

**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.) DO BRASIL E URUGUAI DETERMINADA
POR MEIO DE POLIMORFISMOS DO DNA MITOCONDRIAL”**

THAÍS COLLET

**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.) DO BRASIL E URUGUAI DETERMINADA
POR MEIO DE POLIMORFISMOS DO DNA MITOCONDRIAL”**

THAÍS COLLET

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 a 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**

C698eg

Collet, Thaís.

Estrutura genética das populações de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) do Brasil determinada por meio de polimorfismos do DNA mitocondrial / Thaís Collet. -- São Carlos : UFSCar, 2004.
66 p.

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

1. Genética de populações. 2. Abelha - africanizada. 3. *Apis mellifera*. 4. DNA mitocondrial. I. Título.

CDD: 575.15 (20ª)

Orientador

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

“Mas tu ó servo meu, não temas porque eu sou contigo; não te assombres porque eu sou o teu Deus; te tomo pela tua mão direita, te fortaleço, te ajudo e te sustento com a minha destra fiel”.

Isaías 41: 10 e 13

Todo o meu agradecimento Àquele que nos tem fortalecido.

Agradecimentos

Muitas pessoas tiveram participações fundamentais na realização deste trabalho, estando direta ou indiretamente envolvidas nele, ou realizando os papéis que fazem toda a diferença na minha vida: o de família e o de amigos.

Portanto, deixo aqui os meus agradecimentos a algumas dessas pessoas:

Aos meus pais, Nelita e Martim, e aos meus irmãos André, Ulisses e Rodrigo, que são a melhor base e referência da minha formação pessoal, por me proporcionarem todas as oportunidades para a formação profissional.

Ao professor Dr. Marco Antonio Del Lama, pela presença sempre constante no desenvolvimento deste trabalho, demonstrando orientação com segurança, além dos melhores exemplos de princípios que um aluno em formação pode obter de um orientador.

Aos amigos do Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros: Isabel, Daniele, Mariana, Margarita e Otávio, por fazerem do laboratório um ambiente tão agradável e por se revelarem não apenas colegas de trabalho, mas sim amigos.

Ao Rogério Oliveira Souza, que de forma amigável me ensinou todas as técnicas desde o começo do trabalho, além de ajudar na análise e discussão dos resultados, e ao Carlos Prada Quiroga, pelo grande companheirismo, ajuda e incentivos durante a realização do trabalho.

À professora Dra. Silvia Nassif Del Lama, de quem admiro o entusiasmo com o qual trabalha a Ciência, e aos seus alunos Iara, Mateus, Carolina, Alessandra e Priscila pela agradável convivência.

À professora Dra. Maria Cristina Arias, por me receber em seu laboratório no Instituto de Biociências da USP e pelas valiosas discussões a respeito dos resultados. Agradeço também a todo o pessoal do seu laboratório por terem me recebido tão bem durante o período que permaneci junto deles.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, com alguns dos quais, por meio das disciplinas cursadas, muito aprendi.

Aos funcionários e amigos, tanto do Departamento de Genética e Evolução quanto da Pós-Graduação, pela convivência tão saudável.

Aos apicultores ou pesquisadores do Brasil e demais países, pela maneira cordial que nos forneceram as amostras de abelhas analisadas neste trabalho.

Às professoras Dras. Maria Claudia C. R. Takasusuki e Sandra A. O. Collet pela grande amizade e incentivos para que eu realizasse o Mestrado.

A todas as pessoas que conheci nesse período em São Carlos, principalmente algumas cujos nomes eu não poderia deixar de lembrar: Priscila, Elisângela, Milena, Marcilene, Patrícia, Lídia, Francieli, Tatiana, Joel, Sônia, Nelson, Martha, Rogério, Larissa, Leu, Marcos, Liana, Júnior e Fernando. Estas são algumas das pessoas as quais considero muito valiosas, estando junto de mim todos os dias ou em cidades distantes e até mesmo em outro país, todas são muito importantes na minha vida.

À Luciana Oliveira Souza e à Noêmia Mie Orii pela forma acolhedora com que me receberam em São Paulo.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos a mim concedida, e à FAPESP (Processo 03/06342-9) pelo auxílio financeiro.

Índice

LISTA DE FIGURAS	<i>iii</i>
LISTA DE TABELAS	<i>iv</i>
RESUMO GERAL	<i>v</i>
ABSTRACT	<i>vii</i>
1. Introdução Geral	1
1.1 Origem e Evolução de <i>Apis mellifera</i>	1
1.2 O processo de africanização	3
1.3 Estudos populacionais realizados com as subespécies de <i>Apis mellifera</i>	7
1.3.1 Morfometria	7
1.3.2 Alozimas	8
1.3.3 Polimorfismos do DNA nuclear	9
1.3.4 Padrões do DNA mitocondrial	11
2. Justificativa e Objetivos	15
3. Referências Bibliográficas	17
4. Padrões de PCR-RFLP da região 16S do DNA mitocondrial diferenciam ramos evolutivos de <i>Apis mellifera</i>	23
4.1. Resumo	24
4.2. Introdução	25
4.3. Material e Métodos	28
4.3.1 Amostras e extração de DNA	28
4.3.2 Amplificação por PCR e digestão com endonucleases	28

4.3.3. Clonagem e seqüenciamento do DNA	30
4.4. Resultados	31
4.5. Discussão	37
4.6. Referências Bibliográficas	40
5. Estrutura genética das populações de abelhas africanizadas (<i>Apis mellifera</i> L.) do Brasil determinada por meio do polimorfismo da região tRNA^{leu}-COII do DNA mitocondrial	43
5.1. Resumo	44
5.2. Introdução	45
5.3. Material e Métodos	47
5.3.1. Amostras e extração de DNA	47
5.3.2. Amplificação por PCR e digestão com endonuclease	47
5.3.3. Clonagem e seqüenciamento do DNA	47
5.4. Resultados	49
5.5. Discussão	57
5.6. Referências Bibliográficas	62
6. Considerações Finais e Perspectivas	65

LISTA DE FIGURAS

Padrões de PCR-RFLP da região 16S do DNA mitocondrial diferenciam ramos evolutivos de *Apis mellifera*

- FIGURA 1.** Padrões de amplificação e restrição das subespécies analisadas para a região 16S 32
- FIGURA 2.** Sítios de variação do fragmento 16S 33
- FIGURA 3.** Padrões da digestão dupla com *Eco* RI e *Vsp* I 36

Estrutura genética das populações de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) do Brasil determinada por meio do polimorfismo da região tRNA^{leu}-COII do DNA mitocondrial

- FIGURA 1.** Mitótipos observados a partir da digestão com *Dra* I para a região intergênica tRNA^{leu}-COII 52
- FIGURA 2.** Mapas de restrição e comprimento dos fragmentos em pares de base 53
- FIGURA 3.** Seqüências P e Q da região tRNA^{leu}-COII 54
- FIGURA 4.** Distribuição dos mitótipos tRNA^{leu}-COII de *Apis mellifera* nos países analisados 55

LISTA DE TABELAS

Padrões de PCR-RFLP da região 16S do DNA mitocondrial diferenciam ramos evolutivos de *Apis mellifera*

TABELA 1. Número de colônias de *Apis mellifera* e seus respectivos países de coleta 29

TABELA 2. Padrões discordantes observados nos diferentes marcadores utilizados na identificação das subespécies 34

Estrutura genética das populações de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) do Brasil determinada por meio do polimorfismo da região tRNA^{leu}-COII do DNA mitocondrial

TABELA 1. Distribuição das populações de *Apis mellifera* do Brasil, Uruguai, Espanha e Itália com o número de haplótipos mitocondriais observados 51

RESUMO GERAL

Os ramos evolutivos dentro dos quais as subespécies de *Apis mellifera* são classificadas estão originalmente distribuídos nos continentes africano (ramos A e Y), europeu (ramos M e C) e asiático (ramo O). Essa distribuição vem sendo progressivamente alterada devido às introduções de subespécies em várias outras regiões do mundo, ocasionadas principalmente por atividades apícolas. Dessa forma, a genética de populações vem ganhando um amplo campo de estudos relacionados às mudanças na composição das populações já estabelecidas e das recém introduzidas. A introdução das abelhas africanas no continente americano, que resultou no processo conhecido como africanização, se tornou um dos eventos mais estudados, dentre aqueles relacionados às introduções de *Apis mellifera*.

Uma das primeiras abordagens nos estudos que envolvem introduções de subespécies é a caracterização das diferentes linhagens que contribuem para a formação das populações. Nesse sentido, são descritos neste trabalho os diferentes padrões de restrição obtidos a partir de um fragmento da região 16S do DNA mitocondrial que, em relação às metodologias utilizadas até então, permitem uma melhor diferenciação das subespécies pertencentes aos ramos evolutivos A, M e C.

No sentido de caracterizar a composição racial da abelha híbrida resultante da africanização do continente americano, a necessidade de identificar a contribuição de raças européias e africanas para as populações africanizadas que se expandiram a partir da década de 50 levou ao desenvolvimento de diversas ferramentas adequadas para tal fim. Portanto, são apresentados os resultados obtidos com o polimorfismo gerado pela enzima *Dra* I em fragmento da região intergênica tRNA^{leu}-COII que contribuirão para o entendimento da estrutura genética das populações de abelhas africanizadas do Brasil. Dos 11 mitótipos observados, três não haviam sido descritos em análises prévias e apresentam padrões similares a alguns encontrados na Península Ibérica. Os padrões mais

freqüentes foram os africanos A1 e A4, provavelmente introduzidos no Brasil via *Apis mellifera scutellata* em 1956. Embora os padrões analisados neste trabalho tenham se mostrado mais informativos em relação aos anteriormente utilizados nas populações africanizadas, a distribuição do padrão A1 evidencia a importância de se utilizar regiões mitocondriais ainda mais polimórficas, cujos resultados, aliados a outros marcadores, trarão maiores esclarecimentos a respeito da estrutura genética das populações de abelhas africanizadas das Américas.

ABSTRACT

The *Apis mellifera* subspecies are classified into evolutionary branches originally distributed in the African (branches A and Y), European (branches C and M) and Asian (branch O) continents. This distribution has been changing due to the subspecies introductions to other countries, mainly occurred by beekeeping activities. Therefore, population genetics studies on the already established and newly introduced populations have increased. The introduction of the African honeybee in American continent, known as Africanization, became one of the most studied events related to *Apis mellifera* introductions.

The characterization of different lineages that contribute to hybrid populations is the first approach of the studies related to subspecies introductions. In this way, we describe the restriction patterns obtained from a 16S region fragment of the mitochondrial DNA. These patterns enables the differentiation among races from the three evolutionary branches using only one region of the mitochondrial genome, without the requirement of amplification of other regions.

The determination of the racial composition of the hybrid product of Africanization in America led to the development of diverse tools suitable for it, including mtDNA analysis. We present here the results obtained with the polymorphism produced by *Dra* I endonuclease in a fragment of the tRNA^{leu}-COII intergenic region. These results contribute to the understanding of the genetic structure of Africanized populations from Brazil. From 11 mitotypes observed, three have not been described in previous analysis and present similar patterns to some found at Iberian Peninsula. The most frequent patterns were the African A1 and A4, probably introduced in Brazil by *Apis mellifera scutellata* in 1956. Although the patterns analyzed in this work are more informative than the ones used until now in Africanized populations, the distribution of A1 pattern evidences the importance of using other mitochondrial regions to identify its origin. Working with these regions and other markers, it will be possible to clarify the genetic structure of Africanized honeybees of the Americas.

1. Introdução Geral

1.1. Origem e Evolução de *Apis mellifera*

Evidências fósseis são escassas, mas as abelhas provavelmente evoluíram juntamente às fanerógamas no período Cretáceo (cerca de 146 a 74 milhões de anos atrás). Alguns autores, como Gauld e Bolton (1996), sugerem que regiões de clima tropical, como a África, seriam os possíveis locais de origem do gênero *Apis*. Porém, os primeiros registros fósseis do gênero foram descobertos na Alemanha e datam do Eoceno, ou seja, por volta de 50 milhões de anos atrás. De acordo com Milner (1996), esse fato pode ser explicado por registros que apontam um clima tropical para a Europa naquela época, e conforme o clima se tornava frio, as abelhas, que ainda não teriam desenvolvido o controle da temperatura do ninho, migraram para regiões tropicais.

Dois atributos foram essenciais para a evolução e biologia das abelhas: o comportamento de agrupar-se e a habilidade de controlar a temperatura do ninho. Estas características permitiram a regulação da temperatura interna da colônia independentemente da temperatura externa. Dessa forma, o gênero *Apis* foi capaz de colonizar uma ampla variedade de ambientes, desde os tropicais até os temperados. A subfamília Meliponinae, por exemplo, que não apresenta essa capacidade de regulação da temperatura do ninho, está restrita às regiões tropicais (Milner, 1996).

A grande capacidade de *Apis mellifera* colonizar diferentes ambientes, da mesma forma que as demais espécies do gênero *Apis*, levou essa abelha a enfrentar muitas condições ecológicas diferentes. Este fato, associado ao isolamento geográfico de algumas populações, permitiu a evolução de numerosas subespécies adaptadas aos seus ambientes específicos.

Em 1978, Ruttner *et al.* agruparam as diferentes subespécies de *A. mellifera* por meio da análise multivariada de caracteres morfométricos e estes grupos foram então denominados de ramos ou linhagens evolutivas.

Atualmente são reconhecidos cinco ramos evolutivos que agrupam as 26 subespécies de *A. mellifera* descritas. A seguir são apresentados os ramos juntamente com a distribuição original de cada um deles.

1) Ramo A: Característico das subespécies africanas *A. m. adansonii*, *A. m. capensis*, *A. m. intermissa*, *A. m. lamarckii*, *A. m. litorea*, *A. m. major*, *A. m. monticola*, *A. m. sahariensis*, *A. m. scutellata*, *A. m. siciliana* e *A. m. unicolor*.

2) Ramo M: Característico das seguintes subespécies localizadas na Europa Ocidental: *A. m. iberiensis* e *A. m. mellifera*.

3) Ramo C: Compreende as subespécies *A. m. carnica*, *A. m. cecropia*, *A. m. macedonica*, *A. m. ligustica* e *A. m. sicula*, que ocupam o leste europeu e norte do Mediterrâneo.

4) Ramo O: Agrupa as subespécies do Oriente Médio *A. m. adami*, *A. m. anatoliaca*, *A. m. armeniaca*, *A. m. caucasica*, *A. m. cypria*, *A. m. meda* e *A. m. syriaca*.

5) Ramo Y: Este ramo compreende apenas a subespécie *A. m. yemenitica*, localizada na região africana da Etiópia.

A distribuição original dos ramos evolutivos de *Apis mellifera* tem sido progressivamente alterada devido às sucessivas introduções realizadas por apicultores, de forma que, atualmente, as abelhas pertencentes às diferentes linhagens podem ser encontradas em várias partes do mundo. De acordo com Schneider *et al.* (2004), o transporte em larga escala de populações de *A. mellifera* deu início a uma “mistura” de linhagens anteriormente distribuídas de forma alopátrica. Dessa forma, vêm se tornando comum ao longo dos anos as investigações que visam diferenciar as linhagens de abelhas envolvidas nas introduções, a fim de compreender as mudanças na composição genética das populações residentes e introduzidas, como resultado do transporte para diferentes áreas.

