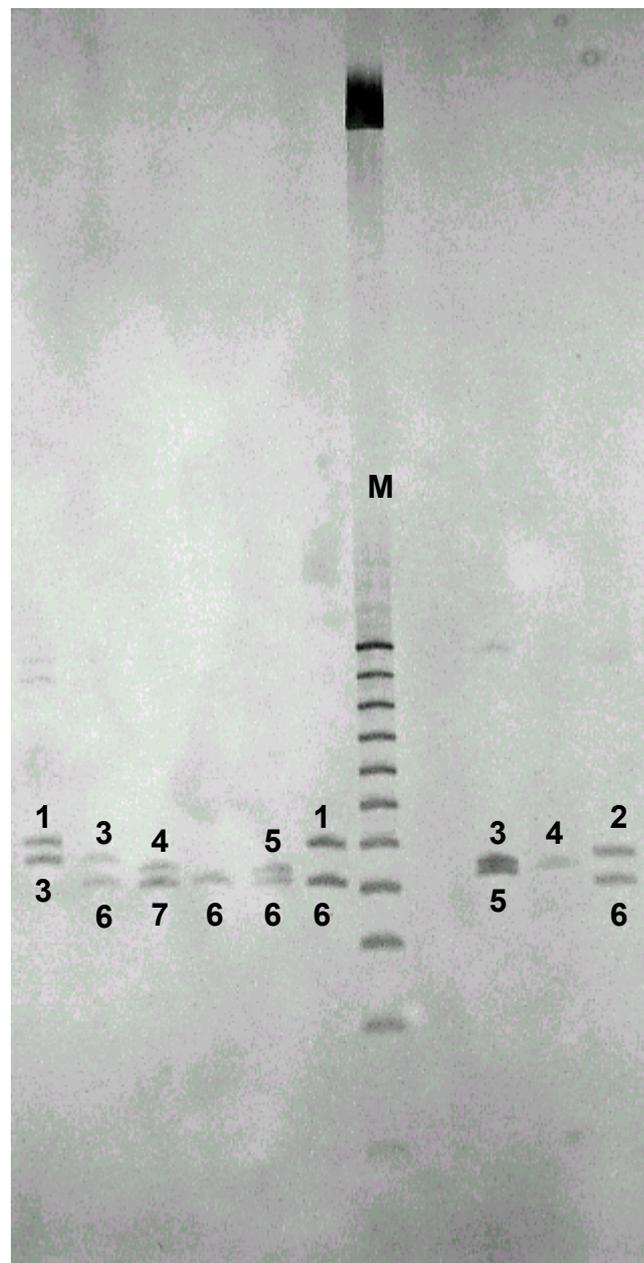


FIGURA 22. Padrões de amplificação do loco microsatélite A43 obtidos após eletroforese em gel poliacrilamida a 6% (uréia), observados em amostras de *Apis mellifera* da Colômbia. As amostras com os números de 1 a 7 correspondem aos fenótipos observados. O marcador molecular (M) é de 25 pb.

Tabela 14. Freqüências alélicas de *A43* e valores de χ^2 para verificação de equilíbrio genético de acordo com o modelo de Hardy-Weinberg, verificadas em operárias adultas de *Apis mellifera* de diferentes localidades da Colômbia.

Localidade	N. Colônias	<i>A43</i>							χ^2
		1	2	3	4	5	6	7	
Paz Del Rio*	8			0,2500	0,2500	0,0312	0,4688		<u>13.007</u>
Coello*	6	0,0417	0,1667	0,1250	0,1250	0,0417	0,5000		19.61
Ibagué*	5	0,3000	0,2000	0,0500	0,2000		0,2000	0,0500	10.66
Rovira*	8	0,1562	0,0938	0,0312	0,3125		0,3750	0,0312	19.22
La Union*	4	0,1250		0,1250	0,2500		0,3750	0,1250	5.33
Total	31	0,1121	0,0948	0,1207	0,2328	0,0172	0,3966	0,0259	

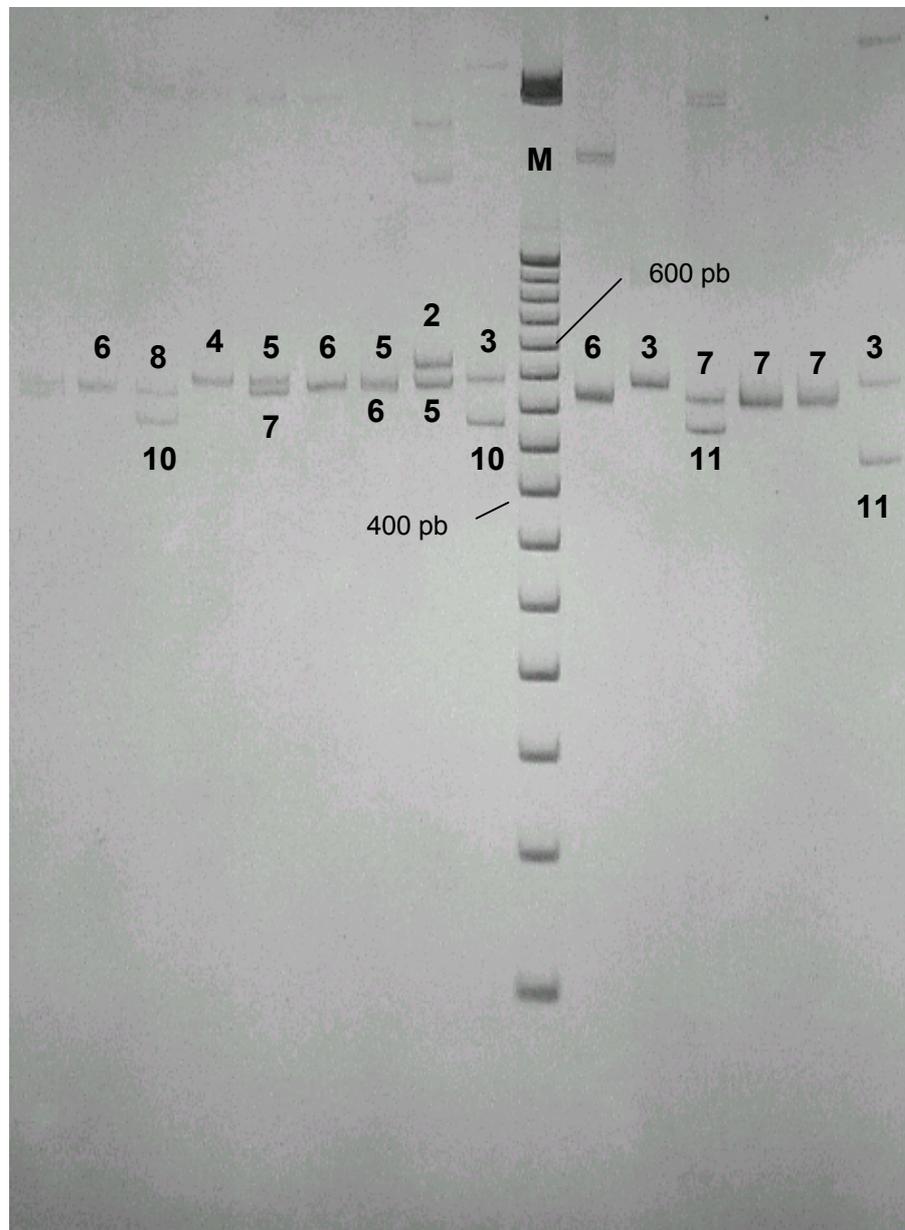


FIGURA 23. Padrões de amplificação do loco microsatélite *RJP57-1* obtidos após eletroforese em gel poliacrilamida a 6% (com uréia), observados em amostras de *Apis mellifera* da Colômbia. As amostras com os números de 2 a 12 representam algum dos fenótipos observados. O marcador molecular (M) é de 50 pb.

Tabela 15. Frequências dos alelos de *RJP57-1* verificadas em operárias adultas de *Apis mellifera* de diferentes localidades da Colômbia e valores de χ^2 para verificação de equilíbrio genético de acordo com o modelo de Hardy-Weinberg (N = número de colônias analisadas).

Localidade	N	Alelos de <i>RJP57-1</i>												χ^2
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Paz Del Rio*	8		0,0625	0,3750	0,0625	0,1875	0,0625	0,0312		0,0938		0,1250		27.77
Coello*	6	0,1250	0,0417	0,2500			0,2083	0,1250	0,0417	0,0417	0,0833	0,0833		38.08
Ibagué*	5			0,0500	0,1000	0,1000	0,3000	0,2500			0,1000		0,1000	37.81
Rovira*	8		0,0312	0,1250	0,0938	0,0312	0,4375	0,0625	0,0938	0,0312	0,0312		0,0625	46.11
La Union*	4				0,1250		0,2500		0,1250	0,3750		0,1250		14.66
Total	31	0,0259	0,0345	0,1983	0,0690	0,0776	0,2500	0,0948	0,0431	0,0690	0,0431	0,0603	0,0345	

* Primeira coleta (2002/2003)

TABELA 16. Freqüências observadas e esperadas de homozigotos e heterozigotos para o loco *A43* nas populações de *Apis mellifera* provenientes de diferentes localidades da Colômbia.

Localid.	Tam. Amos	Homozigotos Observados	Heterozigotos Observados	Homozigotos Esperados*	Heterozigotos Esperados*	NEI**
P Del R	32	0.6250	0.3750	0.3246	0.6754	0.6543
Coello	24	0.5833	0.4167	0.2826	0.7174	0.6875
Ibagué	20	0.2000	0.8000	0.1737	0.8263	0.7850
Rovira	32	0.4375	0.5625	0.2500	0.7500	0.7266
La Un.	8	0.0000	1.0000	0.1429	0.8571	0.7500

* Freqüências esperadas de homozigotos e heterozigotos segundo LEVENE (1949).

** Freqüências esperadas de heterozigotos segundo NEI (1978).

TABELA 17. Freqüências observadas e esperadas de homozigotos e heterozigotos para o loco *RJP57-1* nas populações de *Apis mellifera* provenientes de diferentes localidades da Colômbia.

Localid.	Tam. Amos	Homozigotos Observados	Heterozigotos Observados	Homozigotos Esperados	Heterozigotos Esperados	NEI**
P Del R	32	0.1875	0.8125	0.1875	0.8125	0.7871
Coello	24	0.1667	0.8333	0.1196	0.8804	0.8438
Ibagué	20	0.5000	0.5000	0.1526	0.8474	0.8050
Rovira	32	0.1875	0.8125	0.2117	0.7883	0.7637
La Un.	8	0.5000	0.5000	0.1429	0.8571	0.7500

* Freqüências de Homocigotos e Heterozigotos Esperadas segundo LEVENE (1949).