Estudos dessa natureza foram realizados com as populações da ilha de Guadalupe, onde enxames europeus introduzidos há três séculos originaram uma

população relativamente uniforme, mas, de acordo com as frequências de três alelos de um loco MDH, recentes importações da subespécie *ligustica* têm aumentado a variabilidade genética na região (Cornuet, 1979).

Oldroyd *et al.* (1995), estudaram processos de hibridização entre *mellifera* e *ligustica* na Tasmânia (Austrália), introduzidas respectivamente em 1831 e 1884, e observaram que o fluxo gênico entre as subespécies ocorria na costa, mas era restrito nas regiões montanhosas mais frias, onde populações ferais de *mellifera* eram predominantes, provavelmente devido ao *fitness* reduzido dos híbridos *mellifera/ligustica* nas regiões frias.

Nas ilhas Baleares, foram observados haplótipos pertencentes à linhagem M, resultado de importações de rainhas da Península Ibérica, o que demonstra substituições de rainhas nativas (De la Rúa *et al.*, 2001).

No entanto, o impacto mais marcante resultante da introdução de diferentes subespécies de *Apis mellifera* em uma área ocorreu nas Américas e será discutido no tópico a seguir.

1.2. O Processo de Africanização

O processo de expansão das abelhas africanas *Apis mellifera scutellata* pelo continente americano é denominado de Africanização e teve início no Brasil em 1956. De acordo com Kerr (1967), estas abelhas foram trazidas da África (região de Tanganica e África do Sul) ao Brasil pelo próprio autor com o objetivo de realizar o melhoramento e posterior distribuição de rainhas selecionadas aos apicultores. O objetivo era aumentar a produção nacional de mel, uma vez que dados da literatura internacional apontavam a subespécie *A. m. scutellata* como grande produtora (Gonçalves, 1998).

Em 1957 ocorreu o escape acidental de 26 rainhas que se encontravam em quarentena em apiário próximo a Rio Claro (SP), iniciando as enxameações dessas rainhas e o cruzamento na natureza com as subespécies européias residentes no continente desde a época da colonização.

Na América do Sul, as primeiras introduções ocorreram por meio dos colonizadores espanhóis e portugueses, provavelmente com *A. m. mellifera* e *A. m. iberica*. No Brasil, por volta do século XIX, imigrantes alemães e italianos começaram a introduzir *A. m. mellifera* e *A. m. ligustica* respectivamente. Mais recentemente, atividades apícolas comerciais em toda a América têm importado *A. m. ligustica*.

Portanto, a abelha resultante do cruzamento entre as subespécies européias já existentes com a africana é um polihíbrido que, de acordo com Gonçalves (1998), por volta de 1974 recebeu a denominação “africanizada” devido à dominância das características das abelhas africanas sobre as demais européias.

Os enxames africanizados se expandiram pela América a uma velocidade de cerca de 480 km/ano (Taylor, 1985), de forma que atualmente são encontrados em grande parte do continente, incluindo várias áreas dos EUA (Kunzmann *et al.*, 2002). A colonização das Américas se deu, inclusive, com a substituição dos enxames europeus preexistentes pela abelha africanizada. Alguns fatores, muitas vezes combinados, são responsáveis por permitir essa expansão, bem como a preservação das características africanas, seja nas colônias ferais ou nas mantidas em apiários. A seguir, são descritos alguns desses fatores.

- **Taxa de crescimento da colônia e enxameagem:** As colônias africanas apresentam uma taxa de crescimento mais acelerada quando comparadas com as européias, que se deve à maior habilidade na coleta de pólen e sua rápida conversão às crias (Page *et al.*, 2000). Com isso, a densidade das colônias africanas é rapidamente aumentada, resultando na produção de um enxame com maior capacidade de dispersão, que abandona as colônias e dá início à enxameagem.
- **Invasão das colônias européias pelas africanas:** Neste caso, enxames africanos invadem colônias européias, substituem as rainhas e causam a completa perda da linhagem européia. O mecanismo pelo qual a substituição

ocorre permanece pouco entendido, porém, de acordo com Danka *et al.* (1992), fatores relacionados a feromônios dos enxames invasores, ausência de rainha nas colônias invadidas ou ainda uma colônia debilitada, podem estar envolvidos.

- **Linhagens africanas se sobrepõem durante a substituição de rainhas:** Quando abelhas africanas invadem uma nova área, as rainhas se acasalam com zangões africanos e europeus, resultando numa colônia com operárias de origem africana e europeia. Pelo fato das rainhas que emergem primeiro eliminarem aquelas que ainda permanecem nas células, as de origem africana possuem uma vantagem competitiva, já que estas se desenvolvem mais rápido e emergem antes das rainhas europeias, possuindo mais oportunidades de eliminá-las (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 1998).
- **Vantagens adaptativas da abelha africana em ambientes neotropicais:** Rinderer (1988) destaca que as abelhas africanas possuem vantagens em relação às europeias, tanto com relação à colonização quanto na capacidade de sobreviver nos ambientes tropicais e subtropicais do continente americano. O comportamento higiênico mais acentuado diante de doenças ou parasitas, como o ácaro *Varroa jacobsoni* (responsável por atacar as crias), torna as africanizadas mais tolerantes que a europeias. Outras características, como um forrageamento mais eficiente nas áreas tropicais, maior capacidade defensiva diante de inimigos naturais ou a flexibilidade na escolha dos locais de nidificação, contribuem para o estabelecimento bem sucedido desta abelha na América.

Com relação aos impactos causados pela expansão das abelhas africanizadas pelo continente, temia-se inicialmente que a entrada dessas abelhas em novas áreas seria tanto perigosa para a população devido à sua agressividade, quanto desvantajosa para os apicultores e a indústria de polinização. No começo da década de 80, o Departamento de Agricultura dos EUA estimava que, com a chegada dos enxames africanizados, haveria uma perda

anual de 19 milhões de dólares em atividades agrícolas que dependiam da polinização por abelhas, além de um prejuízo ainda maior para a apicultura (McDowell, 1984).

Porém, é possível que tais impactos sejam menores do que se imaginava inicialmente (Schneider *et al.*, 2004) pois a baixa taxa de dispersão das abelhas africanizadas nos climas temperados americanos, juntamente com políticas de controle por parte do governo, podem ter amenizado essas estimativas. Na América do Sul, essas abelhas se mostraram superiores às européias na polinização de certas culturas, e, por apresentarem maior resistência a doenças, além de reduzida susceptibilidade a alguns pesticidas, têm sido incorporadas em práticas agrícolas.

No Brasil, desde a década de 60, grupos de pesquisa vêm se estabelecendo em programas de cruzamentos entre abelhas africanizadas e européias com o objetivo de diluir os genes africanos, já que essas abelhas são caracterizadas por um acentuado comportamento defensivo. O objetivo inicial de introduzir as abelhas africanas no Brasil, ou seja, o incremento na produção nacional de mel, foi alcançado, conforme constatado por Kerr (1967) com dados que apontavam as abelhas africanas produzindo duas vezes mais que as italianas e quatro vezes mais que as alemãs. Em 2001, o país produziu em torno de 22 mil toneladas de mel, destacando-se em sexto lugar na produção mundial. (www.cnptia.embrapa.br/sistemasdeprodução). O uso das abelhas africanizadas na apicultura comercial vem sendo cada vez mais freqüente, havendo inclusive apicultores no Brasil e outros países americanos que preferem estas abelhas devido à sua alta produtividade (Gonçalves, 1998).

Apis mellifera scutellata é um excelente modelo animal para estudos de fatores que influenciam o estabelecimento bem sucedido de espécies em novos ambientes (Schneider *et al.*, 2004). A colonização da maior parte do hemisfério ocidental em menos de 50 anos por uma única subespécie é uma das mais rápidas e espetaculares invasões biológicas conhecidas.

Dessa forma, a expansão da abelha africanizada por novos ambientes e seu cruzamento com as demais subespécies têm possibilitado a realização de vários estudos que visam diferenciar entre as subespécies, investigar o grau de hibridização entre as abelhas européias existentes e as africanas introduzidas posteriormente, bem como os mecanismos envolvidos no estabelecimento dessas novas populações.

1.3. Estudos populacionais realizados com as subespécies de *Apis mellifera*

Vários trabalhos têm relatado estudos populacionais realizados com as subespécies de *Apis mellifera* em praticamente todos os continentes. Em tais análises, destaca-se a utilização de morfometria, alozimas, polimorfismos do DNA nuclear e os padrões do DNA mitocondrial. A seguir, serão relatados alguns trabalhos que se utilizaram desses marcadores para analisar populações de *A. mellifera* e o seu emprego nas questões que envolvem as abelhas africanizadas das Américas.

1.3.1. Morfometria

As subespécies de abelhas têm sido diferenciadas por meio de análises morfométricas desde o início do século XX (Ruttner, 1988). Alpatov (1929, 1948) introduziu medidas biométricas de partes do corpo das abelhas, como cor e venação das asas, dando início às primeiras classificações.

Em 1978, Ruttner *et al.* utilizaram dados de morfometria para sugerir que *A. mellifera* evoluiu em três principais ramos ou linhagens evolutivas (M, C e A), classificando as subespécies descritas até então dentro desses ramos. Atualmente, aproximadamente 40 caracteres morfométricos das abelhas podem ser utilizados em análises multivariadas. A utilização desses caracteres é possível devido aos padrões de variação morfológica encontrados em *A. mellifera*, resultado da ampla distribuição geográfica dessa abelha (Ruttner, 1988).

De acordo com Diniz-Filho (1994), os valores médios da asa anterior, por exemplo, podem ser utilizados na diferenciação dos grupos de *A. mellifera* e na estimativa de variação entre populações, pois esta característica apresenta elevada herdabilidade e está altamente relacionada a gradientes morfológicos.

Abelhas africanizadas da América do Sul foram estudadas por Buco *et al.* (1987) utilizando 25 caracteres morfológicos. Os autores constataram que essas abelhas apresentavam tanto origem da linhagem parental europeia quanto da africana.

Colônias africanizadas do México foram analisadas por meio de três métodos morfométricos (Guzman-Novoa *et al.*, 1994). De acordo com os autores, os métodos discriminam corretamente as amostras africanas e europeias, indicando que menos de 45% dos híbridos eram africanizados.

Lobo (1995) utilizou dados de morfometria das asas em seus estudos com abelhas africanizadas da Costa Rica e observou uma origem predominantemente africana em todas as localidades. O autor comparou a população africanizada da Costa Rica com grupos de referência, como abelhas europeias, africanizadas do Brasil e europeias existentes na Costa Rica antes do processo de africanização. O comprimento e a largura das asas das abelhas costarriquenhas foram, em média, menores quando comparadas com as europeias, sendo mais similares ao padrão africanizado utilizado como referência.

Dados obtidos com medidas da asa anterior e posterior de populações de abelhas africanizadas do Brasil demonstraram uma grande semelhança dessas abelhas com as africanas. Esta semelhança aumenta nas abelhas que ocupam as regiões mais próximas ao Equador (Rotta, 1999).

1.3.2. Alozimas

Numerosos estudos têm sido realizados empregando-se alozimas para estimar níveis de variabilidade genética em populações, além de ajudar a resolver controvérsias taxonômicas e identificar taxa desconhecidos (Alfenas, 1998). Em *A.*

mellifera, alguns locos polimórficos, como *MDH1*, *PGM*, *HK1*, *EST-3* e *ADH*, apresentam os maiores níveis de polimorfismo, sendo muito utilizados em estudos de parentesco entre grupos de populações dessa espécie (Lobo, 1995).

Vários autores destacam os locos *MDH1* e *HK1* na diferenciação de populações europeias e africanizadas (Lobo *et al.*, 1989; Del Lama *et al.*, 1988, 1990, 2004; Rotta, 1999). Tal fato deve às diferentes frequências para três alelos de *MDH1* apresentadas pelas três principais subespécies envolvidas no processo de africanização, *A. m. scutellata*, *A. m. mellifera* e *A. m. ligustica*. *A. m. mellifera* exibe altas frequências do alelo *Mdh1*⁸⁰, enquanto as africanas possuem o alelo *Mdh1*¹⁰⁰ praticamente fixado e *A. m. ligustica* apresenta grandes proporções de *Mdh1*⁶⁵ (Sheppard e Berlocher, 1984; Badino *et al.*, 1984). Com relação *HK1*, Del Lama *et al.* (1988) demonstraram que o alelo *Hk1*¹⁰⁰ está presente nas abelhas europeias e *Hk1*⁸⁷ é característico das abelhas africanas.

Resultados obtidos com amostras de abelhas africanizadas da América do Sul e Central demonstram uma grande contribuição das abelhas africanas na formação das populações africanizadas, com uma composição de genes europeus cuja frequência varia de acordo com a região geográfica (Lobo *et al.*, 1989; Del Lama *et al.* 1990; Lobo e Krieger, 1992; Rotta, 1999; Diniz *et al.*, 2003). Os trabalhos apontam a predominância de genes africanos e, com relação aos europeus, a maioria da contribuição se deve aos pertencentes a *Apis mellifera mellifera*.

1.3.3. Polimorfismos do DNA nuclear

Muitas seqüências do genoma nuclear constituem uma fonte rica de marcadores genéticos devido ao alto grau de variabilidade que possuem. Dessa forma, esses marcadores vêm proporcionando avanços nos estudos de genética de populações, além de muitos genes nucleares serem utilizados para inferências filogenéticas (Arias e Infante-Malachias, 2001).

Além dos polimorfismos gerados pelos tamanhos dos fragmentos de restrição (RFLP) do DNA nuclear, os microsátélites também são considerados efetivos em avaliações de variabilidade genética. Estes últimos marcadores constituem seqüências curtas de nucleotídeos, repetidas em tandem e bastante variáveis (Parker *et al.*, 1998). Os marcadores nucleares constituem bons indicadores da composição genética das abelhas e, de acordo com McMichael e Hall (1996), comparando-se com a variabilidade morfométrica e bioquímica (alozimas), são mais abundantes e não requerem expressão gênica para sua detecção.

Estudos empregando RFLPs e microsátélites têm sido desenvolvidos no sentido de elucidar a composição genética das populações de abelhas africanizadas das américas. Contribuindo para isso, marcadores característicos de abelhas européias e africanas vêm sendo identificados (Hall, 1986, 1990; McMichael e Hall, 1996; Hall e McMichael, 2001).

Nas colônias ferais americanas africanizadas, os marcadores nucleares característicos de abelhas do leste europeu (*A. m. ligustica*) foram observados com baixas freqüências, indicando haver limitada introgressão paternal de colônias européias manejadas nas populações ferais africanizadas (Hall, 1990). Entretanto, como as freqüências de alelos africanos de outros locos foram menores nas populações ferais americanas em relação a populações sul africanas (Hall, 1992; 1998), provavelmente estaria havendo maiores níveis de hibridização africana-européia do que o observado no estudo anterior.

Uma introgressão paternal a partir de abelhas do oeste europeu (*A. m. mellifera*) estaria ocorrendo nas populações africanizadas, uma vez que Hall e McMichael (2001) demonstraram que embora os alelos do leste europeu estivessem praticamente ausentes em relação aos africanizados, havia de 26 a 31% de freqüência dos alelos característicos de *A. m. mellifera*.

De acordo com Suazo e Hall (2002) e Suazo *et al.* (2002), as freqüências dos alelos africanos nas populações da América Central e do Sul aumenta do norte em direção ao sul, ou seja, das populações africanizadas jovens para

aquelas estabelecidas a mais tempo. Estes autores também demonstraram frequências mais elevadas de alelos pertencentes a *A. m. mellifera* em relação aos de *A. m. ligustica*.