** Freqüências de Heterozigotos Esperadas segundo NEI (1973).

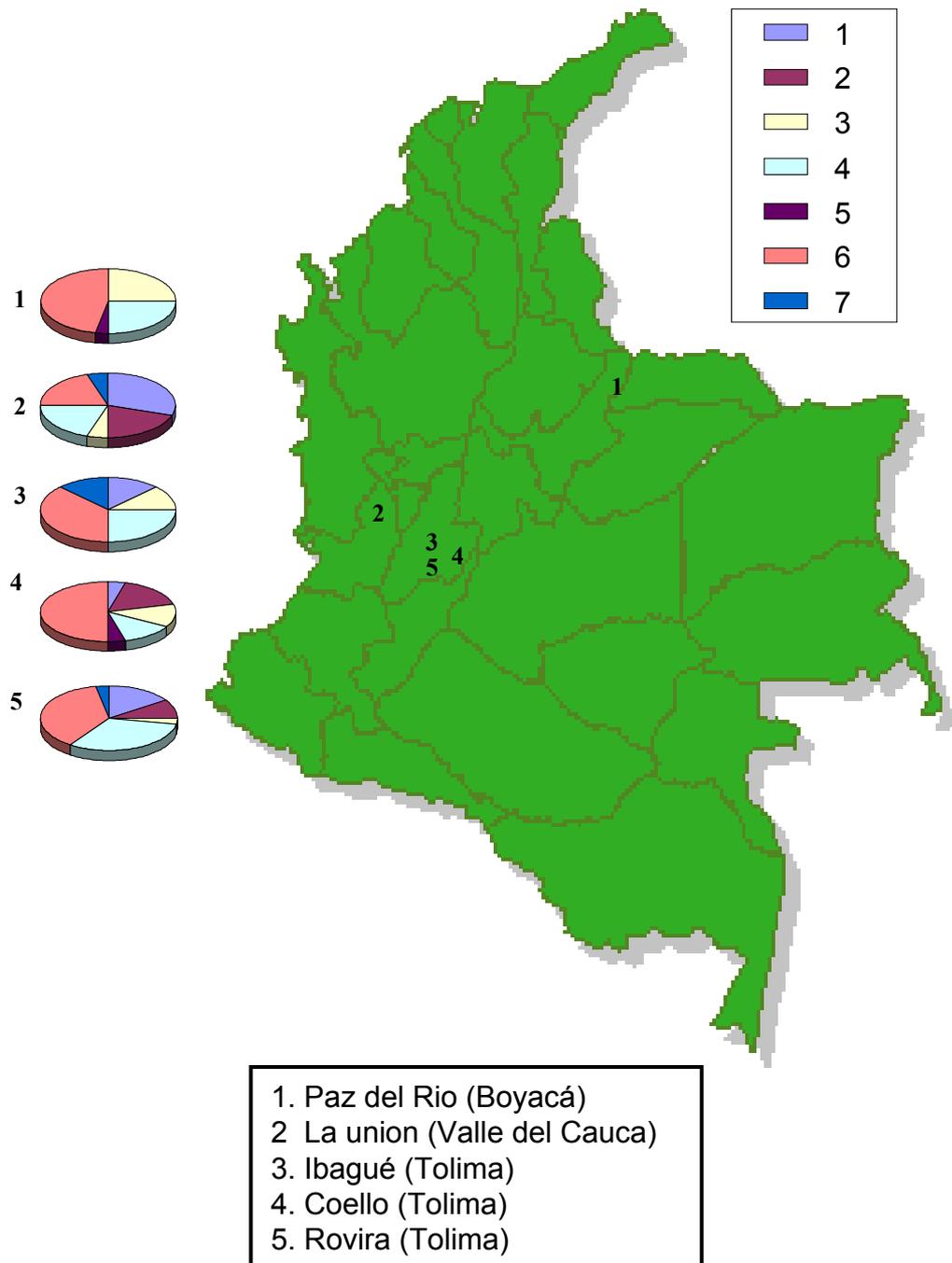


FIGURA 24. Distribuição latitudinal das freqüências alélicas no loco A43 em amostras da Colômbia.

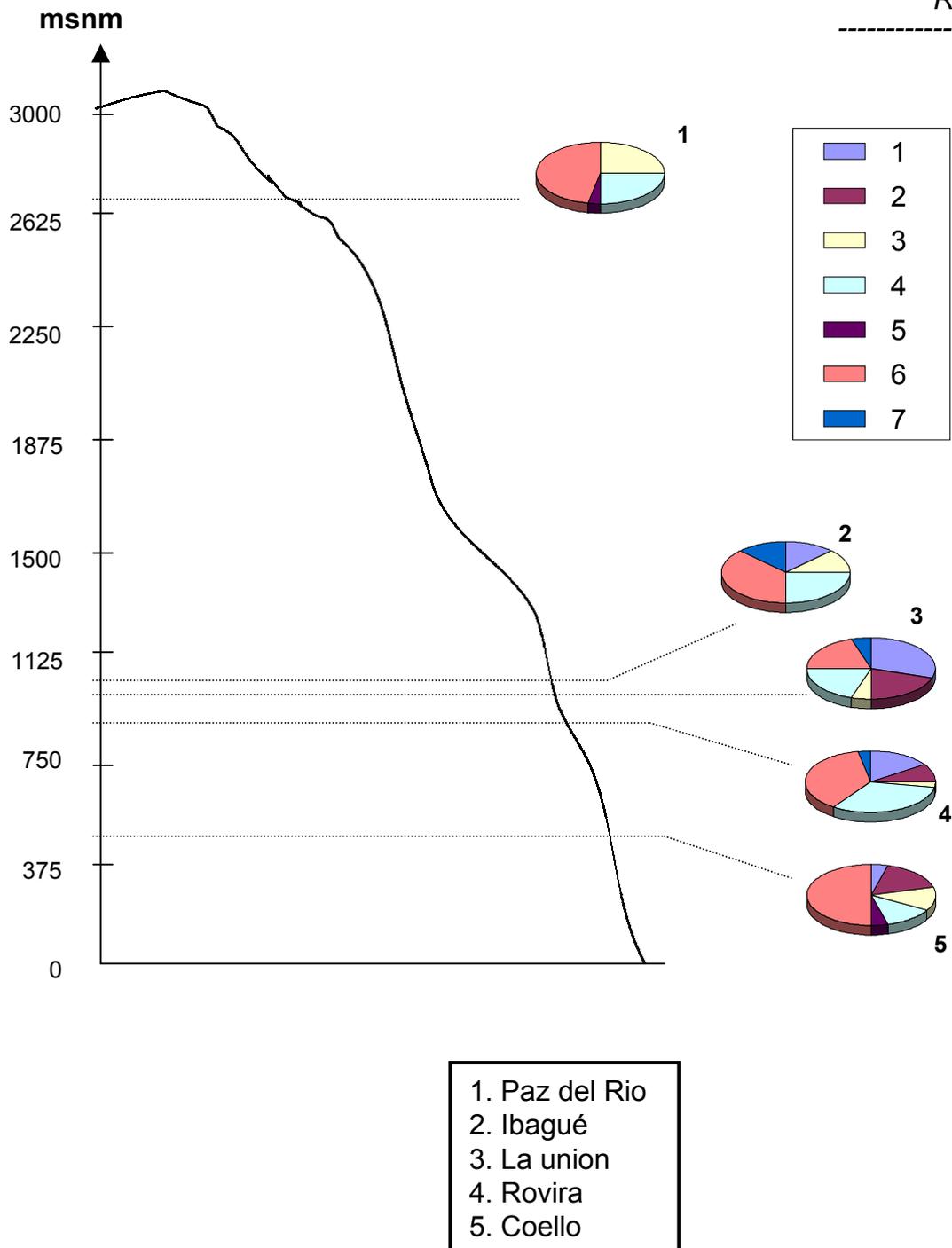


FIGURA 25. Distribuição das freqüências alélicas no loco A43 em amostras da Colômbia de diferentes altitudes.

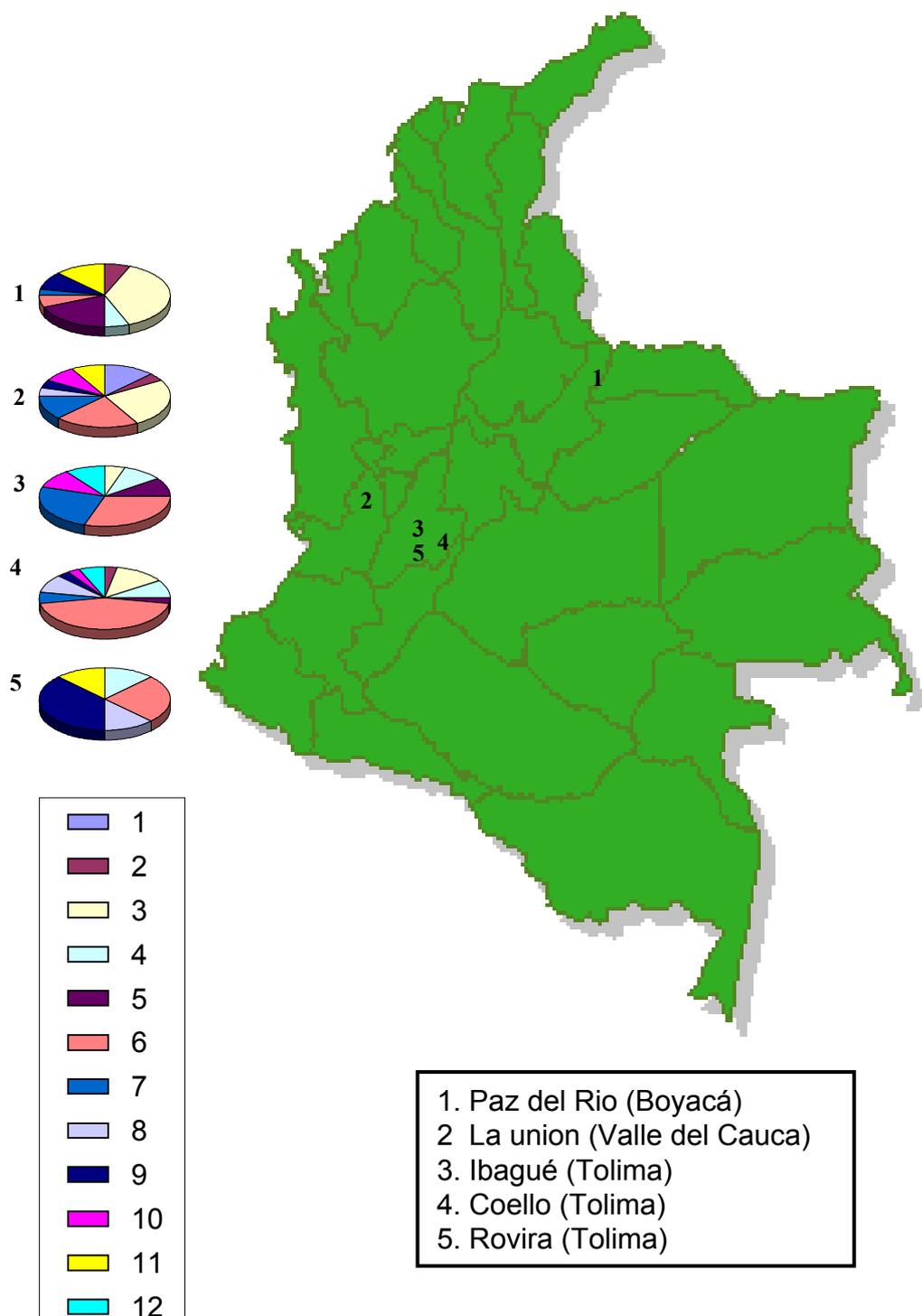


FIGURA 26. Distribuição latitudinal das freqüências alélicas no loco *RJP57-1* em amostras da Colômbia.