Clarke *et al.* (2002), utilizando dados de microsátélites, descreveram que a maioria das colônias mexicanas e venezuelanas por eles estudadas era híbrida africana/*A. m. mellifera*.

1.3.4. Padrões do DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial apresenta algumas características que tornam esta molécula uma ferramenta bastante utilizada em estudos de filogenia, de relações evolutivas entre espécies ou análises populacionais, como introduções de populações e modos de dispersão.

Dentre as características que tornam o DNA mitocondrial um marcador atrativo estão a herança uniparental (geralmente materna e sem recombinação), as altas taxas evolutivas quando comparado ao genoma nuclear (provavelmente devido a uma baixa eficiência do sistema de reparo na mitocôndria), a grande quantidade, o que facilita seu isolamento, além de uma estrutura de organização relativamente simples, constituindo-se de moléculas de fita dupla, compactas, com um tamanho que em *A. mellifera* varia de 16 a 17 kb (Crozier e Crozier, 1993), com poucas regiões intergênicas e sem íntrons.

Dados obtidos por meio da análise do DNA mitocondrial têm trazido importantes esclarecimentos para os estudos com *A. mellifera*, contribuindo, por exemplo, para o entendimento da evolução de suas subespécies. Algumas endonucleases utilizadas em regiões específicas do DNA mitocondrial produzem fragmentos capazes de distinguir entre as linhagens dessa espécie.

Crozier *et al.* (1991) relataram que a amplificação de um fragmento do gene citocromo b e sua digestão com *Bgl* II era capaz de discriminar as abelhas da linhagem africana (inclusive as africanizadas) das européias *mellifera* e *ligustica*.

Amplificando três fragmentos de diferentes regiões (subunidade ribossomal 16S, citocromo oxidase I e região intergênica COI-COII) e digerindo-os com enzimas de restrição específicas, Hall e Smith (1991) distinguiram diferentes padrões, os quais foram atribuídos aos ramos A, M e C.

Em 1993, Garnery *et al.* descreveram uma metodologia que requer a digestão do fragmento tRNA^{leu}-COII com a endonuclease *Dra* I. Esta técnica se tornou amplamente utilizada em trabalhos sobre biogeografia e introgressões de *A. mellifera*, seja na Europa (Garnery *et al.*, 1995; Franck *et al.*, 1998, 2000a; Palmer *et al.*, 2000), Ilhas Canárias (De la Rúa *et al.*, 1998, 2001, 2002), África (Moritz *et al.*, 1994; Hepburn *et al.*, 2000; Franck *et al.*, 2001) ou Oriente Médio (Franck *et al.*, 2000b). A ampla utilização dessa metodologia se deve à diferenciação de diversos haplótipos pertencentes aos ramos evolutivos, de acordo com a distribuição geográfica das subespécies. Dessa forma, segundo Garnery *et al.* (1993), cada ramo evolutivo possui uma variante de comprimento característica para seqüências denominadas de P₀ (ramo A), P (ramo M) ou ausência de P (ramo C). A combinação das variantes P com até três repetições de seqüências Q (P₀Q, P₀QQ, P₀QQQ, PQ, PQQ, PQQQ e Q) é que caracteriza os diferentes haplótipos dentro de cada ramo.

Os polimorfismos observados com os marcadores de DNA mitocondrial têm se mostrado efetivos não somente nos estudos com populações africanas ou européias, mas também nos trabalhos com as abelhas africanizadas do continente americano.

De acordo com Smith *et al.* (1989), 97% das colônias de abelhas africanizadas do Brasil, Venezuela, Honduras e México foram classificadas como possuindo DNA mitocondrial africano. Hall e Muralidharan (1989) e Hall e Smith (1991), sugerem, por meio de resultados obtidos com *Bgl* II (citb), uma origem via *A. m. scutellata* para as abelhas africanizadas, tendo os enxames africanos migrado com suas linhagens maternas intactas.

Sheppard *et al.* (1991), estudando abelhas coletadas no estado de São Paulo, descreveram que o mtDNA possuía forte influência da subespécie *scutellata*.

Na Costa Rica, Lobo (1995) estudou a composição genética de populações de *A. mellifera*, analisando os sítios de restrição para *Eco* RI (16S) e *Hinc* II (COI). O autor verificou que os padrões do DNA mitocondrial não indicavam origem europeia das abelhas, dados que contrastavam com os alelos característicos de populações europeias, observados com o marcador bioquímico MDH.

Colônias provenientes do México e Honduras apresentaram mtDNA africano, porém com uma frequência de 26 a 31% de alelos de DNA nuclear europeu (Hall e McMichael, 2001). Segundo os autores, estes resultados sugerem que as rainhas descendentes das africanas introduzidas no Brasil se acasalaram com zangões europeus, permitindo a incorporação de marcadores neutros que têm sido mantidos na população africanizada em expansão.

No Brasil, as abelhas africanizadas analisadas por Rotta (1999) apresentaram padrões predominantemente africanos, de acordo com os fragmentos originados pela endonuclease *Bgl* II para o loco *citb*, a despeito dos resultados obtidos com as alozimas que indicaram uma frequência de mais de 20% de alelos europeus nas abelhas brasileiras de certas áreas.

A utilização dos padrões gerados para o fragmento da região tRNA^{leu}-COII tem sido observada em trabalhos realizados não somente com subespécies da Europa, África ou Oriente Médio, como também têm contribuído com os estudos que envolvem o processo de africanização na América.

Amostras de abelhas africanizadas da Costa Rica (Segura, 2000), Venezuela (Clarke *et al.*, 2001) e México (Clarke *et al.*, 2001; Franck *et al.*, 2001) apresentaram uma predominância dos padrões A1 e A4 para a região tRNA^{leu}-COII. Tais padrões são característicos de populações de abelhas africanas. Padrões característicos das subespécies europeias ou mesmo outros padrões africanos foram encontrados em frequências reduzidas nesses países.

Embora mitótipos africanos sejam predominantes nas populações africanizadas, Diniz *et al.* (2003) relataram a presença de um padrão denominado “português” quando analisaram colônias provenientes do Brasil e Uruguai. Tal denominação se deve ao fato de haver evidências que apontam Portugal como possível origem desse padrão. Da mesma forma, Sheppard *et al.* (1991) já haviam descrito o mesmo padrão em amostras de abelhas da Argentina.

Amostras de colônias africanizadas da Argentina também apresentaram resultados com a região tRNA^{leu}-COII que levaram Sheppard *et al.* (1999) a concluir que mais de 25% do DNA mitocondrial africanizado daquele país possuía origem diferente de *A. m. scutellata*.

Analisando amostras brasileiras e uruguaias, Ferreira (2002) sugeriu que seria possível esclarecer a verdadeira origem das abelhas africanizadas por meio da região tRNA^{leu}-COII. A autora se baseou nos polimorfismos gerados pela enzima *Dra* I para inferir uma possível origem diferente de *A. m. scutellata* para as abelhas africanizadas.

2. Justificativa e Objetivos

De acordo com o exposto na introdução desse trabalho, a despeito dos resultados obtidos a respeito do processo de africanização utilizando as diferentes abordagens metodológicas, é possível verificar que alguns pontos ainda exigem maior atenção:

1. Pelo fato de que os padrões *Bgl* II diferenciam somente entre a linhagem européia e africana, uma possível origem mais diversa das colônias africanizadas não pode ser detectada com este marcador. Portanto, os resultados obtidos por meio de *Bgl* II não contribuíram para a caracterização de possíveis linhagens diferentes na formação das populações africanizadas. Polimorfismos gerados por outras regiões do DNA mitocondrial de abelhas africanizadas da América sugerem uma herança mitocondrial mais diversa para essas populações. Portanto, a análise dos padrões gerados por *Dra* I na região tRNA^{leu}-COII podem auxiliar no esclarecimento da origem mitocondrial das abelhas africanizadas, devido ao grande número de padrões relacionados às diferentes subespécies pertencentes aos ramos A, M e C envolvidos no processo de africanização.

2. Resultados gerados pelos polimorfismos nucleares (morfometria, alozimas e DNA nuclear) apontam uma significativa contribuição de genes europeus na formação das populações africanizadas. Por outro lado, o DNA mitocondrial dessas populações tem se mostrado composto quase que exclusivamente da linhagem africana. Portanto, essa assimetria que aparentemente existe entre os marcadores nucleares e mitocondriais merece ser confirmada a partir dos resultados obtidos de um marcador mitocondrial mais informativo.

Dessa forma, o trabalho intitulado “Estrutura genética das populações de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) do Brasil determinada por meio do

polimorfismo da região tRNA^{leu}-COII do DNA mitocondrial” tem como objetivo apresentar os padrões mitocondriais obtidos com a endonuclease *Dra* I na região intergênica tRNA^{leu}-COII de amostras do Brasil e Uruguai. Será discutida a relação desses padrões com a origem européia ou africana das populações de *Apis mellifera* das Américas e o quanto esses padrões são informativos para a compreensão dos processos que levaram à formação dessas populações. A contribuição desse marcador para o entendimento da provável assimetria entre os resultados obtidos com marcadores nucleares e mitocondriais também é abordada.

Durante o desenvolvimento do trabalho proposto, foi possível estabelecer o uso de nova metodologia, tanto para os estudos das abelhas africanizadas das Américas como para as demais introduções ocorridas mundialmente. Portanto, o trabalho “Padrões de PCR-RFLP da região 16S do DNA mitocondrial diferenciam ramos evolutivos de *Apis mellifera*” apresenta os resultados obtidos a partir desta região mitocondrial, que permite identificação mais rápida, barata e segura das subespécies pertencentes aos três ramos evolutivos de *A. mellifera* mais estudados (A, M e C).

3. Referências Bibliográficas

- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**, Viçosa – MG. Ed. UFV, 1998, 574 p.
- ALPATOV, V.V. Biometrical studies on variation and the races of honeybee. **Q. Rev. Biol.**, v. 4, p. 1-58, 1929.
- ALPATOV, V.V. The races of honeybees and their use in agriculture. **Sredi Prirody**, v. 4, p. 1-65, 1948.
- ARIAS, M.C. & INFANTE-MALAQUIAS, 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. 202p.
- BADINO, G., CELEBRANO, G., MANINO, A.. Population genetics of Italian honeybees (*Apis mellifera ligustica* Spin) and its relationship with neighboring subspecies. **Bull. Mus. Reg. Sci. Nat. Torino**, v. 2, p. 571-584, 1984.
- BUCO, S.M., RINDERER, T.E., SYLVESTER, H.A., COLLINS, A.M., LANCASTER, V.A. & CREWE, R.M. Morphometric differences between South American Africanized and South African (*Apis mellifera scutellata*) honey bees. **Apidologie**, v. 18, p. 217-222, 1987.
- CLARKE, K.E., RINDERER, T.E., FRANCK P., QUEZADA-EUÁN, J.G. & OLDROYD, B.P. The Africanization of honey bees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatán: a study of a massive hybridization event across time. **Evolution**, v. 56, p. 1462-1474, 2002.
- CORNUET, J.M. The MDH system in honeybees of Guadeloupe. **J. Hered.**, v. 70, p. 223-224, 1979.
- CROZIER, Y.C., KOULIANOS, S. & CROZIER, R.H. An improved test for Africanized honey bee mitochondrial DNA. **Experimentia**, v. 47, p. 968-969. 1991.

- CROZIER, R.H. & CROZIER, Y.C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. **Genetics**, v. 133, p. 97-117, 1993.
- DANKA, R.G., HELLMICH, R.L. & RINDERER, T.E. Nest usurpation, supersedure and colony failure contribute to Africanization of commercially managed European honey bees in Venezuela. **J. Apic. Res.**, v. 31, p. 119-123, 1992.
- DEGRANDI-HOFFMAN, G., COLLINS, A., MARTIN, J.H., SCHMIDT, J.O. & SPANGLER, H.G. Nest defense behavior in colonies from crosses between Africanized and European honey bees (*Apis mellifera* L.). **J. Insect Behav.**, v. 11, p. 37-45, 1998.
- DE LA RÚA, P., GALIÁN, J., SERRANO, J. & MORITZ R.F.A. Molecular characterization and population structure of the honeybees from the Balearic islands (Spain). **Apidologie**, v. 32, p. 417-427, 2001.
- DE LA RÚA, P., SERRANO, J. & GALIÁN, J. Biodiversity of *Apis mellifera* populations from Tenerife (Canary Islands) and hybridization with East European races. **Biodiv. Conserv.**, v. 11, p. 59-67, 2002.
- DEL LAMA, M.A., FIGUEIREDO, R.A., SOARES, A.E.E. & DEL LAMA, S.N. Hexoquinase polymorphism 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, p. 271-280, 1990.
- DEL LAMA, M.A., SOUZA, R.O., DURAN, X.A. & SOARES A.E.E. Clinal variation and selection on MDH allozymes in honeybees in Chile. **Hereditas**, v. 140, p. 149-153, 2004.

- DINIZ-FILHO, J.A.F. **Varição geográfica de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) no Brasil**. 1994. 125p. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, Brasil.
- 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 – Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução. Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil.
- FRANCK, P., GARNERY, L., CELEBRANO, G., SOLIGNAC, M. & CORNUET, J.M. Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). **Mol. Ecol.**, v. 9, p. 907-921, 2000a.
- FRANCK, P., GARNERY, L., SOLIGNAC, M. & CORNUET, J.M. Molecular confirmation of a fourth lineage in honey bees from the Near East. **Apidologie**, v. 31, p. 167-180, 2000b.
- GARNEY, 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**. 2º Ed. Oxford University Press. London, 1996.
- GONÇALVES, L.S. Principais impactos biológicos causados pela africanização das abelhas *Apis mellifera* e perspectivas da apicultura brasileira. **Anais do III Encontro sobre Abelhas**. Ribeirão Preto, SP, Brasil, p. 31-36, 1998.
- GUZMÁN-NOVOA, E., PAGE, R.E. & FONDRK, M.K. Morphometric techniques do not detect intermediate and low levels of Africanization in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 85, p. 507-515, 1994.
- HALL, H.G. DNA differences found between Africanized and European honeybees. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 4874-4877, 1986.

- HALL, H.G. Parental analysis of introgressive hybridization between African and European honeybees using nuclear DNA RFLPs. **Genetics**, v. 125, p. 611-621, 1990.
- HALL, H.G. & MCMICHAEL, 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. Further characterization of nuclear DNA RFLP markers that distinguish African and European honeybees. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 19, p. 163-175, 1992.
- HALL, H.G. PCR amplification of a locus with RFLP alleles specific to African honey bees. **Biochem. Genet.**, v. 36, p. 351-361, 1998.
- HEPBURN, H.R.; RADLOFF, S.E. & OGHIKHE, S. Mountain honeybees of Africa. **Apidologie**, v. 31, p. 205-221, 2000.
- KERR, W.E. The history of introduction of African bees to Brazil. **South Afric. Bee J.**, v. 39, p. 3-5, 1967.
- KUNZMANN, M.R., BUCHMANN, S.L., EDWARDS, J.F., THOENES, S.C. & ERICKSON E.H. Africanized bees in North America, www.biology.usgs.gov/s+t/noframe, 2002.
- 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. & KRIEGER, H. Maximum likelihood estimates of gene frequencies and racial admixture in *Apis mellifera* L. (Africanized honey bees). **Heredity**, v. 68, p. 441-448, 1992.
- McDOWELL, R. The Africanized honey bee in the United States: What will happen to the US beekeeping industry? **Agricultural Economic Report** (US Department of Agriculture, Washington, DC), nº 519, 1984.