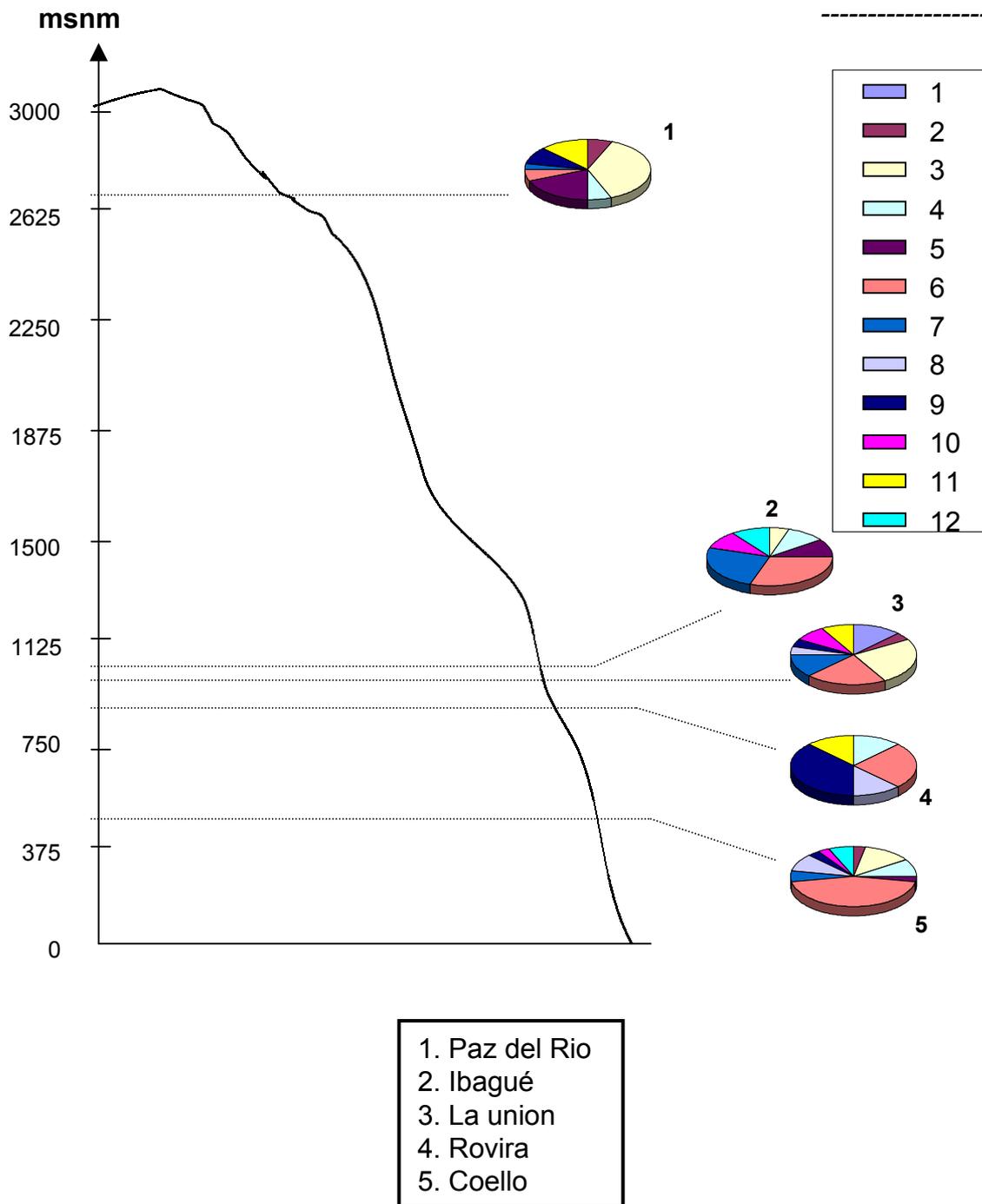


FIGURA 27. Distribuição das freqüências alélicas no loco *RJP57-1* em amostras da Colômbia em diferentes altitudes.

5. DISCUSSÃO

Em decorrência do processo de Africanização, diversos autores propuseram inicialmente que a composição genética das abelhas presentes no continente Americano não era apenas “Africanizada”, mas que as abelhas residentes haviam sido totalmente substituídas pelas suas similares Africanas (TAYLOR, 1985). Esta suposição sugeria que as abelhas Européias não haviam contribuído significativamente para o “pool” gênico das populações Africanizadas e, portanto, deveriam ser chamadas simplesmente de “Africanas” (HALL e MURALIDHARAN, 1989; SMITH *et al.*, 1989).

Posteriormente, pela utilização de marcadores moleculares, começou-se a evidenciar a introgressão de genes Africanos e Europeus. Dentre os marcadores moleculares que indicavam tal mistura racial na composição genética encontramos as análises alozímicas.

Os dois locos polimórficos analisados neste trabalho, *Hk-1* e *Mdh-1*, são úteis para determinar a composição genética de populações de abelhas, pois são capazes de diferenciar as populações Africanas das Européias ou de indicar a presença de genes pertencentes a uma ou outra subespécie.

Inicialmente, acreditava-se que o loco *Hk-1* fosse monomórfico (SHEPPARD e BERLOCHER, 1984; SHEPPARD e McPHERON, 1986). Entretanto, o trabalho de DEL LAMA *et al.* (1988) demonstrou a existência de polimorfismo nas abelhas Africanizadas. Neste trabalho, as duas variantes conhecidas de *Hk-1* foram encontradas em todas as amostras: $Hk-1^{100}$ (ou F) e $Hk-1^{87}$ (ou S). Uma terceira variante foi recentemente detectada neste laboratório, denominada $Hk-1^{92}$ (M). A detecção desta variante se deu graças à utilização de tampão tris-citrato pH 7.5 utilizando uma diluição de 10x na preparação do tampão do gel. Esta nova variante apresentou uma frequência menor que as duas anteriores (de 0.021 a 0.241), mas mostrou-se presente na maioria das localidades amostradas. Enquanto a variante F está fixada em populações Européias, as variantes M e S parecem ocorrer somente em amostras Africanizadas, indicando sua possível

origem a partir da introdução de *Apis mellifera scutellata* no Brasil. Estas variantes constituem, portanto, excelentes rastreadores de genes *scutellata* em populações resultantes da hibridização (DEL LAMA *et al.*, 1988). As variantes F e M+S apresentaram freqüências próximas a 50% nas populações analisadas neste trabalho, não permitindo uma maior diferenciação genética entre elas.

O segundo polimorfismo bioquímico, Mdh-1, foi inicialmente descrito por CONTEL *et al.*, (1977). Estes autores demonstraram a existência de três alelos codominantes determinando as três variantes principais: *Mdh-1 A*, *B* e *C*, posteriormente denominadas *F*, *M* e *S*, respectivamente. Das cinco variantes de *Mdh-1* já descritas em *Apis mellifera*, somente três são comumente observadas: *Mdh-1* 100 ou *F* (fast), *Mdh-1* 80 ou *M* (medium) e *Mdh-1* 65 ou *S* (slow). Os alelos que determinam tais variantes apresentam uma distribuição muito distinta em diferentes subespécies. As variantes *F* e *M* encontram-se praticamente fixadas em *Apis mellifera scutellata* e *Apis mellifera mellifera* (Europa Oriental), respectivamente. Por outro lado, as populações do leste da Europa (*Apis mellifera ligustica*) apresentam as variantes *F* (em maior freqüência) e *S*; esta última, portanto, pode ser considerada um marcador bioquímico desta raça. Assim, os alelos deste loco são capazes de diferenciar as três subespécies mais importantes de *Apis mellifera* que formaram o pool “Africanizado”, caracterizando o loco como “loco diagnóstico”. Por sua vez, o loco *Hk-1* é um bom rastreador de genes Africanos, mas não diferencia as subespécies Européias.

As análises alozímicas evidenciaram uma alta freqüência da variante Mdh-1 *F* nas amostras analisadas, apresentando uma freqüência até 95,8% na amostra de Parque Tairona, situada a uma altitude de 15 m. Entretanto, esta freqüência foi diminuindo à medida que a altitude aumentava, observando-se um incremento acentuado da freqüência do alelo *M* até atingir 67,7% na localidade de Paz Del Rio, localidade situada a 2650 m de altitude. Resultado similar foi observado na amostra proveniente de Guasca, situada a 2800 m de altitude, que apresentou uma freqüência do alelo *M* de 49,4%. A localidade de Sierra Nevada apresentou um resultado discrepante em relação às demais amostras ao apresentar uma

freqüência do alelo F muito alta (80%). A variante S, presente em somente algumas amostras, apresentou freqüências não superiores a 9%.

De acordo com o gradiente altitudinal verificado para as demais localidades, era esperado que Sierra Nevada, por estar localizada a 3000 m, apresentasse uma alta freqüência do alelo M. Este achado pode ser explicado devido ao fato de que, nesta altitude, os apicultores realizam transferências de colméias provenientes de localidades de clima mais quente e baixas altitudes para localidades muito altas e de climas mais frios. Este procedimento é conhecido comumente na Colômbia como “transhumancia” ou transferência seletiva de colônias de um lugar para outro, em procura de melhores condições ambientais e períodos de floração, para obter um maior aproveitamento na produção de mel e seus subprodutos.

Ao comparar nossos dados referentes à Hk e Mdh, uma diferença significativa deve ser ressaltada quanto aos dados das amostras provenientes de localidades mais elevadas, como Guasca, Paz Del Rio e Mosquera. Estas amostras apresentaram uma freqüência elevada do alelo *Mdh-1* M em relação às demais amostras, embora esta diferença não tenha sido observada para a freqüência do alelo *Hk-1* S (Africano). Este incremento da freqüência da *Mdh-1* M, não acompanhado do aumento da freqüência de *Hk-1* S, pode ser explicado pela neutralidade deste marcador, contrastando com o efeito da seleção sobre as variantes de Mdh.