- McMICHAEL, M.A. & HALL, H.G. DNA RFLPs at a highly polymorphic locus distinguish European and African subspecies of the honey bee, *Apis mellifera* L., and suggest geographical origins of New World honey bees. **Mol. Ecol.**, v. 5, p. 403-416, 1996.
- MILNER, A. An introduction to understanding honeybees, their origins, evolution and diversity. Bee improvement and bee breeders' association. www.angus.co.uk/bibba/bibborig, 1996.
- OLDROYD, B.P., CORNUET, J.M., ROWE, D., RINDERER, T.E. & CROZIER R.H. Racial admixture of *Apis mellifera* in Tasmania, Australia: similarities and differences with natural hybrid zones in Europe. **Heredity**, v. 74, p. 315-325, 1995.
- PAGE, R.E.JR, FONDRK, M.K., HUNT, G.J., GUZMÁN-NOVOA, E., HUMPHRIES, M.A., *et al.* Genetic dissection of honey bee (*Apis mellifera*) foraging behavior. **J. Hered.**, v. 91, p. 474-479, 2000.
- PALMER, M.R., SMITH, D.R. & KAFTANOGLU, O. Turkish honey bees: genetic variation and evidence for a fourth lineage of *Apis mellifera* mtDNA. **J. Hered.**, v. 91, p. 42-46, 2000.
- 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**, v. 79, p. 361-382, 1998.
- ROTTA, I.T. **Análise aloenzimática, morfométrica e dos padrões do DNA mitocondrial das abelhas africanizadas do Brasil.** 1999. 110p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução. Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil.
- RUTTNER, F., TASSENCOURT, I. & LOUVEAUX, J. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. **Apidologie**, v. 9, p. 363-381, 1978.
- RUTTNER, F. **Biogeography and taxonomy of honeybee.** New York-Berlin, Springer-Verlag, 1988. 284 pp.

- 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., RINDERER, T.E., MAZOLLI, J.A., STELZER, J.A. & SHIMANUKI, H. Gene flow between African-and European – derived honeybee populations in Argentina. **Nature**, v. 349, p. 7882-7884, 1991.
- SUAZO, A. & HALL, H.G. Nuclear DNA PCR-RFLPs that distinguish African and European honey bee groups of subspecies. I. Comparison of long PCR and standard PCR to screen for polymorphisms. **Biochem. Genet.**, v. 40 p. 225-239, 2002.
- SUAZO, A. McTIERMAN, R. & HALL, H.G. A locus with restriction fragment-length polymorphisms characteristic of African and European honey bee (Hymenoptera: Apidae) groups of subspecies. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 95, p. 115-124, 2002.
- TAYLOR, O.R. African bees: potential impact in the United States, **Bull. Entomol. Soc. Am.**, v. 31, p. 15-24. 1985.

4.

Padrões de PCR-RFLP da região 16S do DNA mitocondrial diferenciam ramos evolutivos de *Apis mellifera*

Thaís Collet^a, Maria Cristina Arias^b, Marco Antonio Del Lama^a

^a Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil

^b Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Palavras-chave: *Apis mellifera* / linhagens evolutivas / diferenciação / DNA mitocondrial / PCR-RFLP

4.1. Resumo

Análises de padrões de restrição das regiões do DNA mitocondrial podem ser utilizadas para classificar as subespécies de *Apis mellifera* nos ramos evolutivos M, C ou A, propostos por Ruttner *et al.* (1978) com dados de morfometria. Neste trabalho, são descritos diferentes padrões de restrição do mtDNA 16S para *A. m. mellifera*, *A. m. ligustica* e *A. m. scutellata*. Embora distintos padrões tenham sido obtidos com *Eco* RI, *Alu* I, *Hinc* II and *Taq* I, a diferenciação mais evidente entre os três haplótipos foi obtida com *Dra* I e *Vsp*. Análises da sequência nucleotídica do fragmento do gene 16S revelou 10 sítios de substituição de base (1,35%) entre as três subespécies, além de duas inserções em *A. m. scutellata*. A identificação molecular de subespécies de origem européia tem se baseado no padrão de restrição do gene mitocondrial CO I com a enzima *Hinc* II. Entretanto, foram observados alguns resultados inconsistentes na utilização deste método, confirmando a relevância da nova metodologia descrita neste trabalho.

4.2. Introdução

De acordo com evidências filogeográficas e morfométricas, Ruttner *et al.* (1978) agruparam as subespécies de *Apis mellifera* em três linhagens ou ramos evolutivos: M (Europa Ocidental), C (leste europeu) e A (África). A distribuição original dos ramos tem sido progressivamente alterada devido às sucessivas introduções realizadas por apicultores, de forma que, atualmente, as abelhas pertencentes a essas linhagens podem ser encontradas em várias partes do mundo. O transporte em larga escala de populações de *A. mellifera* deu início a uma “mistura” de linhagens. A compreensão das mudanças na composição genética das populações residentes, como resultado de introduções em diferentes áreas geográficas, requer o uso de ferramentas que diferenciam as várias linhagens de *A. mellifera*.

A composição genética de populações introduzidas tem sido investigada ao longo dos últimos 25 anos. Estudos desta natureza foram realizados com as populações da ilha de Guadalupe (Cornuet, 1979), da Argentina (Sheppard *et al.*, 1991), da Tasmânia, na Austrália (Oldroyd *et al.*, 1995), nas ilhas Baleares (de la Rúa *et al.*, 2001), Yucatan, no México (Clarke *et al.*, 2001), sul do Brasil e Uruguai (Diniz *et al.*, 2003), Peru (Quezada-Euán *et al.*, 2003) e Chile (Del Lama *et al.*, 2004), entre outros. O exemplo mais marcante resultante da introdução de diferentes subespécies de *Apis mellifera* em uma área ocorreu na América do Sul. O evento chave deste processo ocorreu na década de 50, quando a subespécie africana *A. m. scutellata* foi introduzida no Brasil com o objetivo de melhorar a produção de mel no país (Kerr, 1967). Após o escape de algumas rainhas africanas em 1957 de um apiário onde se encontravam em quarentena, rainhas africanas iniciaram um processo de intercruzamento com subespécies européias residentes, iniciando assim o processo de africanização das abelhas sul-americanas e, posteriormente, da América Central e do Norte. Atualmente, abelhas Africanizadas são encontradas em grande parte do continente americano, inclusive em várias áreas dos EUA. Por esta razão, vários estudos de genética de

populações têm sido realizados para investigar o grau de hibridização entre abelhas européias e africanas em diferentes regiões (Lobo *et al.*, 1989; Rinderer *et al.*, 1991; Sheppard *et al.*, 1991; Hall e McMichael, 2001).

A necessidade de caracterizar geneticamente as populações e identificar a origem materna das colônias levou ao desenvolvimento de métodos capazes de realizar tal caracterização. Dentre os métodos propostos, os marcadores mitocondriais têm sido bastante utilizados, pois têm se mostrado efetivos na diferenciação de populações envolvidas em processos de hibridização (Hall e Smith, 1991; Garnery *et al.*, 1993).

A metodologia mais utilizada atualmente na identificação da origem materna das colônias que constituem as populações africanizadas consiste na amplificação do gene para citocromo *B* (*citB*), seguida da restrição com *Bgl* II. Este teste determina o padrão europeu (*mellifera* ou *ligustica/carnica*) caso um sítio de restrição esteja presente ou o padrão Africano (*scutellata*) na ausência deste sítio (Crozier *et al.*, 1991). Na presença do padrão europeu, o protocolo segue com a amplificação dos genes *CO I* e *Ls rRNA* e a digestão com *Hinc* II e *Eco* RI, respectivamente (Hall e Smith, 1991). O sítio *Hinc* II para *COI* caracteriza o haplótipo *mellifera*, característico das populações da Europa Ocidental, enquanto o sítio *Eco* RI para *Ls rRNA* constitui o padrão das populações do leste europeu (*ligustica*, *carnica* e *caucasica*).

Embora os atuais métodos permitam a distinção entre estas subespécies, fica evidente as vantagens de novos protocolos que minimizem o tempo e os custos para se obter tal diferenciação. Neste trabalho, nós descrevemos os padrões de amplificação e restrição da região 16S do DNA mitocondrial em amostras de *Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica* e abelhas Africanizadas (*Apis mellifera scutellata*). Foi observada a ocorrência de ligeiras diferenças na mobilidade eletroforética do fragmento amplificado em cada subespécie. Estas diferenças podem ser mais facilmente visualizadas com o uso de diferentes endonucleases, produzindo padrões de restrição distintos entre estas subespécies. Portanto, a análise da região do gene 16S possibilita a

identificação entre raças dos três ramos evolutivos propostos por Ruttner *et al.* (1978) empregando uma única região do genoma mitocondrial, eliminando a necessidade de amplificação de outras regiões. Análises comparativas entre o método aqui proposto e os procedimentos anteriores (Crozier *et al.*, 1991; Hall e Smith, 1991) demonstraram que o novo método evita certas inconsistências que o anterior parece produzir para abelhas dos ramos C e M.

4.3. Material e Métodos

4.3.1. Amostras e Extração de DNA

Foi amostrado um total de 290 colônias, sendo 39 de *A. m. mellifera*, 86 de *A. m. ligustica* e 165 de abelhas africanizadas (AHB). Uma operária foi analisada para cada colônia e as localidades de coleta estão descritas na Tabela I. As abelhas, coletadas de colônias ferais ou apiários, foram mantidas a -20° C. O DNA total foi extraído do tórax de cada indivíduo, de acordo com o método fenol-clorofórmio descrito por Sheppard e McPheron (1991).

4.3.2. Amplificação por PCR e Digestão com Endonucleases

As regiões do DNA mitocondrial amplificadas e seus respectivos primers (Crozier et al., 1991; Hall & Smith, 1991) foram: 485 pb do gene citocromo *b* (*Cit b*) (F: 5' – TAT GTA CTA CCA TGA GGA CAA ATA TC – 3' e R: 5' – ATT ACA CCT CCT AAT TTA TTA GGA AT – 3'), 1044 pb do gene citocromo oxidase I (*COI*) (F: 5'- TTA AGA TCC CCA GGA TCA TG – 3' e R: 5'- TGC AAA TAC TGC ACC TAT TG – 3') e parte do gene 16S compreendido entre os primers F: 5' – TTT TGT ACC TTT TGT ATC AGG GTT G – 3' e R: 5' – CTA TAG GGT CTT ATC GTC CC – 3'. A PCR foi realizada num volume total de 25 μ l, contendo tampão de reação 10x, 250 μ M de cada dNTP, 2,5mM de MgCl₂, 1 μ M dos primers F e R, 1 μ l de DNA, 1 U de Taq Polymerase (Promega) e 16 μ l de água esterilizada. A amplificação por PCR para *Cit b* e *16S* foi realizada da seguinte forma: 90 $^{\circ}$ C por 1 min, 54 $^{\circ}$ C por 45s e 62 $^{\circ}$ C por 2 min. A reações para *COI* foram submetidas a uma denaturação inicial de 3 min a 94 $^{\circ}$ C seguida por 3 ciclos de 94 $^{\circ}$ C por 1 min, 50 $^{\circ}$ C por 2 min, 72 $^{\circ}$ C por 3 min; 35 ciclos de 94 $^{\circ}$ C por 1 min seguido por 2 min a 50 $^{\circ}$ C, 1,5 min a 72 $^{\circ}$ C e uma extensão final de 5 min a 72 $^{\circ}$ C. Depois da amplificação, 2 μ l dos produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em géis de poliacrilamida 8% e 2 μ l foram digeridos com as seguintes enzimas de

Tabela I. Número de colônias de *Apis mellifera* e seus respectivos países de coleta. As subespécies foram determinadas de acordo com os padrões do mtDNA. N: número de colônias e n: número de localidades amostradas.

País	N (n)	Padrões Observados		
		<i>mellifera</i>	<i>ligustica</i>	africano
Brasil	60 (31)			60
Chile	36 (27)	17	19	
Colômbia	82 (24)		23	59
Espanha	5 (5)	3		2
EUA	13 (1)		13	
Itália	46 (3)	18	27	1
Uruguai	48 (6)	1	4	43
Total	290 (97)	39	86	165

restrição: *Eco* RI, *Alu* I, *Hinc* II, *Taq* I, *Vsp* I e *Dra* I para o fragmento 16S; *Bgl* II para *Cit b* e *Hinc* II para *COI*. As reações de digestão foram mantidas a 37^o C por 4h (exceto para *Taq* I que necessita de 60^o C por 4h). Os fragmentos de restrição foram separados em géis de poliacrilamida 10%.

Análises de restrição das regiões mitocondriais citocromo *b* (*citb*) e *COI* foram realizadas para a caracterização molecular comparativa das amostras de abelhas. Portanto, esta caracterização prévia se deu como um controle para o padrão da linhagem africana (ausência do sítio *Bgl* II na região *cit b*) e para a diferenciação dentro das subespécies europeias (apenas *A. m. mellifera* possui o sítio *Hinc* II na região *COI*).

Uma digestão dupla foi feita com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Vsp* I para as subespécies de *A. mellifera* a fim de se obter uma diferenciação mais acentuada entre as três linhagens evolutivas.

4.3.3. Clonagem e Seqüenciamento do DNA

Fragmentos de PCR da região 16S, representando os três padrões de restrição obtidos, foram clonados utilizando o kit de clonagem T-Easy (Promega) e utilizados para transformar células competentes DH-5 α de *E. coli*. Os clones positivos foram selecionados e os vetores recombinantes recuperados e seqüenciados de acordo com protocolos sugeridos pela Applied Biosystem (www.appliedbiosystems.com). O seqüenciador automático ABI-3100 (Applied Biosystems) foi utilizado para seqüenciar as amostras. Dois clones de cada padrão foram seqüenciados a partir de ambas as direções. Os dados de seqüência foram analisados por alinhamento múltiplo com o auxílio do programa Multalin (www.toulouse.inra.fr/multalin).

4.4. Resultados

As duas subespécies europeias e a africanizada apresentaram diferentes padrões de restrição para a região 16S. Os padrões de *Eco* RI, *Alu* I, *Hinc* II, *Taq* I, *Vsp* I e *Dra* I foram característicos para cada subespécie e para as africanizadas. (Figura 1). Entre os 290 indivíduos analisados, não observou-se variação para os padrões de amplificação e restrição dentro de cada subespécie.

O tamanho total do fragmento amplificado variou de acordo com a origem do mtDNA, sendo de 740 pb em *A. m. ligustica* e *A. m. mellifera* e 742 em *A. m. scutellata*.

Comparações por alinhamento múltiplo das seqüências de DNA revelaram substituições nucleotídicas em 10 sítios (1,35%), sendo oito transições (1 A↔G e 7 C↔T) e duas transversões (1 A↔T e 1 C↔A) (Figura 2). Além disso, *A. m. scutellata* apresentou duas inserções (T e A) nas posições 390 e 391, respectivamente.

Algumas substituições de base ou inserções ocorreram em sítios de restrição. O sítio *Vsp* I na posição 391 foi perdido em *A. m. scutellata*, devido às duas inserções. Foi observado também a perda de um sítio *Dra* I na posição 477 de *A. m. ligustica*, ocasionado por uma substituição.