De acordo com nossos resultados, podemos observar um gradiente altitudinal nos fenótipos de Mdh-1, onde a freqüência do alelo M aumenta proporcionalmente com a altitude em detrimento do alelo F, verificado através do coeficiente de correlação entre os dois parâmetros e a altitude e temperatura ($r = 0,96$). Este fato deve estar intimamente associado à diminuição da temperatura em altas latitudes, o que indica a atuação de uma força seletiva sobre as alozimas codificadas por este loco. O marcador Hk-1 não apresenta a mesma característica, o que indica que ele não está sob seleção. Não foi verificada correlação entre latitude e freqüências alélicas de *Hk-1* e *Mdh-1*.

Os resultados obtidos por SALAMANCA *et al.* (1998) e VARGAS & SALAMANCA (1999) por meio de análises morfométricas realizadas em amostras de abelhas dos departamentos de Tolima e Boyacá na Colômbia confirmam este possível gradiente altitudinal. Do total das amostras do Tolima, 5.1% mostraram ser híbridos com alta proporção de genes europeus, enquanto 68.2% são híbridos Africanizados e 26.7% expressam um alto caráter híbrido Africanizado. No departamento de Boyacá, o processo de Africanização ocorreu de forma parcialmente diferente devido a diferenças na temperatura e altitude deste departamento.

Diferentes autores apresentam evidências de fatores seletivos especialmente agindo sobre as formas protéicas codificadas pelos alelos de *Mdh-1*. Uma linha de evidência é a verificação da distribuição das freqüências alélicas segundo um gradiente de latitude correlacionado à temperatura; a segunda abordagem é a associação da atividade enzimática destas variantes e suas termoestabilidades. Cabe notar que estas duas abordagens estão intimamente relacionadas e foram também consideradas em muitos estudos relativos ao tema, como no caso de gradientes latitudinais em organismos como *Drosophila*.

O primeiro trabalho que evidenciou um gradiente latitudinal para *Mdh-1* foi realizado por BADINO *et al.* (1984) em diferentes populações da Europa. Neste trabalho, foi observada a presença de um gradiente dos alelos *Mdh-1S* e *F* com a latitude dos locais de amostragem, verificando-se que a aumento desta estava associado a um aumento da freqüência do alelo *S*. Além disso, foi evidenciada também uma correlação negativa entre a latitude e temperatura destas localidades. NDIRITU *et al.* (1986), estudando diferentes populações da África, encontraram polimorfismo de *Mdh-1*, apresentando uma freqüência elevada do alelo *F* em relação às formas *M* e *S*. LOBO *et al.* (1989) e DEL LAMA *et al.* (1990), estudando diferentes populações Africanizadas de *Apis mellifera* do Brasil e Uruguai, observaram um comportamento clinal na freqüência do alelo *M*, apresentando um aumento gradativo de freqüência na direção sul.

A termoestabilidade diferencial das variantes de *Mdh-1* foi estudada por CORNUET *et al.* (1995), demonstrando que as variantes alélicas desta proteína teriam um papel adaptativo graças às diferenças na cinética enzimática que as variantes S e F apresentam - a variante S estaria mais adaptada ao frio em relação à variante F, mais freqüente em climas mais quentes.

Foi demonstrado por VILLA *et al.* (1993) que as abelhas Africanizadas possuem uma menor resistência a baixas temperaturas que as abelhas Européias. O alelo F pode constituir, então, um exemplo de “efeito carona” com outros genes que teriam sido rapidamente selecionados por conferir maior aptidão das abelhas Africanizadas em regiões tropicais e subtropicais (LOBO e KRIEGER, 1992). Esta hipótese pode ser sustentada considerando as baixas freqüências iniciais dos genes Africanos que iniciaram a Africanização (somente 26 rainhas) e a limitada introgressão dos genes Europeus nestas populações, revelada pela freqüência dos alelos de *Mdh-1* e pelo predomínio de uma morfometria e haplótipos mitocondriais Africanos (ROTTA, 1999).

Todas estas observações realizadas em diferentes populações de *Apis mellifera* e condições ambientais diferentes são corroboradas com os postulados de HEINRICH (1980) e COELHO & MITTON (1988). Os autores acreditam que uma das possíveis explicações para o comportamento clinal de *Mdh-1* poderia ser a conseqüência de uma adaptação metabólica em função da latitude e sua conseqüente diminuição com a temperatura. Estes autores sugerem que abelhas com a variante S apresentam menor taxa metabólica, consumindo menor O₂ durante o vôo do inseto, pois durante o batimento alar a musculatura pode atingir em torno de 50°C, aumentando o consumo de O₂. Dessa forma os alelos *Mdh-1 F* e S teriam um papel adaptativo, apresentando cinéticas diferentes dependendo da temperatura. Estas observações sustentam que as freqüências alélicas de *Mdh-1* são mantidas por seleção (HATTY & OLDROYD, 1999; DEL LAMA *et al.*, 2004).

Portanto, nossos dados reforçam a idéia da atuação de forças seletivas sobre os alelos da *Mdh-1*. Nossos dados apresentam uma vantagem em relação a estudos similares, pois as diferenças altitudinais na Colômbia são muito fortes de uma região para outra devido à presença dos Andes. O país apresenta ainda uma quantidade exuberante de ecossistemas, além de ter sido o ponto obrigatório de passagem dos enxames Africanizados para a América Central e do Norte.

Comparando as freqüências dos três alelos de *Mdh-1* com as apresentadas em outros países (Tabela 18), podemos observar que não há diferenças significativas entre tais freqüências, o que indica uma alta similaridade entre as abelhas Africanizadas destes países.

De modo geral, a grande contribuição de genes Africanos na formação das abelhas Africanizadas, indicada pela alta freqüência do alelo *Mdh-1 F*, confirma o alto grau de Africanização das abelhas da Colômbia. Os alelos *Mdh-1 M* e *Mdh-1 S* indicam uma contribuição, mas em menor proporção, das subespécies *A. m. mellifera* e *A. m. ligustica* para este híbrido.

As relações de herança dos alelos de *Hk-1* e *Mdh-1* podem ser melhor compreendidas quando é verificado o desequilíbrio de ligação (DL) ou desequilíbrio gamético. De acordo com FUTUYMA (1992), os fatores que implicam em “excesso gamético” ou em “desequilíbrio de ligação” são os seguintes: i) quando os alelos não estão combinados ao acaso, ou seja, determinados alelos de certos locos são herdados juntos como se fossem um único loco ou um supergene, como no caso das inversões cromossômicas, apresentando uma ligação física que só raramente é quebrada por recombinação cromossômica; ii) quando os alelos de um dos locos estão sobre pressão seletiva, deriva gênica ou organismos que apresentam reprodução assexuada, o desequilíbrio também é normalmente marcante. Com exceção da localidade de Tierra Firme, as distintas populações da Colômbia não apresentaram indícios da ocorrência de desequilíbrio de ligação, demonstrando que o processo de Africanização possivelmente deve ter sido completado.

TABELA 18. Comparação entre as freqüências dos alelos de *Mdh-1* encontradas na Colômbia e as reportadas em diferentes países.

País	<i>Mdh-1</i>		
	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>S</i>
Colômbia	0,729	0,244	0,028
Yucatán 1996 ¹	0,833	0,120	0,046
Brasil ²	0,780	0,180	0,040
Brasil ³	0,798	0,146	0,056
Costa Rica ⁴	0,827	0,128	0,045

¹ QUEZADA-EUÁN (2000)

² SHEPPARD, *et al.*, (1991)

³ ROTTA (1999)

⁴ LOBO (1995)

Nossos resultados permitiram constatar também que as populações da Colômbia são bastante heterogêneas, diferindo significativamente nas frequências alélicas de *Hk-1* e *Mdh-1*, e devem ser consideradas como um conjunto de subpopulações distintas, de acordo com o valor apresentado para o χ^2 de homogeneidade. De forma semelhante, os resultados da Estatística-F de WRIGHT para os dois locos evidenciam que as populações amostradas da Colômbia podem ser consideradas como populações subdivididas (F_{st} significativo). Entretanto, elas não apresentam níveis significativos de endogamia ou endocruzamento de acordo com o valor de F_{is} estimado, corroborando as análises de equilíbrio genético.

Os resultados obtidos a partir do DNA mitocondrial fornecem dados adicionais quanto à estrutura genética das populações estudadas. Na análise do loco mitocondrial *16S (Dra I)*, os resultados evidenciaram um predomínio do padrão Africano (87,5%) sobre o Europeu, mas comparativamente inferior ao valor médio observado para as 30 populações distribuídas por todo o território Brasileiro (ROTTA, 1999; FERREIRA, 2002; DINIZ *et al.* 2003). Este achado pode ser devido a que as localidades de Suba, Mosquera e Acopi são apiários comerciais em que, freqüentemente, são importadas rainhas de origem Européia (principalmente *ligustica* e *carnica*) para serem acasaladas com zangões Africanizados. Descartando-se essas localidades, o padrão Africano passaria a representar 97% do padrão das colônias, valor muito similar ao verificado nas amostras do Brasil.

Não foi observado um gradiente altitudinal ou latitudinal para estes haplótipos mitocondriais, o que evidencia que as abelhas de origem materna “Africana” na Colômbia têm a capacidade de exploração e adaptação a ambientes diversos, incluindo os de grandes altitudes e, por conseqüência, temperaturas muito baixas. Este fato pode ser devido a que a Colômbia apresenta uma geografia característica de ecossistemas andinos, onde a distâncias relativamente curtas, as condições ambientais (temperatura, pressão, umidade relativa, etc) são

muito diferentes, apresentando forte seleção sobre os organismos que ali habitam.

QUEZADA–EUÁN *et al.* (2003), através de análise morfométrica e da região COI – rRNA, compreendendo 1028-954 pb do DNA mitocondrial, em amostras de *Apis mellifera* do Peru evidenciaram que os morfotipos e mitótipos Africanos são predominantes em baixas altitudes nas regiões tropicais, com uma possível zona de hibridação nas altas altitudes das montanhas dos Andes. Uma das possíveis causas deste fenômeno - o deslocamento de abelhas Européias - pode ser a superioridade competitiva das abelhas do tipo Africano no Neotrópico (HALL, 1990, 1999; SMITH, 1991). Entretanto, esta abelha pode apresentar uma competitividade equilibrada em zonas de transição entre habitats tropicais e temperados. Este fato é corroborado por diferentes estudos em populações Americanas, evidenciando-se um limite latitudinal, tanto na Argentina como nos Estados Unidos, no processo de Africanização. Na Argentina, por exemplo, a frequência de DNAmít “Africano” é de 88% nas populações do norte, 15% no sul (onde é considerada uma zona livre de abelha Africanizada), e 71% na região central ou zona de transição (KERR *et al.* 1982; SHEPPARD *et al.*, 1991).