A origem racial identificada por *Vsp* I, *Dra* I e *Eco* RI (região 16S) foi comparada com aquela que se utiliza dos padrões de *Bgl* II (Cit b) e *Hinc* II (COI). Para a maioria das amostras, as duas abordagens moleculares estavam de acordo. Entretanto, algumas exceções foram observadas com o sítio *Hinc* II no gene COI. Por exemplo, duas colônias (que corresponde a 5,55%) do Chile foram identificadas como *mellifera* de acordo com *Hinc* II (COI), mas apresentaram padrão *ligustica* por *Vsp* I, *Dra* I e *Eco* RI (16S). Um resultado discordante também foi obtido em 13% (ou seja, seis colônias) das amostras italianas. Além disso, uma colônia da Itália (C5) foi tipada com o padrão africano de acordo com *Vsp* I, *Dra* I e *Eco* RI (16S) e *Bgl* II (Cit b), mas o padrão *Hinc* II (COI) foi característico de *mellifera* (ver tabela II).

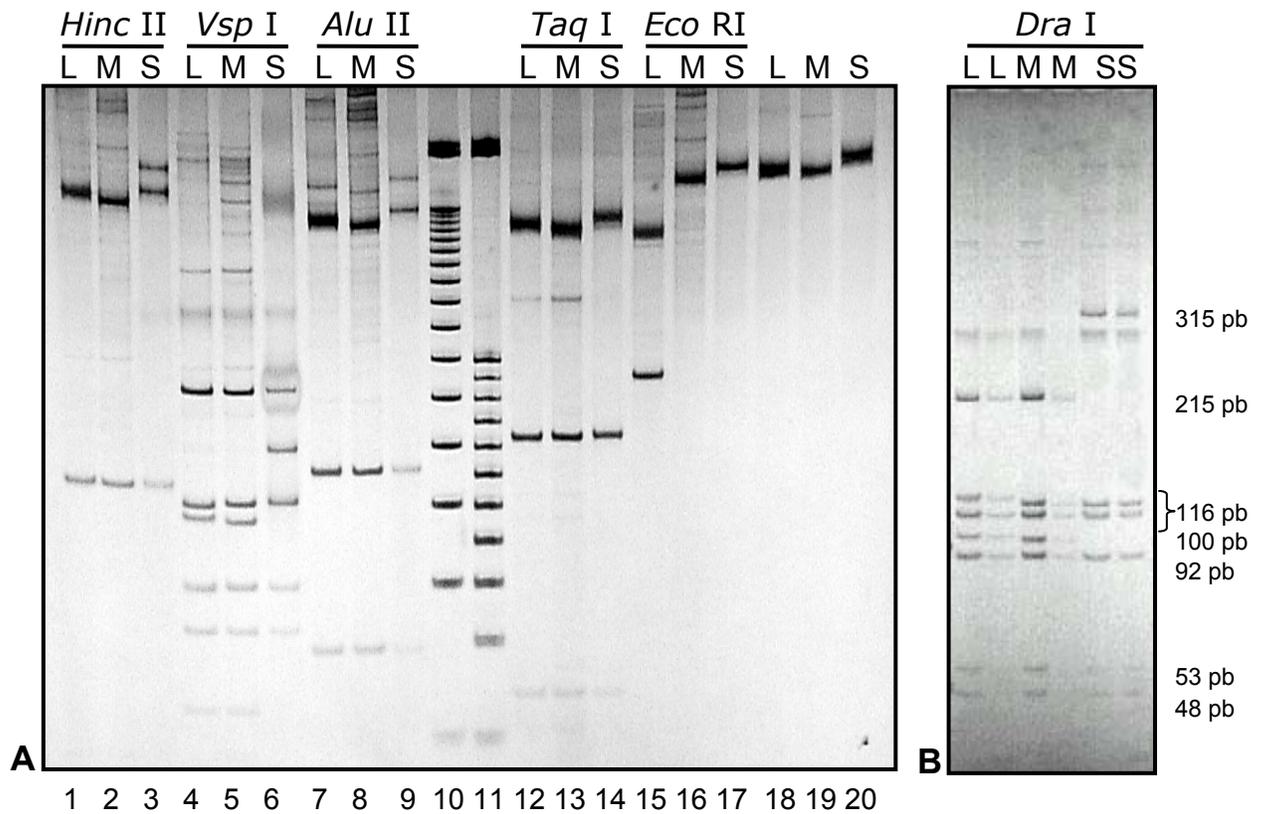


Figura 1. Padrões de amplificação e restrição do fragmento da região 16S do DNA mitocondrial de *Apis mellifera* em géis de poliácridamida 10% corados com prata. As enzimas de restrição utilizadas e seus respectivos padrões estão indicados acima. L: *A. m. ligustica*, M: *A. m. mellifera* e S: *A. m. scutellata*. **A:** Linhas 10 e 11 correspondem aos marcadores de peso molecular de 50pb e 25 pb respectivamente. Linhas 18, 19 e 20 representam os fragmentos amplificados. **B:** Padrões de restrição obtidos com *Dra* I para o fragmento da região 16S.

	13770	13811	13961	13990	14018	14025	14159	14182	14190	14352	14383	14405
<i>A. m. ligustica</i> *	T	A	A	C	C	C	A	C	T	C	T	C
<i>A. m. ligustica</i>	T	G
<i>A. m. mellifera</i>	C	T	G	A	.	T	.	T	C	T	C	T
<i>A. m. scutellata</i>	C	.	G	.	T	T	.	T	C	.	.	T

Figura 2. Sítios de variação do fragmento 16S. Os números correspondem às posições nucleotídicas de *A. m. ligustica* (*) publicada por Crozier e Crozier (1993). As posições 14025 e 14159 representam diferenças entre as seqüências descritas neste trabalho e as de Crozier e Crozier (1993). Os pontos indicam identidade nucleotídica. As abelhas africanizadas (padrão *scutellata*) apresentaram duas inserções nas posições 14097 e 14098 (respectivamente 390 e 391 no fragmento de 742 pb).

Tabela II. Padrões discordantes observados nos diferentes marcadores utilizados na identificação das subespécies.

País	Colônia	Cit B	COI	16S		
		<i>Bgl</i> II	<i>Hinc</i> II	<i>Vsp</i> I	<i>Dra</i> I	<i>Eco</i> RI
Itália	C5	A	M	A	A	A
Itália	M3	NA	NM	M	M	M
Itália	MA	NA	M	L	L	L
Itália	MD2	NA	NM	M	M	M
Itália	MD7	NA	M	L	L	L
Itália	MD10	NA	M	L	L	L
Chile	Coyhaique		M	L		
Chile	Olmoé		M	L		L

A: padrão africano;

NA: não africano;

M: padrão *mellifera*;

NM: não *mellifera*;

L: padrão *ligustica*

A digestão dupla com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Vsp* I para as subespécies de *A. mellifera* permitiram uma diferenciação mais acentuada entre os três ramos evolutivos (Figura 3).

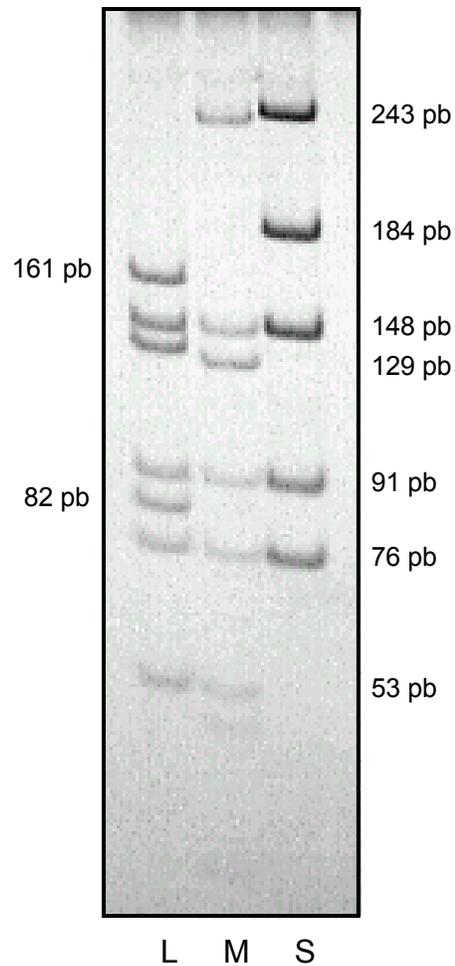


Figura 3. Padrões de digestão dupla obtidos com *Eco* RI e *Vsp* I no fragmento da região 16S do DNA mitocondrial de *Apis mellifera*. L: *A. m. ligustica*; M: *A. m. mellifera* e S: *A. m. scutellata*.

4.5. Discussão

A amplificação por PCR do fragmento do gene 16S e a subsequente digestão com algumas enzimas de restrição revelaram padrões característicos para as subespécies *A. m. mellifera*, *A. m. ligustica* e *A. m. scutellata*. Como não foi observado nenhuma variação dentro das subespécies, podemos inferir que esses padrões estão fixados e que, dessa forma, este protocolo permite uma distinção rápida, barata e segura entre os haplótipos das linhagens M, C e A.

As metodologias utilizadas até então, além de seguirem protocolos mais longos, são baseadas em resultados que apresentam padrões de presença/ausência de sítios de restrição para as endonucleases, o que eventualmente pode levar a resultados do tipo “falso negativo”. O padrão *COI* para *Hinc* II, por exemplo, apresentou resultados discordantes daqueles obtidos com *Bgl* II (*Cit B*) e *Vsp* I e *Dra* I (16S), indicando que esse marcador pode produzir possíveis erros na identificação da origem materna das colônias. Por outro lado, as seis enzimas utilizadas para digestão do fragmento 16S confirmaram os padrões característicos de cada subespécie.

O fragmento 16S analisado neste trabalho demonstrou uma taxa de substituição de 1,35% para os 740/742 pb, um valor levemente mais baixo quando comparado com 1,67% para 656/658 pb da região que compreende o tRNA ILE e parte do gene ND2 do mtDNA dessas mesmas subespécies (Arias & Sheppard, 1996). Como esperado, o fragmento 16S apresentou um alto conteúdo de A + T. De acordo com Whitfield e Cameron (1998), insetos em geral e particularmente Hymenoptera, exibem um significativo conteúdo A+T, um resultado também observado por Crozier e Crozier (1993), Cameron (1993) e Arias e Sheppard (1996) para *Apis mellifera*. Neste trabalho, foram observadas 8 transições e 2 transversões, como esperado para taxa intimamente relacionados. Outras regiões do mtDNA têm demonstrado altas taxas de transição em relação às transversões. Arias e Sheppard (1996) descreveram 9 transições para 1 transversão na região tRNA ILE – parte do gene ND2.

As amostras da Galícia (Espanha), evidenciaram a coexistência de haplótipos característicos das linhagens M e A, resultado concordante com estudos prévios (Smith *et al.*, 1991; Franck *et al.*, 1998). Estes autores apontam a Espanha como uma possível zona de contato secundário entre essas linhagens. Dados obtidos com amostras da Itália continental evidenciaram ambos os haplótipos *mellifera* e *ligustica*. O elevado número de colônias com padrão *mellifera* na Itália parece, à primeira vista, contradizer a distribuição original das subespécies. Entretanto, de acordo com Franck *et al.* (2000), as populações de abelhas italianas são compostas pelas linhagens M e C na maior parte do país. Estes mesmos autores relataram a ausência do padrão A na Itália continental mas a sua presença na Sicília. Estes achados corroboram dados prévios das análises filogenéticas de Arias e Sheppard (1996) de que as abelhas da subespécie *A. m. sicula* da Sicília pertencem ao ramo A.

A presença de uma colônia com o padrão A em nossas amostras da Itália continental não conformam os resultados de Franck *et al.* (2000). É possível que esses autores não observaram este padrão em suas amostras italianas devido à metodologia por eles utilizada (sítio *Hinc II* na região CO I).

A utilização das enzimas de restrição *Vsp I* e *Dra I* no fragmento amplificado permitiu a melhor distinção e conseqüente confirmação da origem das três subespécies em questão (Figura 1). Tal fato se deve às inserções ocorridas em *scutellata* nas posições 390/391 e à substituição na posição 477 de *ligustica*, que ocasionaram as perdas dos sítios *Vsp I* e *Dra I*, respectivamente. As subespécies *mellifera* e *ligustica* são claramente distinguidas na digestão com *Vsp I* devido à diferença na migração do fragmento de 129 pb. Quanto à diferenciação de *scutellata* e *mellifera* na digestão com *Dra I*, as inserções na subespécie africana dão origem a um fragmento de 102 pb, que no gel apresenta uma diferença de migração em relação ao fragmento de 100 pb de *mellifera*. Além disso, fica evidente para as duas subespécies que os fragmentos de 116 pb migram em posições distintas, certamente devido às diferenças conformacionais originadas a partir das substituições ocorridas nessa região.

A realização da digestão dupla com *Eco* RI e *Vsp* I torna ainda mais fácil a diferenciação entre os três ramos evolutivos. Esta digestão adicional é indicada somente nos casos em que o laboratório não dispõe de sistemas para eletroforese em gel de poliacrilamida capazes de permitir uma alta resolução. A razão da digestão dupla se justifica pelo fato de que somente as abelhas de origem *ligustica* apresentarão o sítio de restrição para *Eco* RI, facilitando sua distinção do padrão *mellifera*, cuja diferença produzida por *Vsp* I é menos pronunciada (ver Figura 3).

A presente caracterização de padrões do DNA mitocondrial distintos para as subespécies *A. m. mellifera*, *A. m. ligustica* e *A. m. scutellata* foi obtida a partir de um método mais rápido, barato e seguro. Análises subseqüentes são necessárias para que se possa determinar a utilidade da metodologia aqui proposta na caracterização da composição racial de populações resultantes de introduções de outras subespécies de *Apis mellifera*.

4.6. Referências Bibliográficas

Arias M.C., Sheppard W.S. (1996) Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence, Mol. Phylogenet. Evol. 5, 557-566.

Cameron S.A. (1993) Multiple origins of advanced eusociality in bees inferred from mitochondrial DNA sequences, Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 8687-8691.

Clarke K.E., Oldroyd B.P., Quezada-Euán J.J.G., Rinderer T.E. (2001) Origin of honeybees (*Apis mellifera*) from the Yucatan peninsula inferred from mitochondrial DNA analysis, Mol. Ecol. 10, 1347-1355.

Crozier Y.C., Koulianos S., Crozier R.H. (1991) An improved test for Africanized honey bee mitochondrial DNA, Experimentia 47, 968-969.

Crozier R.H., Crozier Y.C. (1993) The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization, Genetics 133, 97-117.

De la Rúa P., Galián J., Serrano J., Moritz R.F.A. (2001) Molecular characterization and population structure of the honeybees from the Balearic islands (Spain), Apidologie 32, 417-427.

Del Lama M.A., Souza R.O., Duran X.A., Soares A.E. (2004) Clinal variation and selection on MDH allozymes in honeybees in Chile, Hereditas 140, 149-53.

Diniz N.M., Soares A.E.E., Sheppard W.S., Del Lama M.A. (2003) Genetic structure of honeybee populations from southern Brazil and Uruguay, Genet. Mol. Biol. 26, 47-52.

Franck P., Garnery L., Solignac M., Cornuet J.M. (1998) The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data, Evolution 52, 1119-1134.

Franck P., Garnery L., Celebrano G., Solignac M., Cornuet J.M. (2000) Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*), Mol. Ecol. 9, 907-921.

Garnery L., Solignac M., Celebrano G., Cornuet J.M. (1993) A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L., Experientia 49, 1016-1020.