Nas análises para a região intergênica CO I – CO II digerido com *Dra* I, dos oito padrões observados em nosso trabalho, o haplótipo “Africano” B/B*, detectado em somente um indivíduo, não apresenta correspondência com os encontrados no Brasil por FERREIRA (2000). Além disso, na Colômbia coexistem dois padrões haplotípicos “*ligustica*”, D/C e D*/C* (confirmados pela análise do loco 16S – sítios *Dra* I), em igual frequência, similarmente ao encontrado em amostras do Chile (SOUZA, 2002). Análises da região intergênica CO I – CO II utilizando a enzima de restrição *Dra* I são bastante utilizadas na diferenciação de subespécies de *Apis mellifera* no mundo. Baseado no trabalho de GARNERY *et al.* (1993), pode-se diferenciar padrões característicos de diferentes subespécies em várias regiões (DE LA RÚA *et al.*, 1998; FRANCK *et al.*, 1998, 2001).

Concluído o processo de Africanização, postulou-se inicialmente que as colônias de *Apis mellifera* presentes no continente Americano possuíssem exclusivamente o padrão *scutellata*. SHEPPARD *et al.* (1999), analisando a

região intergênica CO I – CO II, demonstraram que a origem Africana do DNA mitocondrial de parte destas abelhas não era *scutellata*, mas *intermissa*, padrão característico das abelhas do norte da África e Península Ibérica. Este achado pode ser interpretado como uma significativa contribuição genética das linhagens originais trazidas pelos colonizadores, provenientes da Península Ibérica, e não das abelhas introduzidas do sul da África que deram início ao processo de Africanização.

A possível correspondência entre nossos haplótipos e os descritos por GARNERY *et al.* (1993) pode ser assim estabelecida: B/B = A4; B/G = A9; C/A = A1; D/C = C1. Os haplótipos A/D, B/E e B/B* parecem não ter correspondência com os descritos pelos autores e, possivelmente, correspondem a haplótipos ainda não descritos. A correspondência entre tais haplótipos está sendo confirmada pela análise da seqüência nucleotídica dos respectivos fragmentos (Thais Collet, informação pessoal), em especial do haplótipo B/B* observado somente em uma colônia da Colômbia. Os padrões de tamanho/restricção C/A (43,2%) e B/B (39,9%) para a região intergênica CO I – CO II demonstraram ser os mais freqüentes nas populações de *Apis mellifera* da Colômbia. Este resultado é similar ao observado para as diferentes localidades amostradas do Brasil e Uruguai por FERREIRA (2002), que encontrou os valores de 68,7% e 25,1% para os padrões B/B e C/A, respectivamente (ver Tabela 19).

Considerando a distribuição destes haplótipos descrita por GARNERY *et al.* (1993) é interessante ressaltar a presença tanto na Colômbia como no Brasil dos haplótipos A4 e A1 em freqüências elevadas, sugerindo a provável ancestralidade Africana destas abelhas. O mitótipo A4 apresenta baixa freqüência no Marrocos e Espanha e alta freqüência no sul da África (*monticola*, *capensis* e, principalmente, *scutellata*) (GARNERY *et al.* 1993, 1995; FRANCK *et al.*, 1998). O padrão A1 foi observado em abelhas do sul da Espanha e norte da África em baixa freqüência, em regiões ocupadas pela subespécie *intermissa*. Um fato interessante é que de todos os mitótipos Africanos, A4 é o mais freqüente (81%) entre as abelhas do sul da África (CLARKE *et al.*, 2001; FRANCK *et al.*, 2001; DE LA RÚA *et al.*, 2002).

TABELA 19. Comparação (valores em % na linha inferior) entre os padrões de DNA mitocondrial da região intergênica CO I – CO II verificados em operárias adultas de *Apis mellifera* analisadas do Brasil, Uruguai e Colômbia (N = número de colônias).

País	N	Região CO I – CO II (sítios <i>Dra I</i>)									
		A/B	A/D	B/B	B/E	B/G	B/H	B/B*	C/A	D/C	D*/C*
Brasil** %	517	2 0,3	3 0,6	355 68,7	5 1	16 3,1			130 25,1	6 1,2	
Uruguai** %	50		1 2	34 68	1 2	5 10	1 2		4 8	4 8	
Colômbia %	319		4 1,4	127 39,9	11 3,4	1 0,3		1 0,3	138 43,2	18 5,6	19 5,9
Total	886	2	8	516	17	22	1	2	269	28	19

** dados de FERREIRA (2000) e COLETT (comunicação pessoal).

Este fato revela que mais de 43% do DNAmít “Africano” encontrado em populações Africanizadas da Colômbia podem ser derivados de fontes não relacionadas a *A. m. scutellata*. Além disso, a diminuição da frequência do padrão B/B e o aumento de C/A na Colômbia podem ser explicados pela diluição do padrão B/B (A4) em seu avanço do Brasil para o norte do continente Americano no processo de Africanização. Este fato é corroborado por FRANCK *et al.* (1998) e CLARKE *et al.* (2001, 2002) no México, onde o haplótipo A1 é duas vezes mais freqüente que o A4. Na Venezuela, ocorre a presença em maior proporção do padrão A4 (59%) em relação ao padrão A1 (41%) (CLARKE *et al.* 2001). Este comportamento pode ser explicado por uma possível introdução isolada de abelhas do sul da África na Venezuela em 1974 (KERR *et al.*, 1982), aumentando a frequência do mitótipo A4.

A detecção de padrões mitocondriais outros que *scutellata* recoloca a questão da assimetria entre os genes mitocondriais e nucleares. Esta assimetria é observada especificamente em relação à alta frequência do alelo *Mdh-1 M*, praticamente fixado em *Apis mellifera mellifera*, associada à ausência do haplótipo mitocondrial correspondente nas abelhas africanizadas do Brasil. De acordo com LOBO e KRIEGER (1992, 2000) e FRANCK *et al.* (1998), a difusão do DNAmít Africano nas Américas não corresponde necessariamente à “Africanização” do genoma nuclear.

A associação dos haplótipos mitocondriais encontrados para CO I – CO II (sítios *Dra I*), COI (sítios *Taq I*) e CO I (sítios *Bcl I*) evidencia um inesperado número elevado de haplótipos (27), dos quais somente dois são do tipo *ligustica*. Este fato pode indicar que as abelhas Africanizadas da Colômbia são constituídas de diversas linhagens maternas, não só as originadas dos enxames provenientes do Brasil, mas de novas introduções feitas pelos apicultores do tipo europeu.

Um alto número de alelos foi encontrado para o loco microsatélite A43, entre 17 a 35 alelos diferentes (com 122 a 197 pb) observados na África, Europa (FRANCK *et al.*, 1998, 2001; CLARKE, *et al.*, 2002; ESTOUP *et al.*, 1994, 1995a) e em alguns países do continente Americano, como México e Venezuela. Pode-

se observar que a maioria dos alelos observados encontra-se no continente Africano e tal variabilidade é refletida nos achados em amostras da América.

Considerando a pequena amostra analisada neste trabalho (5 localidades), observa-se uma significativa variabilidade no loco *A43* nestas populações da Colômbia, refletindo parcialmente o pool gênico que foi introduzido no continente Americano.

Sabe-se que os microsátélites não são usualmente regiões expressas, conferindo uma neutralidade adaptativa para estes locos. Uns dos poucos microsátélites que sabidamente é expresso é o loco *RJP57-1* que codifica uma das proteínas principais da geléia real, fator crítico no processo de determinação de castas em *Apis mellifera*. Devido a esta característica, análises populacionais com este microsátélite podem gerar informações interessantes sobre a distribuição de freqüências alélicas, uma vez que este loco pode estar sobre efeito da seleção. Infelizmente, a inexistência de dados relativos a este loco em outras populações não auxilia na interpretação de nossos dados, embora os achados preliminares demonstrem que se trata de um importante marcador para estudos populacionais.

Os achados relativos aos locos microsátélites, ainda que preliminares, suportam fortemente que tais marcadores deverão contribuir significativamente para o melhor conhecimento da estrutura genética das populações Africanizadas. A dinâmica da introgressão dos alelos Africanos nas populações Européias residentes e os possíveis efeitos da deriva e seleção à medida que os enxames Africanizados se deslocavam para ocupar novas áreas só serão integralmente conhecidos quando a morfometria, as alozimas, os padrões mitocondriais e os microsátélites destes populações tiverem sido determinados.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho que merecem ser ressaltados são:

- a) As populações de *Apis mellifera* da Colômbia estão constituídas principalmente por genes característicos da subespécie *Apis mellifera scutellata* e, em menor proporção, de genes da subespécie *Apis mellifera mellifera*; a contribuição da subespécie *Apis mellifera ligustica*, considerando o marcador nuclear *Mdh-1*, parece ser muito pequena ou inexistente;
- b) O gradiente altitudinal apresentado leva a supor a existência de um fator seletivo atuando sobre os fenótipos de *Mdh-1*, pois é pouco provável que o acaso seja responsável pelos resultados observados. Este fator seletivo está diretamente relacionado à concentração de oxigênio e diminuição da temperatura em função do incremento da altitude, como demonstrado por diferentes autores;
- c) Não se observa um gradiente latitudinal sobre os fenótipos de *Hk-1* ou *Mdh-1*;
- d) A análise alozímica permitiu demonstrar que as populações de abelhas Africanizadas da Colômbia são heterogêneas, apresentando níveis distintos de introgressão dos genes Africanos nas populações Europeias residentes;
- e) Considerando que as populações de abelhas da Colômbia encontram-se em equilíbrio genético de acordo com o modelo de Hardy-Weinberg e que não apresentam desequilíbrio de ligação para os locos *Hk-1* e *Mdh-1*,

podemos concluir que o processo de Africanização possivelmente deve ter sido completado na Colômbia.

- e) De acordo com a estatística F de Wright, as populações de *Apis mellifera* da Colômbia são bastante heterogêneas, fato evidenciado para marcadores alozímicos, comprovando que as populações amostradas não podem ser consideradas como uma única população (F_{st}). Por esta razão, apresentam baixos números de migrantes ($N_m = 6.1$ para *Hk-1* e $N_m = 2,5$ para *Mdh-1*). Além disso, não apresentam níveis significativos de endogamia (F_{is}), confirmando os dados de equilíbrio de Hardy-Weinberg;
- f) A análise da região 16S do DNA mitocondrial evidenciou a presença quase exclusiva do padrão Africano nas abelhas da Colômbia, resultado similar ao observado no Brasil e Uruguai;
- g) O aumento de frequência do haplótipo A1 (C/A) para a região intergênica CO I – CO II em amostras da Colômbia está associado à diminuição do padrão A4 (B/B) em seu avanço do Brasil para o norte do continente Americano no decorrer do processo de Africanização;
- h) Considerando os resultados para as três regiões do DNA mitocondrial estudadas (16S, região intergênica CO I – CO I e CO I), um número elevado de haplótipos foi observado, indicando uma origem materna muito heterogênea destas colônias;
- i) Os haplótipos do DNA mitocondrial observados não estão distribuídos segundo um gradiente latitudinal ou altitudinal, o que indica que as colônias com DNA mitocondrial “Africano” têm a capacidade de exploração e adaptação a ambientes diversos da Colômbia, incluindo os de grandes altitudes, e por conseqüência, temperaturas muito baixas.

- j) As análises de dois locos microsatélites evidenciaram a ocorrência de 7 e 12 alelos para os locos *A43* e *RJP57-1*, cujos tamanhos variaram entre 125-150 pb e 400-600 pb, respectivamente. Este elevado número de alelos recomenda fortemente a utilização deste marcador nos estudos populacionais das abelhas Africanizadas;

Considerando estes achados, este trabalho permite concluir que as populações de abelhas da Colômbia são muito similares em sua composição genética, tanto no DNA nuclear como no mitocondrial, às populações encontradas no norte do Brasil. Como consequência, permite dizer que as populações Européias ali residentes antes da chegada dos enxames Africanizados tiveram um pequeno impacto na redução do grau de Africanização destes enxames.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALPATOV, W.W. Biometrical studies on variation and races of the honeybee. **Quart. Rev. Biol.** V. 4, p. 1 – 58, 1929.
- ARANJO, R.E. Estratégias a seguir en las zonas afectadas por la invasión de las “abejas africanizadas”. **Programa de desarrollo y diversificación de zonas-proyecto en especies menores**. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, pp. 1-10, 1990.
- ARIAS, M.C. & INFANTE-MALACHIAS, M.E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In: MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: HOLOS, 2001. 202 p.
- ARIAS, M. C. & SHEPPARD, W. S. Molecular phylogenetics of Honey Bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. **Mol. Phylogenet. Evol.** v. 5, n. 3. June, p. 557-566, 1996.
- ARNOLD, G.; QUENET, B. CORNUET, J-M.; MASSON, C.; DE SCHEPPER, B.; ESTOUP, A. & GASQUI, P. Kin recognition in honeybees. **Nature**. v. 379. n.8 February. p 498, 1996.
- AYRES, M.; AYRES, M. Jr.; AYRES, D.L. e DOS SANTOS, A.S. **BioEstat 2.0**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamiravá; Brasília. CNPq, 2000. 272 p.
- BADINO, G. CELEBRANO, G AND MARINO, A. Population structure and *Mdh – 1* locus variation in *Apis mellifera ligustica*. **J. Hered.** V.74, p.443-446, 1983.

- _____. Population genetics of Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica* Spin.) and relationships with neighboring subspecies. **Boll. Mus. Reg. Sci. Nat.** Torino. v. 2, p. 571-584, 1984.
- BAUDRY, E.; SOLIGNAC, M.; GARNERY, L.; GRIES, M.; CORNUET, J-M. & KOENIGER, N. Relatedness among honeybees (*Apis mellifera*) of a drone congregation. **Proc. R. Soc. Lond. B.** v. 265, p. 2009-2014, 1998.
- BEIGUELMAN, B. **Genética Médica** - Dinâmica dos genes nas populações e nas famílias. Edart. SP, 1977. 389 pp.
- BEYE, M.; NEUMANN, P.; SHMITZOVA, J.; KLAUDINY, J.; ALBERT, S.; SIMUTH, J.; FELDER, M & MORITZ, R. F. A. A simple, non-radioactive DNA fringerprinting method for identifyng patriline in honeybee colonies. **Apidologie**, v. 29. p. 255-263, 1998.
- BIASIOLO, A. & CAMPARINI, A. Esterase-6 locus, a new enzyme polymorphism in *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 21. p. 123-126, 1990.
- BITONDI, M. & MESTRINER, M.A. Esterase isozymes of *Apis mellifera*: substrate and inhibition characteristics, developmental ontogeny and electrophoretic variability. **Biochem. Genet.** v. 21, p. 985-1002, 1983.
- BOREHAM, M.M. & ROUBIK, D.W. Population change and control of africanized honeybees (Hymenoptera: Apoidea) in the Panama canal area. **Bull. ESA. USA:** 34-39, 1987.
- BROWN, W.M. **Evolution of Animal Mitochondrial DNA.** *In:* EVOLUTION OF GENES AND PROTEINS, ed. M. Nei, R.K. Koehn, pp. 62-88, 1983.

- BUTLER, C.G. The Honey bee colony - life history. In: **The hive and the Honey Bee**, Dadent & Sons ed. Hamilton, Illinois, p. 39-74. 1975.
- CANOVAS, F.; DE LA RUA, P.; SERRANO, J. AND GALIAN, J. Variabilidad del AND mitocondrial en poblaciones de *Apis mellifera iberica* de Galicia (NW España). **Arch. Zootec.** v. 51, p. 441-448, 2002.
- CLARKE, K. E.; OLDROYD, B. P.; QUEZADA-EUÁN, J. G. & RINDERER, T. E. Origin of honeybees (*Apis mellifera* L.) from the Yucatan peninsula inferred from mitochondrial DNA analysis. **Mol. Ecol.** v.10, p.1347-1355, 2001.
- CLARKE, K. E.; RINDERER, T. E.; FRANCK, P.; QUEZADA-EUÁN, J. G. & OLDROYD, B. P. The africanization of honeybees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: A study of a massive hybridization Event Across Time. **Evolution.** V. 56, n.7, p. 1462 – 1474, 2002.
- COBEY, S. AND LAWRENCE, T. Status of the Africanized bee find in California. **Am. Bee J.**, v. 125, p. 607-711, 1985.
- COHELHO, J.R. & MITTON, J.B. Oxygen consumption during hovering is associated with genetic variation of enzymes in honey-bees. **Funct. Ecol.** v.2, p. 142-146, 1998.
- CONTEL, E.P.B.; MESTRINER, M.A.; MARTINS, E. Genetic control and developmental expression of malate deshydrogenase in *Apis mellifera*. **Biochem. Genet.** v. 15, p. 859-875, 1977.
- COURNET J.M. Population genetic. In: **Bee Genetics and Breeding** (Rinderer TE, ed) Academic Press, Orlando, FL, p. 235-253, 1986.

- CORNUET, J-M.; FRESNAYE, J. & TASSENCOURT, L. Discrimination et classification de populations d'abeilles a partir de caracteres biométriques. **Apidologie**. v.6, p. 145 – 187, 1975.
- CORNUET, J-M.; OLDROYD, B.P. & CROZIER, R.H. Unequal thermostability of allelic forms of malate dehydrogenase in honeybees. **J. Apic. Res.** v.34, p. 45-47, 1995.
- DALY, H.V. & BALLING, S.S. Identification of Africanized honeybee in the western hemisphere by discriminat analysis. **J. Kans. Entomol. Soc.** v.51, p. 857-869, 1978.
- DE LA RUA, P.; SERRANO, J. AND GALIAN, J. Mitochondrial DNA variability in the Canary Islands honeybees (*Apis mellifera* L.) **Mol. Ecol.**, v.7, p. 1543-1547, 1998.
- DE LA RUA, P.; GALIAN, J. AND SERRANO, J. Variabilidad del DNA mitocondrial en poblaciones de abejas de miel (*Apis mellifera* L.) de la región de Murcia. **Invest. Agr. Prod. San. Anim.** v.14, p. 41-49, 1999.
- DE LA RUA, P.; GALIAN, J. SERRANO, J. AND MORITZ, R.F.A. Genetic structure and distinctness of *apis mellifera* l. populations from the Canary islands. **Mol. Ecol.**, v. 10, p.1733-1742, 2001.
- DE LA RUA, P.; SERRANO, J. AND GALIAN, J. Biodiversity of *Apis mellifera* populations from Tenerife (Canary Islands) and hybridization with east European races. **Biodiv. Conserv.** v.11, p. 59-67, 2002.

- DE JONG, D. O comportamento das abelhas africanizadas nas Américas. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 1, 1994, Ribeirão Preto. **Anais... Ribeirão Preto**: Universidade de São Paulo. p.80-87, 1994.
- DEL LAMA, M. A.; MESTRINER, M. A & PAIVA. J.C.A. Est-5 and Pgm-1: new polymorphisms in *Apis mellifera*. **Rev. Bras. Genet.** v. 8, p. 17-27, 1985a.
- DEL LAMA, M. A.; SOARES, A. & MESTRINER, M. A. Linkage studies in *Apis mellifera* using biochemical and morphological markers. **J. Hered.**, v. 76, p. 427-430, 1985b.
- DEL LAMA, M. A.; FIGUEREIDO, R. A; SOARES, A. E. E. & DEL LAMA, S.N. Hexokinase polymorphisms in *Apis mellifera* and its use for africanized honeybee identification. **Rev. Bras. Genet.** v.11, p. 287-297, 1988.
- DEL LAMA, M. A.; LOBO, J.A. SOARES, A.E.E. & DEL LAMA, S.N. Genetic differentiation estimated by isozymic analysis of africanized honeybee populations from Brazil and from Central America. **Apidologie**, v.21, n.4, p. 271-280, 1990.
- DEL LAMA, M. A.; SOUZA, R.O.; DURAN, X.A.A. AND SOARES, A.E.E. Clinal variation and selection on MDH allozymes in honeybees in Chile. **Hereditas** v. 140, p.149-153, 2004.
- DINIZ, N. M.; SOARES, A. E. E.; SHEPPARD, W. S. & DEL LAMA, M.A. Genetic structure of honeybee populations from southern Brazil and Uruguay. **Genet. Mol. Biol.** v. 26, n.1, p. 47-52, 2003.
- DU PRAW, E.J. The recognition and handling of honeybee specimens in non-linear taxonomy. **J. Apic. Res.** v. 4, p. 71 – 84, 1965.

- EMBRAPA MEIO-NORTE. *Apis mellifera*. Sistema de produção. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/>>. Jan/2003.
- ESTOUP, A.; SOLIGNAC, M.; HARRY, M. & COUNET, J-M. Characterization of (GT)_n and (CT)_n Microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. **Nucl. Ac. Res.**, v. 21, p.1427-1431, 1993.
- ESTOUP, A.; SOLIGNAC, M.; & CORNUET, J-M. Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in honeybee colonies. **Proc. R. Soc. Lond. B.** v.258, p. 1-7, 1994.
- ESTOUP, A.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M. & CORNUET J-M. Microsatellite Variation Honeybee (*Apis mellifera* L.) Populations: Hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. **Genetics** v.140, p. 679-695, 1995a.
- ESTOUP, A.; TAILLIEZ, C.; CORNUET J-M. & SOLIGNAC, M. Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). **Mol. Biol. Evol.** v.12, n.6, p. 1074-1084, 1995b.
- FERGUSON, A.; MCGINNITY, P.; STONE, C.; CLIFFORD, S.; TAGGART, J.; CROSS, T.; COOKE, D.; BOURKE, E. The genetic impact of escaped farm Atlantic Salmon on natural populations. **Aquaculture**, Amsterdam, v.137, n.1-4, p.55-56, 1995.
- FERREIRA, K. M. **O Padrão africano do DNA mitocondrial das abelhas africanizadas do Brasil tem origem diversa de *Apis mellifera scutellata*?** 2002. 83p. Dissertação de Mestrado (genética e Evolução) – Programa de

Pós-graduação em Genética e Evolução. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos, S P, Brasil.