Hall H.G., Muralidharan K. (1989) Evidence from mitochondrial DNA that African honeybees spread as continuous maternal lineages, Nature 339, 211-213.

Hall H.G., Smith D.R. (1991) Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 4548-4552.

Kerr W.E. (1967) The history of introduction of African bees to Brazil, South Afric. Bee J. 39, 3-5.

Lobo J.A., Del Lama M.A., Mestriner M.A. (1989) Population differentiation and racial admixture in the Africanized honeybee (*Apis mellifera* L.), Evolution 43, 794-802.

Oldroyd B.P., Cornuet J.M., Rowe D., Rinderer T.E., Crozier R.H. (1995) Racial admixture of *Apis mellifera* in Tasmania, Australia: similarities and differences with natural hybrid zones in Europe, Heredity 74, 315-325.

Quezada-Euán J.J.G., Pérez-Castro E.E., May-Itzá W. (2003) Hybridization between European and African-derived honeybee populations (*Apis mellifera*) at different altitudes in Perú, Apidologie 34, 217-225.

Rinderer T.R., Stelzer J.A., Oldroyd B.P., Bucu S.M., Rubink W.L. (1991) Hybridization between European and Africanized honey bees in the neotropical Yucatan peninsula, *Science* 253, 309-311.

Rotta I.T. (1999) Análise aloenzimática, morfométrica e dos padrões do DNA mitocondrial das abelhas africanizadas do Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos.

Ruttner F., Tassencourt I., Louveaux J. (1978) Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L., *Apidologie* 9, 363-381.

Sheppard W.S., McPheron B.A. (1991) Ribosomal DNA diversity in Apidae, in: Smith D.R. (Ed.), *Diversity of the genus Apis*, Westview, Boulder, C.O., pp. 89-102.

Sheppard W.S., Rinderer T.E., Mazolli J.A., Stelzer J.A., Shimanuki H. (1991) Gene flow between African-and European – derived honeybee populations in Argentina, *Nature* 349, 7882-7884.

Smith D.R., Taylor O.R., Brown W.M. (1989) Neotropical Africanized honey bees have African mitochondrial DNA, *Nature* 339, 213-215.

Smith D.R., Palopoli M.F., Taylor O.R., Garnery L., Cornuet J.M., Solignac M., Brown W.M. (1991) Geographical overlap of two mitochondrial genomes in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*), *J. Hered.* 82, 96-100.

Whitfield J.B., Cameron S.A. (1998) Hierarchical analysis of variation in the mitochondrial 16S rRNA gene among Hymenoptera, *Mol. Biol. Evol.* 15, 1728-1743.

5.

Estrutura genética das populações de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) do Brasil determinada por meio do polimorfismo da região tRNA^{leu}-COII do DNA mitocondrial

Thaís Collet^a, Kátia Maria Ferreira^a, Ademilson Espencer Egea Soares^b, Maria Cristina Arias^c, Marco Antonio Del Lama^a

^a Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil

^b Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

^c Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Palavras-chave: *Apis mellifera* / africanização / DNA mitocondrial / tRNA^{leu}-COII / estrutura de populações

5.1. Resumo

Polimorfismos gerados pela endonuclease *Dra* I na região intergênica tRNA^{leu}-COII do DNA mitocondrial foram utilizados para o estudo da estrutura genética de populações de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) provenientes do Brasil e Uruguai. Estas populações apresentaram um total de 11 mitótipos, dos quais três ainda não haviam sido descritos (A28, A29 e A30). Os padrões A29 e A30 apresentaram a seqüência P₁, característica de padrões observados na Península Ibérica e, mesmo em baixas freqüências, tais mitótipos poderiam indicar vestígios de introduções ibéricas no Brasil e Uruguai que ainda contribuem para a formação dos enxames sul-americanos. A maioria das colônias estudadas apresentou os padrões A1 e A4, sendo que a freqüência de A1 aumenta em direção ao norte do Brasil, da mesma forma que o observado em outros países sul-americanos. A origem mais provável dos padrões africanos A1 e A4 seria a introdução de *Apis mellifera scutellata* no Brasil em 1956, embora a distribuição de A1, cuja freqüência aumenta em direção ao norte, evidencia a importância da utilização de marcadores mitocondriais mais polimórficos para melhor esclarecer a estrutura genética das populações de abelhas africanizadas.

5.2. Introdução

A partir de 1957 teve início no continente americano o processo de hibridização entre as abelhas africanas recém introduzidas e as européias residentes desde o século XIX. Este processo, conhecido como Africanização, estimulou uma série de investigações destinadas a caracterizar a origem européia ou africana das abelhas, assim como as mudanças na composição genética das populações residentes e introduzidas (Schneider *et al.*, 2004).

Evidências morfométricas e alozímicas sugerem a contribuição de alelos europeus e africanos na composição das populações de abelhas Africanizadas das Américas. De acordo com Lobo *et al.* (1989) e Del Lama *et al.* (1990), de 20 a 30% dos genes das populações africanizadas do Brasil, Uruguai e América Central têm origem européia. Por outro lado, 97% das colônias do Brasil, Venezuela, Honduras e México analisadas por Smith *et al.* (1989) apresentaram mtDNA característico de *Apis mellifera scutellata*.

O DNA mitocondrial africano presente nas populações neotropicais poderia incluir os padrões *iberiensis/intermissa* introduzidos por colonizadores espanhóis e portugueses (Hall e Smith, 1991). Porém, com base nos resultados de 16S-*Eco*RI, COI-*HincII* e COI-COII-*XbaI*, estes autores consideraram improvável que uma colônia identificada como padrão africano tivesse origem diferente de *scutellata*. Da mesma forma, dados obtidos com *citb-BglII* também têm demonstrado que os enxames Africanizados são compostos pelo padrão *scutellata* (Hall e Muralidharan, 1989).

O fato dos marcadores nucleares demonstrarem a presença de genes europeus nas populações Africanizadas poderia indicar a existência de assimetria com os marcadores citoplasmáticos, uma vez que as análises mitocondriais têm revelado a presença quase exclusiva do padrão *scutellata*.

Dentre os marcadores mitocondriais, os fragmentos gerados pela enzima de restrição *Dra* I na região COI-COII têm permitido a distinção de padrões característicos das linhagens A, M, C e O de *Apis mellifera* em várias regiões (De

la Rúa *et al.*, 1998, Franck *et al.*, 1998, Franck *et al.*, 2001). Analisando a região COI-COII de colônias provenientes da Argentina, Sheppard *et al.* (1999) sugeriram que o mtDNA tido como africano possui origem *intermissa*, baseados na observação do padrão A1. Este fato demonstraria que as colônias Africanizadas possuem uma herança mitocondrial mais diversa em relação à introdução de *Apis mellifera scutellata* no Brasil em 1956.

Dessa forma, são apresentados neste trabalho os resultados obtidos por meio dos polimorfismos gerados com a região tRNA^{leu}-COII de amostras provenientes do Brasil e Uruguai. Tais resultados confirmam a existência de assimetria entre os dados obtidos a partir de marcadores nucleares e mitocondriais, além de contribuir para a compreensão da estrutura genética das populações africanizadas das Américas. Amostras provenientes de colônias da Espanha e Itália também foram incluídas nas análises como controle.

5.3. Material e Métodos

5.3.1. Amostras e Extração de DNA

Foram analisadas populações de *Apis mellifera* do Brasil, Itália, Espanha e Uruguai. A origem das colônias em cada país está descrita na tabela I. As amostras do Brasil representam um total de 508 colônias, as quais provêm de 31 localidades. Da Itália, foram analisadas 36 colônias da região de Milão. As quatro colônias da Espanha foram coletadas na região da Galícia e as 50 uruguaias são provenientes de seis diferentes localidades daquele país. Foi utilizada uma operária adulta por colônia amostrada, sendo as abelhas conservadas a -20° C até serem analisadas. O DNA total foi extraído do tórax de cada indivíduo de acordo com o método fenol-clorofórmio descrito por Sheppard e McPheron (1991).

5.3.2. Amplificação por PCR e Digestão com Endonuclease

A análise mitocondrial foi realizada por meio da amplificação por PCR da região intergênica tRNA^{leu}-COII, de acordo com Garnery *et al.* (1992). Uma alíquota do produto de PCR foi utilizada na análise eletroforética em géis de poliacrilamida 6% corados com prata. Dois μ l do DNA amplificado foi utilizado na reação de digestão com *Dra* I (Promega) e os fragmentos resultantes foram visualizados em géis de poliacrilamida 12%. Os mitótipos foram determinados de acordo com os padrões descritos por Garnery *et al.* (1993).

5.3.3. Clonagem e Seqüenciamento do DNA

Fragmentos de PCR da região intergênica tRNA^{leu}-COII, representando os padrões de restrição obtidos, foram clonados utilizando o kit de clonagem T-Easy (Promega) e utilizados para transformar células competentes DH-5 α de *E. coli*. Os clones positivos foram selecionados e os vetores recombinantes recuperados e

seqüenciados de acordo com protocolos sugeridos pela Applied Biosystem (www.appliedbiosystems.com). O seqüenciador automático ABI-3100 (Applied Biosystems) foi utilizado para seqüenciar as amostras. Dois clones de cada padrão foram seqüenciados a partir de ambas as direções. Os dados de seqüência foram analisados por alinhamento múltiplo com o auxílio do programa Multalin (www.toulouse.inra.fr/multalin).

5.4. Resultados

Dentre as 598 colônias do Brasil, Itália, Espanha e Uruguai, 11 mitótipos diferentes foram observados para a região intergênica tRNA^{leu}-COII, dos quais oito já descritos (Garnery *et al.*, 1993; Franck *et al.*, 2001) e três não relatados em análises prévias, denominados A28, A29 e A30, seguindo a seqüência dos padrões já relatados (Figura 1 e Tabela I). Os mapas de restrição com o comprimento dos fragmentos estão indicados na figura 2.

Os mitótipos observados foram classificados por meio das seqüências P (P₀, P₁ ou P) e pelo número de seqüências Q (Figura 3). De acordo com as seqüências P e Q apresentadas por Franck *et al.* (2001) e Franck *et al.* (2000) respectivamente, nossos padrões seqüenciados foram caracterizados como pertencendo às linhagens A (seis dos sete mitótipos) e M (um mitótipo observado). Três dos mitótipos da linhagem A não foram descritos em análises prévias. Estes novos padrões possuem três (A28 e A29) e duas (A30) seqüências Q, com distintos padrões de restrição. O padrão A28 apresenta a seqüência P₀, que não possui deleção, sendo característico da maioria dos mitótipos da linhagem A. A seqüência P₁ foi observada nos padrões A29 e A30. Esta seqüência, com uma deleção de 15 pb, caracteriza os mitótipos da linhagem A originários da costa africana do Atlântico e da Península Ibérica (Franck *et al.*, 2001).

A figura 4 apresenta a distribuição dos mitótipos tRNA^{leu}-COII por país. Os principais padrões observados no Brasil são os africanos A4 (68%) e A1 (25%). A proporção dos mitótipos A4 é maior nas populações do centro e sul do Brasil (sendo também o mais observado nas populações uruguaias), enquanto a freqüência de A1 aumenta em direção ao norte. Nota-se que o mitótipo C1, característico de *A. m. ligustica*, está presente em algumas populações do sul. Nossos resultados não corroboram a afirmação de que, na América do Sul, o mtDNA europeu que persiste é predominantemente de origem *mellifera* e não *ligustica* (Schneider *et al.*, 2004), uma vez que não foram observados padrões

pertencentes à subespécie *mellifera* nas colônias brasileiras e apenas uma amostra uruguaia apresentou o padrão M4.

Três populações do Brasil e uma do Uruguai apresentaram um padrão que, de acordo com os sítios de restrição e suas seqüências P (Figura 2), foram classificados como A26, característico da subespécie *A. m. adansonii* do sudoeste africano.

Amostras da Galicia (Espanha) apresentaram os mitótipos M6 (característico de populações francesas da subespécie *mellifera* e descrito apenas em amostras do sul da Espanha (Franck *et al.*, 1998, 2001)), M7 (o mais comum nas populações espanholas) e A28, que corrobora dados prévios da literatura que relatam vários mitótipos da linhagem A em populações ibéricas (Garnery *et al.*, 1993; Franck *et al.*, 1998, 2001).

Populações do norte da Itália contêm principalmente C1, mas também foram detectados os padrões M3 e M7. O padrão M7 foi também relatado em altas proporções (12-91%) nas populações italianas analisadas por Franck *et al.* (2000), demonstrando a presença das duas linhagens altamente divergentes (*mellifera* e *ligustica*) na Itália. Uma única colônia com o padrão africano A4 foi observada na Itália, corroborando os resultados obtidos anteriormente com a região 16S (Collet *et al.*, submetido). O haplótipo A4, descrito somente em populações da Sicília (Franck *et al.*, 2000, 2001), ainda não havia sido observado em amostras da Itália continental.

Tabela I. Distribuição das populações de *Apis mellifera* do Brasil, Uruguai, Espanha e Itália com o número de haplótipos mitocondriais observados.

País	Localidade												
		A1	A29	A4	A30	A26	C1	A28	M4	M3	M6	M7	
Brasil	Aldeia Contão	5		3									
	Alegrete	1		7									
	Aracaju	5		4									
	Araripina	6		15	3								
	Belém			20									
	Blumenau	1		19	1		1						
	Boa Vista	7		6									
	Bom Jardim	6		8			1						
	Buquim	3		8									
	Conde	1		4									
	Corumbá	7		10									
	Cuiabá	7		12			1						
	Curitiba	2		10									
	Florianópolis	1		17			2						
	Lagoa Vermelha	2		19									
	Luís Antônio	4		42									
	Manaus	3		1									
	Maringá			24			1						
	Miranda	16		10									
	Mossoró	7		11		2							
	Picos	11	1	6									
	P. do Araguaia	5		12	5								
	Recife	5		10									
	Salvador	3		3									
	Santa Maria	4		5	1								
	S. do Livramento			8									
	São Joaquim	1		22		2		2					
São Luís	3	1	9	4	1								
Tucano	9		7	2									
Viçosa	5	1	14										
	Total	130	3	346	16	5	6	2					
Uruguai	Durazno	1		3	4	1							
	Mello	2		12									
	Montevideo			4					1				
	Ombúes de Lavelle			2	1		3						
	Paysandu	1		3			1						
	Rocha		1	10									
	Total	4	1	34	5	1	4		1				
Itália	Meda						14			3		5	
	Pozzone						7			1		5	
	Convento			1									
Espanha	Galícia						1			1	2		