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de Marcadores moleculares em análise genética.** Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. Documento 20, 1998. 220 p.

FLETCHER, D.J.C. The African Bee, *Apis mellifera adansonii* In Africa. **Annu. Rev. Entomol.** v. 23, p.151-171, 1978.

FRANCK, P.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M. & CORNUET, J-M. The origin of west european subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. **Evolution**, v.52, n.4, p.1119-1134, 1998.

FRANCK, P.; COUSSY, H.; LE CONTE, Y.; SOLIGNAC, M. GARNERY, L. & CORNUET, J-M. Microsatellite analysis of sperm admixture in honeybee. **Insect Mol. Biol.** v.8. n.3, p. 419-421, 1999.

FRANCK, P.; GARNERY, L. & SOLIGNAC, M. Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the near east. **Apidologie**, v.31. p.167-180, 2000.

FRANCK, P.; GARNERY, L.; LOISEAU, A.; OLDROYD, B. P.; HEPBURN, H. R.; SOLIGNAC, M. & CORNUET, J-M. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. **Heredity** v.86. p.420-430, 2001.

FUTUYMA, D.J. **Biología Evolutiva.** Sociedade Brasileira de Genética. 2 ed., 1992. 631p.

- GARNERY, L.; CORNUET, J.M. & SOLIGNAC, M. Evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. **Mol. Ecol.** v.1, p.145-154, 1992.
- GARNERY, L.; SOLIGNAC, M.; CELEBRANO, G. & CORNUET, J.M. a simple test using restricted pcr-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. **Experientia** v.49, p. 1016-1020, 1993.
- GARNERY, L.; MOSSHINE, E.H. & CORNUET, J.M. Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations. **Mol. Ecol.**, v.4, p. 465-471, 1995.
- GAULD, I. & BOLTON, B. (eds). **The Hymenoptera**. (2nd. Ed). Oxford University Press. London. 1996.
- GOETZE, G. Studien zur variabilitat and vererbung der beharungscharaktere der honigbiene. **Dtsch. Imkerfurer**. v.15. 32p, 1941.
- GONÇALVES, L. S. Comments on the agressivensess of the Africanized bees in Brazil. **Am. Bee J.** v.144, n.12, p.448-450, 1974.
- _____. Retrospectiva sobre apicultura brasileira. In: SIMPÓSIO SOBRE APICULTURA, Jaboticabal. **Anais... Campinas: UNESP/ CATI / SBZ**, 1984. p. 56-70.
- _____. Abelhas africanizadas: uma praga ou um benefício para a apicultura brasileira?. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 2, 1996, Ribeirão Preto. **Anais... Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo**, 1996. p.165-170.

- _____. Principais impactos biológicos causados pela africanização das abelhas *Apis mellifera* e perspectivas da apicultura Brasileira. **Anais do III Encontro Sobre Abelhas**. Riberão Preto. USP- Campus Universitário. SP. Brasil. 1998. p: 31-36.
- GOULET. H. & HUBER, J.T. (Eds). **Hymenoptera of the world**: an identification guide to families. Agriculture Canada. Ottawa, 753p. 1993.
- HABERL, M. & TAUTZ, D. Paternity and maternity frequencies in *Apis mellifera sicula*. **Insectes Soc.** v.46, p. 37-145, 1999.
- HALL, H. G. DNA Differences found between Africanized and European honeybee. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** 83, p. 4874-4877, 1986.
- _____. Parental analysis of introgressive hybridization between African and European honeybees using nuclear DNA RFLPs. **Genetics** v.125, p.611-621, 1990.
- HALL, H. G. & MURALIDHARAN, K. Evidence from mitochondrial DNA that African honey bees spread as continuous maternal lineages. **Nature.** v. 339, p. 211-213, 1989.
- HALL, H. G. & McMICHEL, M.A. Frequencies of restriction fragment-length polymorphisms indicate that Neotropical honey bee populations have African and west European origins. **Ann. Entomol. Soc. Am.** v.94, p.670-676, 2001.
- HALL, H. G. & SMITH, D. R. Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. **Proc. Nat. Acad. Sci.** v. 38, p. 4548-4552, 1991.

- HARRIS , H. & HOPKINSON, D.A. **Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics**. North-Holland publishing company, Amsterdam. 1976.
- HATTY, S. & OLDROYD, BP. Evidence for temperature-dependent selection for malate dehydrogenase allele frequencies in honeybee populations. **J. Hered.** v.90, p. 565-568, 1999.
- HEINRICH, B. Mechanisms of body-temperature regulation in honeybees, *Apis mellifera*. II. Regulation of thoracic temperature at high air temperatures. **J. Exp. Biol.** v.85, p. 73-87, 1980.
- HEBERT, E.W.; SYLVETER, H.A; VANDENBURG, J.D. & SHIMANUKI, H. Influence of nutritional stresses and the age of adults on the morphometrics of honey bees (*Apis mellifera* L.). **Apidologie** v.19, p. 221-229, 1988.
- KARPATI, J.F. & QUINTERO, E. Cooperative program for the control of africanized honeybees in Mexico. **Resumos do XXXIInd International Congress of Apiculture- Rio de Janeiro, Brazil. October, 22nd- 28th**: 232 – 233, 1989.
- KERR, W.E. The history of the introduction of African bees to Brazil. **South Afric. Bee J.** v.38, p. 3-5, 1967.
- _____. Some aspects of the evolution of social bees (Apidae). **Evol. Biol.**, v. 3, p. 119-175, 1969.
- KERR, W.E.; GONÇALVES, L.S.; BLOTTA, L.F. & MACIEL. H.B. Biologia comparada entre as abelhas Italianas (*Apis mellifera ligustica*), Africanas (*Apis mellifera adansonii*) e suas Híbridas. **Anais 1º Congresso Brasileiro de Apicultura, Florianópolis, SC.** 1970.

- KERR, W.E.; DE LEON DEL RIO, S. & BARRIONUEVO, M.D. The southern limits of the distribution of the Africanized honey bee in South America. **Am. Bee. J.** v.122, p. 196-198, 1982.
- LEVENE, H. On a matching problem arising in genetics. **Annals of Mathematics and Statistics**, v.20, p. 91-94. 1949.
- LOBO, J. A. Morphometric, isozymic and mitochondrial variability of Africanized honey bees in Costa Rica. **Heredity** v.75, p.133-141. 1995.
- LOBO, J. A.; DEL LAMA, M. A. & MESTRINER, M. A. Population differentiation and racial admixture in the Africanized honeybee. **Evolution** v.43, p.794-802, 1989.
- LOBO, J. A. & KRIEGER, H. Maximum likelihood estimates of gene frequencies and racial admixture in *Apis mellifera* L. (Africanized honeybees). **J. Hered**, v. 68, p. 441-448, 1992.
- _____. Highly polymorphic DNA markers in an Africanized honey bee population in Costa Rica. **Gen. Mol. Biol.** v.23, n.2, p.317-322, 2000.
- MACKENSEN, O. Viability and sex determination in the honey-bees. **Genetics**, v. 36, p. 525-640, 1951.
- MARTINS, E.; MESTRINER, M.A. & CONTEL, E.P.B. Alcohol deshidrogenase polymorphism in *Apis mellifera*. **Biochem. Genet.** v.15, p. 357-366, 1977.
- MESTRINER, M.A. Biochemical polymorphisms in bees. **Nature**. v.223, p.188-189, 1969.

- MESTRINER, M.A. & CONTEL, E.P.B. The *P-3* and *Est* loci in the honeybee *Apis mellifera*. **Genetics**. v.72, p. 733-738, 1972.
- MOLINA PARDO, A.M.; CORTES, C. M.; ARMSTRONG, D.P.; ORELLANA, E.A.M.; SOTO. G.M. & PRIETO, J.P.S. "Manejo y control de la abeja africanizada". **Organismo Internacional de Sanidad Agropecuária (OIRSA)/ Banco Internacional de Desarrollo**. San Salvador, El Salvador. 1988. 229 pp.
- NAKAMURA, Y.; LAPPERT, M.; O'CONNELL, N.; WOLFF, R.; HOLM, M.; CULVER, M.; MARTIN, C.; FUJIMOTO, E.; HOFF, M.; KUMLIM, E. & WHITE, R. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. **Science**, Washington, v.235, p.1616-1622, 1987.
- NATES G P. **Boletín del Departamento de Biología**. Universidad Nacional de Colombia. v.1, n.3, p.25-39. 1981.
- _____. Las abejas sin aguijón y su origen dentro de la mitología muisca. **Revista Tacaya**, Universidad Nacional de Colombia. Agosto, 1996.
- NDIRITU, D. W.; MUTIGI, N. & NDUNG'U, S. Variation in malate dehydrogenase allozymes among honeybee populations in Kenya. **J. Apic. Res**. v.25. p. 234-237, 1986.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **A. Nat.**, v. 106, p. 282-292, 1972.
- _____. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Ann. Hum. Genet.**, v. 41, p. 225-233, 1977.

_____. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**. v.89. p. 584-590, 1978.

_____. **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press, New York, 1987.

NEUMANN, P.; VAN PRAAGH, J.P.; MORITZ, R.F.A. & DUSTMANN, J.H. Testing reliability of a potential island mating apiary using DNA microsatellites. **Apidologie**. v.30, p.257-276, 1999a.

NEUMANN, P.; MORITZ, R.F.A. & MAUTZ, D. Using DNA Microsatellites of maternity testing in honeybees (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**. v.30. p.505-512, 1999b.

NEUMANN, P.; KOENIGER, N.; KOENIGER, G.; TINGEK, S.; KRYGER, P. & MORITZ, R.F.A. Home-site fidelity in migration honeybees. **Nature**, v. 406. p. 474-475. 3 August 2000a.

NEUMANN, P.; MORITZ, R.F.A. & MAUTZ, D. Colony evaluation is not affected by drifting of drone and worker honeybees (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**. v.31, p.67-79, 2000b.

NOGUEIRA-NETO, P. Notas sobre a historia da apicultura brasileira. *In*: CAMARGO, J.M.F. "**Manual de Apicultura**", Editora Agronômica Ceres, p. 17-32, 1972.

NUNAMAKER, R. A.; WILSON, W.T. AND HARLEY, B.E.J. Electrophoretic detection of Africanized honeybees (*Apis mellifera scutellata*) in Guatemala and México based on malate deshydrogenase allozyme patterns. **J. Kans. Entomol. Soc.**, v. 57, p. 622-631, 1984.