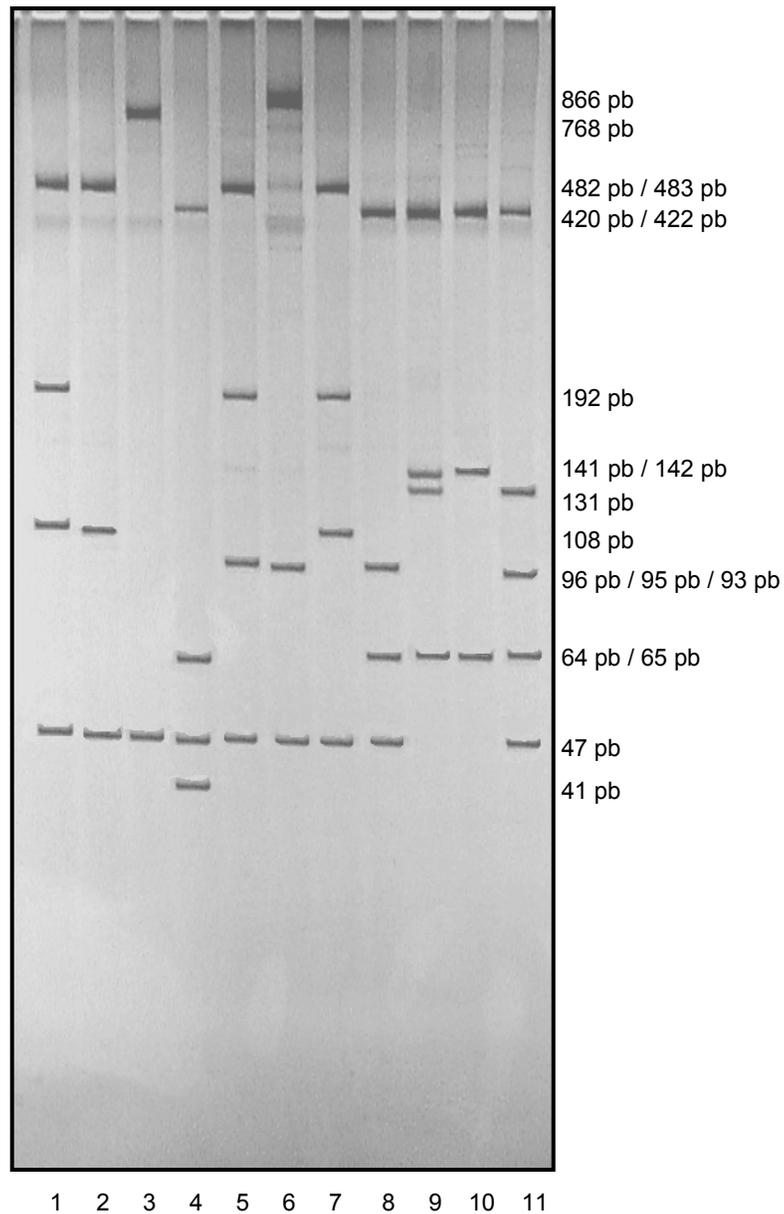


Figura 1. Padrões de restrição para a região tRNA^{leu}-COII (*Dra* I) do DNA mitocondrial de *Apis mellifera* em amostras do Brasil e Uruguai, revelados em gel de poliacrilamida 12% corado com prata. Os padrões estão apresentados na seguinte ordem de numeração: 1: **A4**, 2: **A1**, 3: **A30**, 4: **C1**, 5: **A26**, 6: **A29**, 7: **A28**, 8: **M3**, 9: **M4**, 10: **M6** e 11: **M7**.

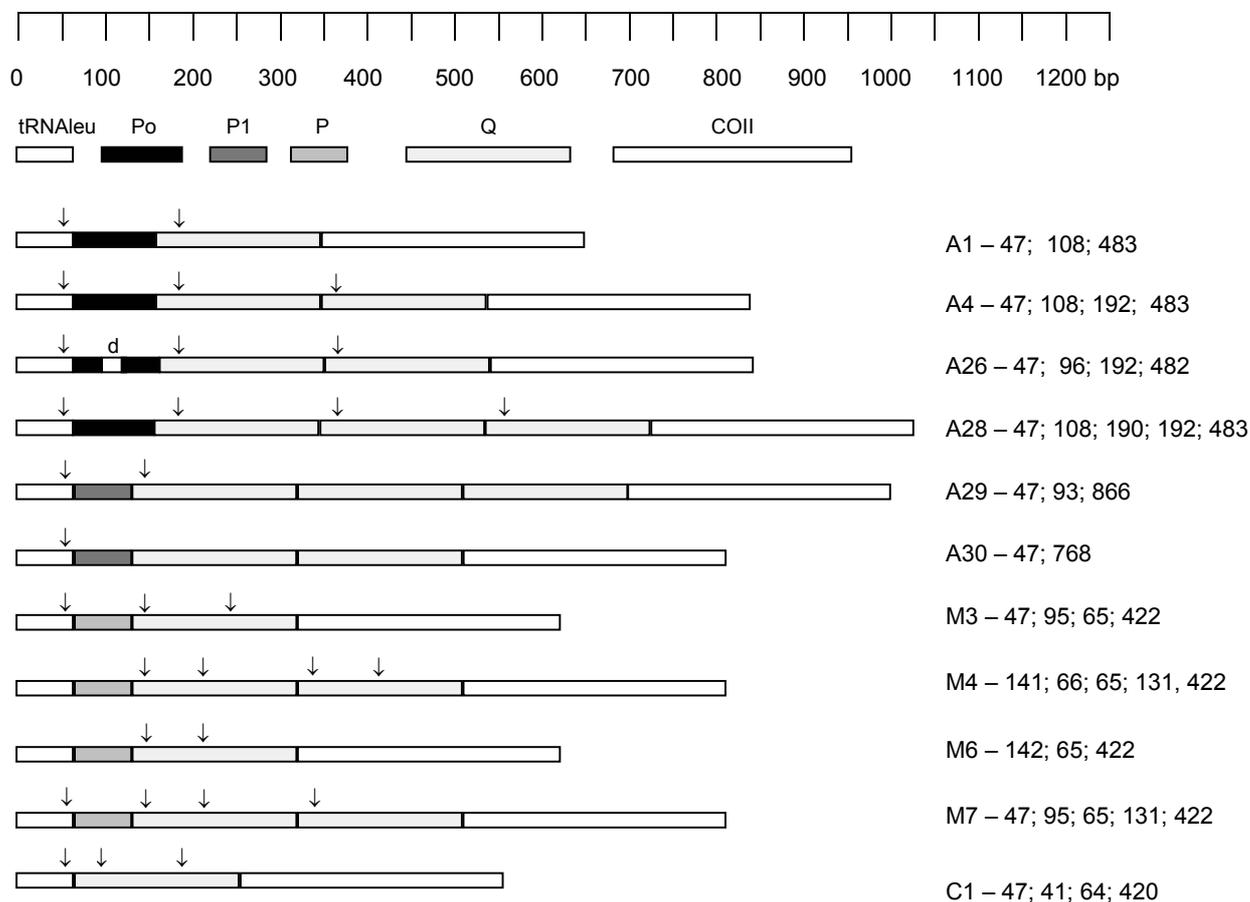


Figura 2. Mapas de restrição (esquerda) e comprimento dos fragmentos em pares de base (direita). Os padrões A1, A4, M3, M4, M6, M7 e C1 estão de acordo com Garnery *et al.* (1993) e A26 de acordo com Franck *et al.* (2001). A28, A29 e A30 são os novos padrões A descritos neste trabalho. Os sítios de restrição estão indicados por setas e a letra d indica deleção na seqüência P₀.

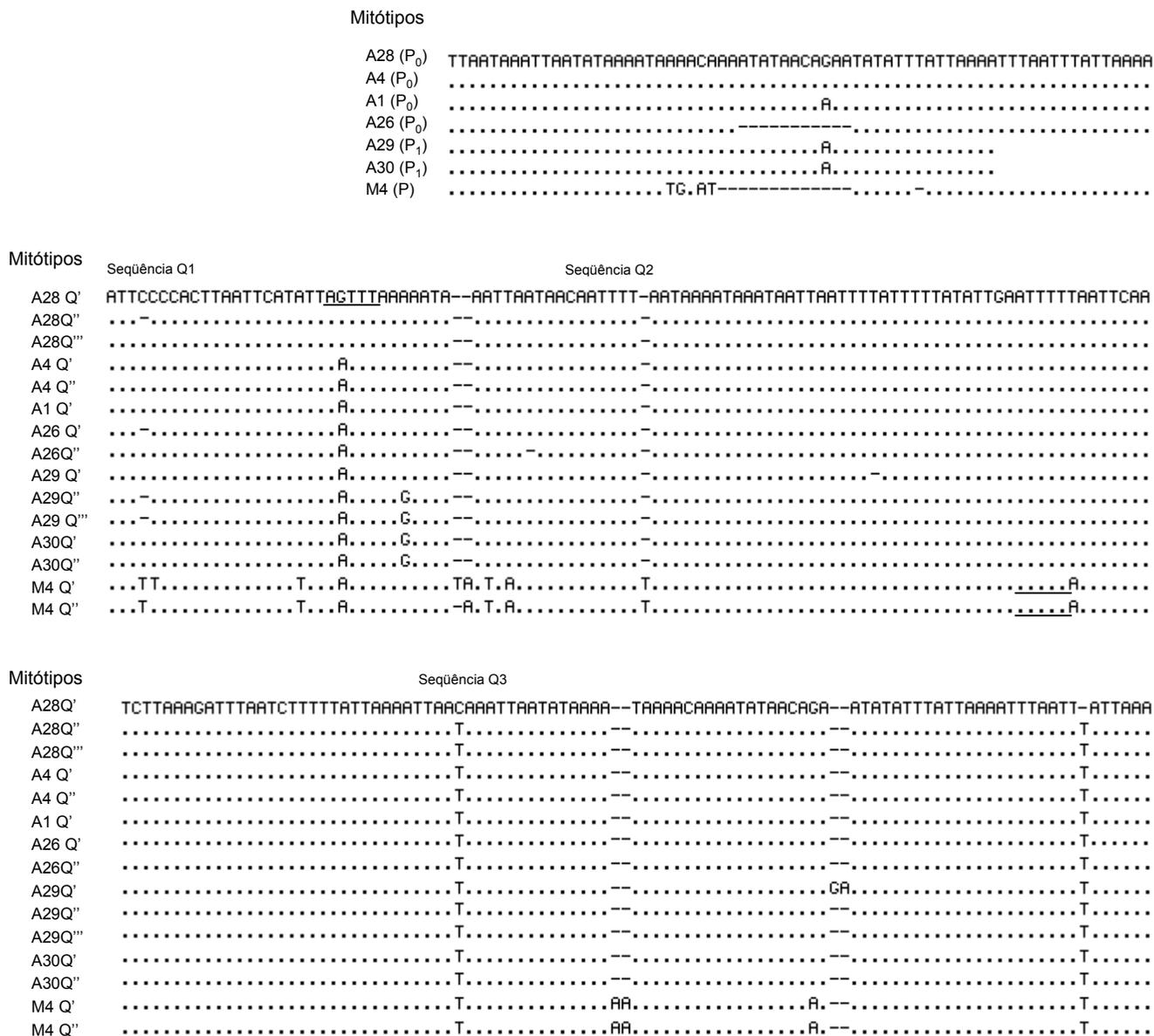
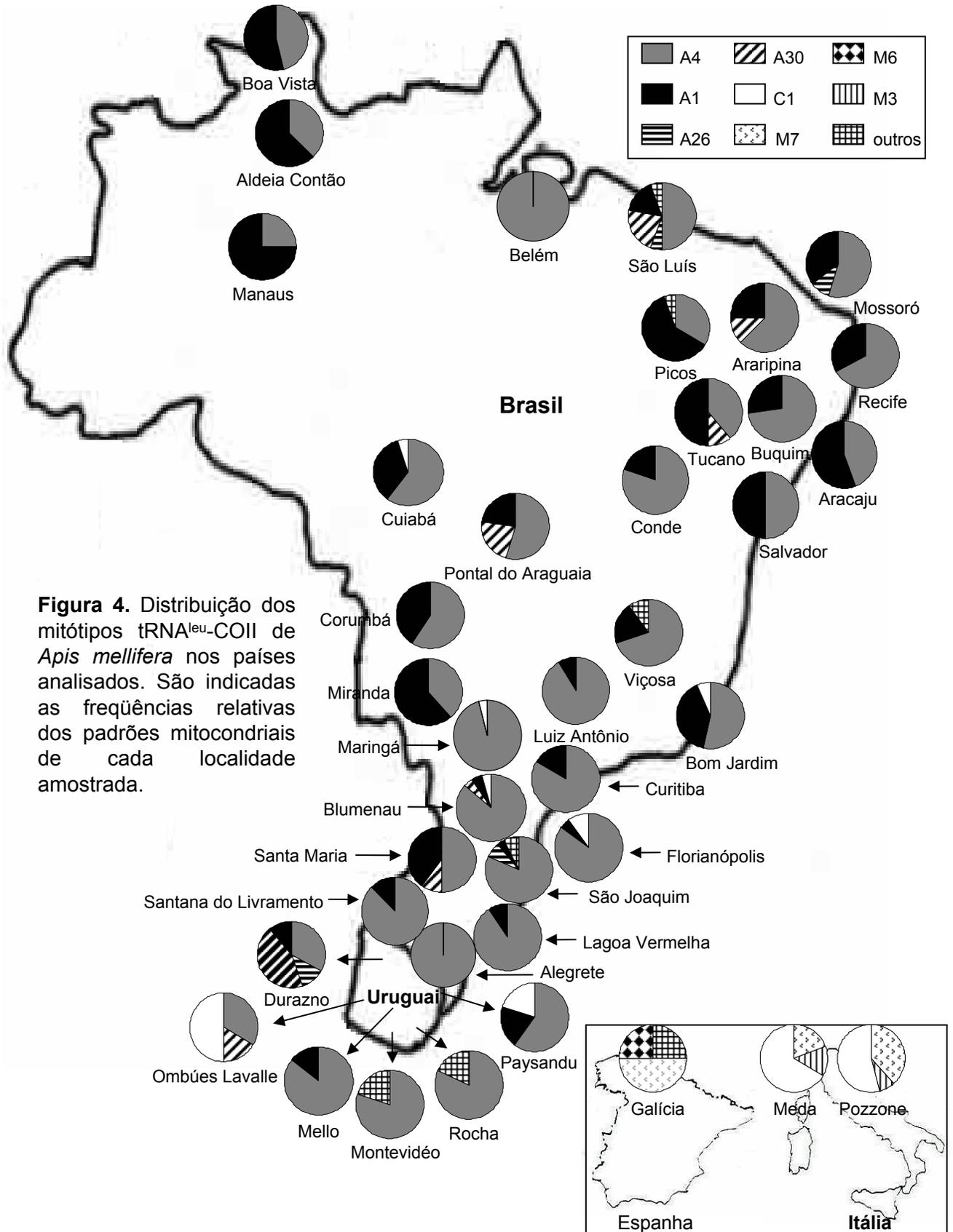


Figura 3. Seqüências P (P₀, P ou P₁) e Q (apresentadas como Q', Q'' e Q''') de acordo com as duplicações adicionais da seqüência Q) da região tRNA^{leu}-COII. Inserções/deleções estão indicadas por traços e os sítios de restrição *Dra* I estão sublinhados. Os pontos indicam identidade nucleotídica.



Três populações do Brasil e uma do Uruguai apresentaram um padrão que, de acordo com os sítios de restrição e suas seqüências P (Figura 2), foram classificados como A26, característico da subespécie *A. m. adansonii* do sudoeste africano.

Amostras da Galicia (Espanha) apresentaram os mitótipos M6 (característico de populações francesas da subespécie *mellifera* e descrito apenas em amostras do sul da Espanha (Franck *et al.*, 1998, 2001)), M7 (o mais comum nas populações espanholas) e A28, que corrobora dados prévios da literatura que relatam vários mitótipos da linhagem A em populações ibéricas (Garnery *et al.*, 1993; Franck *et al.*, 1998, 2001).

Populações do norte da Itália contêm principalmente C1, mas também foram detectados os padrões M3 e M7. O padrão M7 foi também relatado em altas proporções (12-91%) nas populações italianas analisadas por Franck *et al.* (2000), demonstrando a presença das duas linhagens altamente divergentes (*mellifera* e *ligustica*) na Itália. Uma única colônia com o padrão africano A4 foi observada na Itália, corroborando os resultados obtidos anteriormente com a região 16S (Collet *et al.*, submetido). O haplótipo A4, descrito somente em populações da Sicília (Franck *et al.*, 2000, 2001), ainda não havia sido observado em amostras da Itália continental.

5.5. Discussão

O mitótipo A1 apresentou uma freqüência crescente em relação ao padrão A4 nas amostras brasileiras localizadas ao norte e nordeste do país. Nas populações africanizadas da Colômbia (Prada, 2004), Venezuela (Clarke *et al.*, 2001), Costa Rica (Segura, 2000) e México (Franck *et al.*, 2001) também foi observado o predomínio de A1 e A4, sendo A1 mais freqüente em todos os países, exceto na Venezuela onde ocorre um pequeno predomínio de A4. O incremento na freqüência do padrão A1 do Brasil em direção ao norte da América do Sul e Central, inclusive México, pode ter repetido na América o fenômeno que ocorreu no continente africano. De acordo com Franck *et al.* (2001) e Moritz *et al.* (1994), o mitótipo A4 está estabelecido principalmente nas populações da África do Sul enquanto A1 apresentou um progressivo aumento de freqüência em direção ao norte da África. Considerando o transecto Brasil – México e o continente africano em relação à latitude, observa-se uma possível seleção para o padrão A4 nas regiões localizadas mais ao sul de ambos os continentes, o mesmo ocorrendo para A1 em direção ao norte.

Para países com colonização predominantemente espanhola, como México, Venezuela e Costa Rica, uma pequena proporção das colônias com mitótipos A deve ser descendente de populações do oeste europeu, uma vez que tais padrões já eram observados, mesmo que em baixas freqüências (Clarke *et al.*, 2001), antes da chegada dos enxames africanizados. Além disso, pequenas proporções de padrões M (comuns na Espanha) ainda são observados em alguns países, como Costa Rica (Segura, 2000) e México (Franck *et al.*, 2001; Clarke *et al.*, 2001). Porém, a maioria das colônias com padrão A tem origem nas abelhas africanas introduzidas no Brasil na década de 50, devido ao grande aumento na freqüência dos mitótipos A depois do processo de Africanização.

A origem dos padrões A observados nas colônias brasileiras seria semelhante àquela descrita para os demais países americanos, exceto pelo fato de que o Brasil teve uma colonização essencialmente portuguesa, um dos fatores

que explicaria a ausência de mitótipos M nas abelhas do Brasil, uma vez que estudos realizados em Portugal relatam uma presença reduzida desse padrão em relação à Espanha (Franck *et al.*, 1998, 2001; Clarke *et al.*, 2001). O fato de ainda serem observados outros padrões característicos da Península Ibérica (A29 e A30), mesmo que em baixas frequências, sugere vestígios de uma introdução Ibérica de padrões A durante a colonização do país.

Diniz *et al.* (2003) observaram que algumas colônias africanizadas do Uruguai exibiam um novo padrão europeu cuja origem seria Portugal. Estas mesmas colônias foram aquelas que em nossos resultados apresentaram os padrões A29 e A30, que possuem a seqüência P₁, descrita por Franck *et al.* (2001) em várias colônias portuguesas. No Brasil, este padrão “Português” também foi encontrado em algumas regiões (Del Lama MA, dados não publicados). Os relatos acima corroboram a indicação de que houve introduções ibéricas do padrão A na América.

No entanto, da mesma forma que para os outros países americanos já mencionados, os resultados obtidos com a região tRNA^{leu}-COII indicam que a maior contribuição para a formação das populações africanizadas do Brasil se deve à introdução de *Apis mellifera scutellata* ocorrida em 1956.

O padrão A1 observado nas populações americanas é comum tanto na subespécie *scutellata* do sul da África, quanto em *intermissa* do norte africano e Península Ibérica. Portanto, sua presença na América poderia ter origem nas introduções realizadas via Península Ibérica e não somente pela introdução de *scutellata* em 1956. A provável origem sul-africana desse haplótipo é sustentada pelas evidências já discutidas neste trabalho, como os poucos padrões A existentes no continente antes da expansão dos enxames africanizados, o grande incremento desses padrões após o processo de africanização, além dos poucos padrões ibéricos e suas frequências bastante reduzidas, a despeito da colonização portuguesa no Brasil. Por outro lado, o padrão A1 das colônias americanas não teria origem africana (via *scutellata*) se tal mitótipo apresentado pelas colônias localizadas mais ao sul do continente fosse distinto do que se

estabeleceu nas populações situadas em direção ao norte, até o México. Ou seja, A1 poderia ter origem distinta de *scutellata* caso fosse evidenciado, por meio de um novo marcador capaz de maior discriminação entre os padrões, que existe um maior número de haplótipos, dos quais alguns deles estariam relacionados com os observados na Península Ibérica.

Prada (2004) observou que na Colômbia, embora os resultados obtidos por *Dra* I (tRNA^{leu}-COII) indicassem A1 e A4 como os padrões mais frequentes nas colônias daquele país, as endonucleases *Bcl* II e *Taq* I para a região COI demonstraram 25 haplótipos diferentes nas populações africanizadas. A utilização deste ou de um outro marcador mitocondrial pode contribuir para testar a hipótese acima a respeito da origem diversa (sul da África ou Península Ibérica) do padrão A1 nas populações africanizadas.

Com relação aos resultados obtidos por Sheppard *et al.* (1999) na Argentina, a presença do padrão A1 nesse país pode ser resultante da chegada dos enxames africanizados, com origem em *A. m. scutellata* (uma vez que A1 é frequentemente encontrado nessa subespécie), embora estes autores sugiram as introduções ibéricas da subespécie intermissa como provável origem da presença deste padrão. Da mesma forma que o observado para as colônias brasileiras e uruguaias, a origem européia x africana de A1 na Argentina seria verificada com a utilização de um marcador com maior número de haplótipos que diferenciasse as subespécies, já que os obtidos com a região tRNA^{leu}-COII são característicos mas não exclusivos das subespécies que os contêm.

Embora tenham ocorrido introduções de *A. m. mellifera* no Brasil, realizadas por imigrantes alemães durante o século XIX, nenhuma colônia apresentou mitótipo M nas populações brasileiras africanizadas. Além disso, dentre as 50 colônias analisadas no Uruguai, somente uma apresentou o mitótipo M4. Padrões característicos da subespécie *mellifera* também não foram constatados em amostras da Colômbia (Prada, 2004) e da Venezuela (Clarke *et al.*, 2001), embora estes países, assim como o Uruguai, tenham tido colonização predominantemente espanhola.

A ausência de padrões *mellifera* em regiões onde se estabeleceram os enxames Africanizados evidencia a substituição dos genes europeus pelos africanos, provavelmente favorecida por fatores como o rápido crescimento das colônias africanas quando comparadas com as européias, além do comportamento reprodutivo da abelha africana que invade colônias européias, substituindo as rainhas residentes (Schneider *et al.*, 2004) ou ainda a vantagem seletiva das abelhas africanas tanto na superior habilidade em colonizar quanto de sobreviver em ambientes neotropicais (Rinderer, 1988). No Chile, por exemplo, onde os enxames africanizados ainda não se estabeleceram devido ao isolamento geográfico proporcionado pelos Andes, Souza (2002) descreve que *A. m. mellifera* compõe cerca de 41,5% do DNA mitocondrial das colônias daquele país, sendo o restante constituído por *A. m. ligustica*.

Os resultados obtidos com a região tRNA^{leu}-COII indicam a presença de uma única colônia *mellifera* no Uruguai e sua inexistência no Brasil, além do reduzido número de colônias com padrão *ligustica* nestes países (menos de 2% das 558 analisadas), de forma que cerca de 92% das colônias possuem mtDNA característico de *A. m. scutellata*. Marcadores nucleares apontam uma significativa contribuição de genes europeus nas populações africanizadas das Américas, tanto por meio de alozimas (Lobo *et al.*, 1989; Del Lama *et al.*, 1990) quanto por polimorfismos do DNA nuclear (Suazo *et al.*, 1998; Hall e McMichael, 2001). Portanto, a assimetria existente entre os dados obtidos a partir de marcadores nucleares e citoplasmáticos é confirmada pelos nossos resultados. De acordo com Hall e McMichael (2001), após a hibridização das abelhas africanas com as européias residentes, uma subsequente seleção poderia eliminar a maioria dos genes europeus, mas conservaria os que fossem neutros, como no caso de alguns marcadores nucleares que permanecem sob certa freqüência na população. Quanto aos marcadores mitocondriais, é possível que estes não sejam seletivamente neutros, de forma que mitótipos africanos sejam favorecidos nos ambientes tropicais em relação aos europeus.

Contudo, a distribuição do padrão A1 abre novas perspectivas na utilização de regiões mitocondriais mais polimórficas que, aliadas a resultados obtidos de marcadores nucleares, poderão esclarecer ainda mais a questão da assimetria, além de contribuir com maiores informações sobre a estrutura das populações de abelhas africanizadas.

5.6. Referências Bibliográficas

Clarke K.E., Oldroyd B.P., Javier J., Quezada-Euán G., Rinderer T.E. (2001) Origin of honeybees (*Apis mellifera* L.) from the Yucatan peninsula inferred from mitochondrial DNA analysis, *Mol. Ecol.* 10, 1347-1355.

De la Rúa P., Serrano J., Galián J. (1998) Mitochondrial DNA variability in the Canary Islands honeybees (*Apis mellifera* L.), *Mol. Ecol.* 7, 1543-1547.

Del Lama M.A., Lobo J.A., Soares A.E.E., Del Lama S.N. (1990) Genetic differentiation estimated by isozymic analysis of Africanized honeybee populations from Brazil and from Central America, *Apidologie* 21, 271-280.

Diniz N.M., Soares A.E.E., Sheppard W.S., Del Lama M.A. (2003) Genetic structure of honeybee populations from southern Brazil and Uruguay, *Gen. Mol. Biol.* 26, 47-52.

Franck P., Garnery L., Solignac M., Cornuet J.M. (1998) The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data, *Evolution* 52, 1119-1134.

Franck P., Garnery L., Celebrano G., Solignac M., Cornuet J.M. (2000) Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*), *Mol. Ecol.* 9, 907-921.

Franck P., Garnery L., Loiseau A., Oldroyd B.P., Hepburn H.R., Solignac M., Cornuet J.M. (2001) Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data, *Heredity* 86, 420-430.

Garnery L., Cornuet J.M., Solignac M. (1992) Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mol. Ecol.* 1, 145-154.

Garnery L., Solignac M., Celebrano G., Cornuet J.M. (1993) A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L., *Experientia* 49, 1016-1020.

Hall H.G., Muralidharan K. (1989) Evidence from mitochondrial DNA that African honeybees spread as continuous maternal lineages, *Nature* 339, 211-213.

Hall H.G., Smith D.R. (1991) Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 4548-4552.

Hall H.G., McMichael M.A. (2001) Frequencies of restriction fragment-length polymorphisms indicate that neotropical honey bee (Hymenoptera: Apidae) populations have African and West European origins, *Ecology and Population Biology* 94, 670-676.

Lobo J.A., Del Lama M.A., Mestriner M.A. (1989) Population differentiation and racial admixture in the Africanized honeybee (*Apis mellifera* L.), *Evolution* 43, 794-802.

Moritz R.F.A., Cornuet J.M., Kryger P., Garnery L., Hepburn H.R. (1994) Mitochondrial DNA variability in South African honey bees (*Apis mellifera* L.), *Apidologie* 25, 169-178.

Prada C.F.Q. (2004) Estrutura genética das populações de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) da Colômbia estimada através de marcadores nucleares e mitocondriais. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos.

Rinderer T.E. (1988) Evolutionary aspects of the Africanization of honey-bee populations in the Americas. In: *Africanized Honey Bees and Bee Mites* (eds Needham GR, Page RE, Delfinado-Baker M, Bowman CE), 13-28. Ellis Horwood, Chichester.

Schneider S.S., DeGrandi-Hoffman G., Smith D.R. (2004) The African honey bee: factors contributing to a successful biological invasion, *Annu. Rev. Entomol.* 49, 351-376.

Segura J.A.L. (2000) Highly polymorphic DNA markers in an Africanized honey bee population in Costa Rica, *Gen. Mol. Biol.* 23, 317-322.

Sheppard W.S., McPheron B.A. (1991) Ribosomal DNA diversity in Apidae, in: Smith D.R. (Ed.), *Diversity of the genus Apis*, Westview, Boulder, C.O., pp. 89-102.

Sheppard W.S., Rinderer T.E., Garnery L., Shimanuki H. (1999) Analysis of Africanized honey bee mitochondrial DNA reveals further diversity of origin, *Gen. Mol. Biol.* 22, 73-75.

Smith D.R., Taylor O.R., Brown W.M. (1989) Neotropical Africanized honey bees have African mitochondrial DNA, *Nature* 339, 213-215.

Souza R.O. (2002) Dinâmica do fluxo gênico em populações de *Apis mellifera* do Chile observada através de marcadores nucleares e mitocondriais. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos.

Suazo A., McTiernan R., Hall H.G. (1998) Differences between African and European honey bees (*Apis mellifera* L.) in random amplified polymorphic DNA (RAPD), *Journal of Heredity* 89, 32-36.

6. Considerações Finais e Perspectivas

Com base nas discussões realizadas a partir dos resultados obtidos nos dois trabalhos apresentados, é possível fazer as seguintes considerações finais:

A utilização da região 16S apresenta maior segurança na identificação das subespécies pertencentes aos ramos evolutivos A, M e C, além da rapidez e menor custo. Dessa forma, análises futuras de subespécies de *Apis mellifera* utilizadas em introduções em outros países poderão fazer uso do protocolo aqui descrito na identificação das populações resultantes.

O emprego da endonuclease *Dra* I na região tRNA^{leu}-COII foi proposto a fim de que se pudesse contribuir com maiores informações sobre a formação das populações africanizadas. Dado o número de haplótipos apresentados, este marcador se mostrou mais informativo que o utilizado até então (*Bgl* II – citb) nos estudos com *Apis mellifera* nas Américas e, dessa forma, evidencia a participação de outras subespécies, além *Apis mellifera scutellata*, na formação das populações africanizadas. Embora tenha se mostrado de fato mais informativo que *Bgl* II, o marcador proposto continua a demonstrar a presença de haplótipos de possível origem *scutellata* em cerca de 93% das colônias do Brasil e Uruguai.

No entanto, os resultados obtidos com o padrão A1 podem abrir novas perspectivas com relação aos estudos sobre o processo de africanização. Esses resultados, aliados aos dados históricos sobre a colonização do Brasil e outros países americanos, evidenciam a importância da utilização de regiões mitocondriais que possam se mostrar ainda mais informativas, capazes de identificar uma origem do haplótipo A1 a partir do norte da África – Espanha (*Apis mellifera iberica* ou *A. m. intermissa*) contra uma origem a partir da África do Sul (*Apis mellifera scutellata*).

Além dos marcadores mitocondriais, alguns locos de microsátélites apresentam considerável variação e diferenciação interpopulacional, fato que os torna ferramentas importantes nos estudos populacionais das abelhas africanizadas. Dessa forma, a utilização conjunta dos marcadores mitocondriais e nucleares poderá proporcionar valiosas informações para o completo entendimento da estrutura genética das populações de abelhas africanizadas das Américas.