- OLDROYD, B.; SHEPPARD, W.S. & STELZER, J.A. Genetic characterization of the bees of Kangaroo Island, South Australia. **J. Apic. Res.**, v. 31, n. ¾, p. 141-148, 1992.
- OLDROYD, B.; SMOLENSKI, A.; LAWLER, S.; ESTOUP, A. AND CROZIER, R. Colony aggregations in *Apis mellifera* L. **Apidologie**, v.26, p.119-130, 1995.
- OTIS, G.W. A review of the diversity of species within *Apis*. In: SMITH, D.R. **Diversity in the genus *Apis***. USA: Westview Press/Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd, 1991, p. 29-49.
- PALMER, J.D. Evolution of Chloroplast and Mitochondrial DNA in Plants and Algae. In: MCINTYRE, R.J. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Plenum Press. p.131-240, 1985.
- PALMER, J.D. Chloroplast DNA Evolution and Biosystematic Uses of Chloroplast DNA variation. **Am. Nat.**, Chicago, v.130, p.6-29, 1987.
- PALMER, M. R., SMITH, D. R., AND KAFTANOGLU, O. Turkish honeybees: genetic variation and evidence for a fourth lineage of *Apis mellifera* mtDNA. **J. Heredity** v.19, n.1, p.42-46. 2000.
- PAMILO, P.; VARVIO-AHO, S.L. & PAKKARINEN, A. Low enzyme gen variability in Hymenoptera as a consequence of haplodiploidy. **Hereditas**. v.88, p.93-99, 1978.
- PAMILO, P. & CROZIER, R. H. Genic variation in male haploids under deterministic. **Genetics** v.98, p.199-214, 1981.

- PARKER, P.G.; SNOW, A. A.; SCHUG, M.D.; BOOTON, G.C.; FUERST, P.A.
What molecules can tell us about populations: choosing and using a
molecular marker. **Ecology**, Durham, v.79, n.2, p.361-382, 1998.
- PEREIRA, S. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics.
Genet. Mol. Biol, Ribeirão Preto, v.23, n.4, p.745-752, 2000.
- POLACZEK, B.; NEUMANN, P.; SCHRICKER, B. & MORITZ, R. F. A. A new,
simple method for rearing diploid drones in the honeybee (*Apis mellifera* L.).
Apidologie v.31, p. 525-530, 2000.
- QUEZADA-EUÁN, J. J. Hybridization between European and Africanized
honeybees in tropical Yucatan, México. II. Morphometric, allozymic and
mitochondrial DNA variability in feral colonies. **Apidologie** v.31, p.443-453,
2000.
- QUEZADA-EUÁN, J.J.G.; PÉRES-CASTRO, E. & MAY-ITZÁ, W.D.J. Hybridization
between European and african-derived honeybee populations (*Apis mellifera*)
at different altitudes in Perú. **Apidologie**, v.34, p.217-225, 2003.
- RINDERER, T. E.; SYLVESTER, H.A; BROWN, M.A; VILLA J.D.; PESANTE, D. &
COLLINS, A.M. Field and simplified techniques for identifying Africanized and
European honeybees. **Apidologie** v.17, n.1, p. 33-48, 1986.
- RINDERER, T. E.; STELZER, J. A.; OLDROYD, B. P.; BUCO, S. M. & RUBINK,
W. L. Hybridization between European and Africanized honey bees in the
neotropical Yucatan península. **Science** v.253, p. 309-311, 1991.
- RINDERER, T. E.; OLDROYD, B. P. & SHEPPARD, W.S. Africanized bees in the
U. S. **Scientific American**, v. 12, p. 52-58, 1993.

- ROTTA, I.T. **Análise Aloenzimática, Morfométrica e dos padrões do DNA mitocondrial das abelhas africanizadas do Brasil**. 1999. 111p. Dissertação (Tese de Doutorado em Genética e Evolução) – Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.
- ROUBIK, D. W. Ecology and natural history of tropical bees. Cambridge: **Tropical Biology**. 514p, 1989.
- ROWE, D.J.; RINDERER, T.E.; STELZER, J.A.; OLDROYD, B.P. AND CROZIER, R.H. Seven polymorphic microsatellite loci in honeybees (*Apis mellifera*). **Insectes Soc.** v.44. p. 85-93, 1997.
- RUTTNER, F. Evolution historique de la ruche. **Apimondia**, Bucarest. 1981.
- _____. **Biogeography and taxonomy of honeybee**. New York-Berlin: Springer-Verlag, 1988. 284 pp.
- _____. **Naturgeschichte der Honigbienen**. EhrenwirthVerlag, Munich, Germany.1992.
- RUTTNER, F.; TASSENCOURT, I. & LOUVEAUX, J. Biometrical statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. **Apidologie** v.9, p. 363-381, 1978.
- SALAMANCA, G. G Londoño, F.; F. Rivera, P.F. Zapata, M. O.. Alvarez, R. Serra, B. J. A. Análisis morfométrico y grado de africanización de la abeja *Apis mellifera* en algunos municipios del Tolima. **Resumo XXXIII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas**. 1998.

- SALAMANCA G.G.; SALAMANCA P.D.A. y MARTINEZ, A.T. **Elementos para la interpretación de la apicultura en Colombia.** APISERVICES Disponible em: <http://www.beekeeping.com/articulos/salamanca/elementos_apicultura_colombia.htm>. 2000
- SANFORD, M. Screening for African bees. **Florida Extension Beekeeping Newsletter-Apis** v.12, p. 1 – 7, 1995.
- SANTOS, F. R.; PENA, S.D.J. & EPPLEN. T.J. Genetic populational study of a y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism. **H. Genet.** v.90, p.655-656, 1993.
- SCHLÖTTERE, C.; PEMBERTON, J. The Use of microsatellites for genetic analysis of natural populations – a critical review. In: DESALLE, R.; SCHIERWATER, B. **Molecular approaches to ecology and evolution.** Basel: Birkhäuser Verlag. 1998. p. 71-86.
- SHEPPARD, W. S. & BERLOCHER, S. H. Enzyme polymorphism in *Apis mellifera* from Norway. **J. Apic. Res.**, v. 23, p. 64-69, 1984.
- SHEPPARD, W. S. & McPHERON, B.A. Genetic variation in bees from an area of racial hybridization in western Czechoslovakia. **Apidologie**, v. 17, n. 1, p. 21-32, 1986.
- _____. **Ribosomal DNA diversity in Apidae**, IN: "Diversity in teh Genus Apis". Ed Smith D. R. (Westview,Boulder, C.O.): 89-102, 1991.
- SHEPPARD, W. S.; SOARES, A.E.E.; DeJONG, D. & SHIMANUKI, H. Hybrid status of honeybee populations near the historic origin of Africanization in Brazil. **Apidologie**. v. 22, p. 643-652, 1991a.

- SHEPPARD, W. S.; RINDERER, T.E.; MAZOLLI, J.A.; STELZER, J.A. & SHIMANUKI, H. Gene flow between African and European-derived honeybees populations in Argentina. **Nature** v.349, p. 782-784, 1991b.
- SHEPPARD, W. S.; RINDERER, T.E.; GARNERY, L. AND SHIMANUKI, H. Analysis of Africanized honey bee mitochondrial DNA reveals further diversity of origin. **Genet. Mol. Biol.** v.22, p. 73-75, 1999.
- SMITH, D.R. Mitochondrial DNA polymorphisms in five old world subspecies of honeybees and in new world hybrids. In: **Africanized Honey Bees and Bees Mites**. G.R. Needham, R. E. Page Jr.; M. Delfinado-Baker and C.E. Bowman (ed). Ellis Hoewood, Chichester, pp. 303-312, 1988.
- _____. Mitochondrial DNA and honeybee biogeography. In: **Diversity in the Genus Apis**. (Smith D.R., ed.). Westview Press (Boulder/Co), 1991. 131 pp.
- SMITH, D.R.; TYLOR, O R. & BROWN. Neotropical Africanized honeybees have African mitochondrial DNA. **Nature**. 339, p. 213-215, 1989.
- SOLFERINI, V.N.; SCHEEPMAKER, D.S. Polimorfismos de isozimas. In: MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: HOLOS. 2001 p.137-142.
- SOLIGNAC, M.; VAUTRIN, D.; LOISEAU, A.; MOUGEL, F.; BAUDRY, E.; ESTOUP, A; GARNERY, L.; HABERL, M. AND CORNUET, J-M. Five hundred and fifty microsatellites markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome. **Mol. Ecol. Notes**. v.3, p.307-311, 2003.

- SOUZA, R. O. **Dinâmica do fluxo gênico em populações de *Apis mellifera* do Chile observada através de marcadores nucleares e mitocondriais**. 2002. 87 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Pós Graduação em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.
- SPIVAK, M.; FLETCHER, DJC. & BREED, M.D. (eds). **The “African honey bee**. Boulder, CO: Westview. 1991.
- SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Tree**, London, v.15, p.199-203, 2000.
- TAYLOR, O.R. African bees: potential impact in the United States. **Bull. Entomol. Soc. Am.** v. 31, p. 15-24, 1985.
- VARGAS, G. E.; SALAMANCA, G. G. **Análisis morfométrico y grado de africanización de la abeja *Apis mellifera* en algunos municipios del departamento de Boyacá**. 1999. Tesis. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Agronomía. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tunja. Colômbia.
- VILLA, J.D.; RINDERER, T.E. & COLLINS, A.M. ‘Overwintering’ of Africanized, European and hybrid honeybees (Hymenoptera:Apidae) in the Andes of Venezuela. **Environ. Entomol.**, v. 22, n.1, p. 183-189, 1993.
- WEIR, B. S. Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics**, v.35, p. 235-254, 1979.
- WHITING, P. W. Multiple alleles in complementary sex determination of *Habrobracon*. **Genetics** v.28, p. 365-382, 1943.

_____. The evolution of male haploidy. **Quart. Rev. Biol.** v.20, p. 231-260, 1945.

WILLIAMS, P. **Now established in most of tropical America, killer bees are moving northward and farther into the United States, despite efforts to halt or control them.** URL, Disponível em: <<http://www.Killerinsects.com/article1004.html>>. Acesso em: Julio, 2001.

WORKMAN, P.L. & NISWANDER, J.D. Population studies on South-Western Indian Tribes. II. Local differentiation in The Papago. **Amer. J. Hum. Genet.** v.19, p. 251-253, 1970.

YEH, F.C.; BOYLE, T.; RONGCAI, Y.; YE, Z. & XIYAN, J.M. **POPGENE VERSION 1.31.** 1999. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis.

ZAHA, A.; SCHRANK, A.; FERREIRA, H.B.; SCHRANK, I.S.; RODRIGUES, J.J. S.; REGNER, L.P.; ASSAGLIA, L.M.P.; ROSSETTI, M.L.R.; RAUPP, R.M.; SILVA, S.C. da; GAIESKY, V.L.V. **Biologia molecular básica.** Porto Alegre: Mercado Aberto. 1996. 336 p.