

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE AMBIENTAL
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL

THAINÁ DAL POZZO DE OLIVEIRA

**ENSAIOS COM PRIMERS DE ISSR E PCR PARA ESTUDO DA
VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Tetragonisca angustula* (Latreille,
1811) (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINAE) NA REGIÃO DE
CAMPO MOURÃO - PARANÁ.**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO
2015

THAINÁ DAL POZZO DE OLIVEIRA

**ENSAIOS COM PRIMERS DE ISSR E PCR PARA ESTUDO DA
VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Tetragonisca angustula* (Latreille,
1811) (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINAE) NA REGIÃO DE
CAMPO MOURÃO - PARANÁ.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2 (TCC2), do curso de engenharia ambiental, do Departamento Acadêmico de Ambiental (DAAMB), do Câmpus Campo Mourão, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Agenor Alves Bueno

CAMPO MOURÃO

2015



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Campo Mourão
Diretoria de Graduação e Educação Profissional
Departamento Acadêmico de Ambiental - DAAMB
Curso de Engenharia Ambiental



TERMO DE APROVAÇÃO

ENSAIOS COM PRIMERS DE ISSR E PCR PARA ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINAE) NA REGIÃO DE CAMPO MOURÃO - PARANÁ.

por

THAINÁ DAL POZZO DE OLIVEIRA

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 02 de Fevereiro de 2016 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof. Dr. Paulo Agenor Alves Bueno

Prof. Dr. Marcelo Galeazzi Caxambu

Prof^a. Dr^a. Raquel de Oliveira Bueno

Dedico este trabalho a minha mãe, Eliete A. Dal Pozzo de Oliveira e ao meu pai Luiz Antonio de Oliveira, pela incansável doação, e por sempre permanecerem ao meu lado, me dando forças para enfrentar os obstáculos e acreditar que coisas boas estão sempre por vir.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por tantas graças concedidas durante toda minha vida, por me capacitar a cada desafio, e principalmente por me permitir conviver com tantas pessoas especiais.

Aos meus pais Eliete A. Dal Pozzo de Oliveira e Luiz A. de Oliveira por irem muito além de seus papéis. Agradeço pelo investimento na educação, pelo exemplo de família e moral, pelos valores transmitidos, pelas horas e amor dedicados, por acreditarem em meu potencial, e por compartilharem o mesmo sonho, abdicando de muitas coisas em prol do meu futuro.

Agradeço de forma muito especial ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Agenor Alves Bueno. Obrigada pela confiança, amizade, aprendizado, e por me dar asas para ir além do que poderia imaginar. A orientação tornou-se uma escola com seus conselhos, os quais irão sempre me acompanhar. Despertou em mim o interesse pelo novo e a persistência, e sempre será referência de um excelente pesquisador e professor.

Aos membros da Banca Prof. Dra. Raquel de Oliveira Bueno e Prof. Dr. Marcelo Galeazzi Caxambu, por aceitarem participar da mesma e pelas correções, sugestões e contribuições importantíssimas ao trabalho. Expresso aqui minha grande admiração pelos grandes profissionais que são.

A toda minha família, especialmente minha avó materna Eulalia Parazzi Dal Pozzo, por todos os cuidados e dedicação. Agradeço grandemente pelas orações e por todo o carinho, sempre me confortando com suas palavras de amor e fé.

Sou muito grata também a todos os amigos do laboratório C101, que me auxiliaram no que era preciso, e com a companhia tornaram o trabalho mais prazeroso. Cada um que passou pelo anexo contribuiu para meu crescimento e em especial Carol, Mariana e Rafael, pela amizade, empenho e interesse nas técnicas realizadas. Ivens e professora Elizabete, agradeço por me acompanharem na coleta das abelhas nos ninhos presentes na UTFPR. Sou grata também a Débora, pelos conselhos e correções textuais.

A fundação Araucária pela bolsa de iniciação científica concedida.

A coordenadora do curso de Engenharia Ambiental Prof^a. Dr^a. Cristiane Kreutz pelo apoio, atenção e disponibilidade.

A todos os professores da coordenação de Engenharia ambiental, obrigada pela transmissão de conhecimentos, dedicação, e por contribuir para uma educação de qualidade, levando aos alunos senso crítico e capacitação profissional.

A todos os amigos da graduação, muito obrigada pela partilha de conhecimentos e experiências. A convivência com pessoas tão diferentes enriqueceu esses cinco anos. Agradeço minhas amigas do *campus* de Francisco Beltrão Bruna, Mariana, e Marina, por todos momentos que passamos juntas, pela força, apoio e segurança que me passaram, sendo um ombro familiar enquanto estava longe de casa. Agradeço aos amigos Yara e Junior pela pronta disposição a ajudar e por sanar minhas dúvidas quanto às normas e estruturação do trabalho.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para a execução desse trabalho e que passaram pela minha vida, deixando um pouco de si!

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”.
(Theodore Roosevelt)

RESUMO

OLIVEIRA, Thainá Dal Pozzo de. **Ensaio com primers de ISSR e PCR para estudo da Variabilidade Genética de *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) na região de Campo Mourão – Paraná.** 2015. (50f) Trabalho de Conclusão de Curso. Bacharelado em Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2015.

As abelhas pertencentes à tribo *Meliponini* ocupam as regiões tropicais e subtropicais do planeta, abrangendo cerca de 60 gêneros. Seu importante papel é o serviço de polinização, sendo consideradas a peça chave na manutenção de ecossistemas. *Tetragonisca angustula* é um meliponíneo que distribui-se em praticamente toda a América Latina, adapta-se bem a diferentes substratos para nidificação, aceita manejo pelo homem e produz mel de sabor muito apreciado. Visto a importância desses organismos, os mesmos devem ser conservados, a fim de evitar a endogamia e possível extinção, permitindo com que mantenham assim o maior potencial evolutivo possível. Para tal, a genética torna-se uma aliada, a fim de determinar o grau de diferenciação genética entre eles. O presente estudo teve como objetivo a análise dessa variabilidade em *Tetragonisca angustula* por meio de marcadores moleculares ISSR. As abelhas foram coletadas nos municípios paranaenses de Iretama e Campo Mourão. Foi analisada uma operária por colônia, em 12 diferentes colônias. Após as coletas, as amostras foram posteriormente submetidas às etapas laboratoriais de Extração de DNA, PCR e eletroforese em gel de agarose. Após estes procedimentos, não foram evidenciadas bandas de DNA migradas no gel de agarose. Portanto, devido a este resultado, 11 diferentes primers ISSR foram testados a fim de encontrar sequências e temperaturas ideais de anelamento para a reação de amplificação do mesmo, e assim visualizar as bandas de DNA, para posteriormente analisar o grau de diferenciação genética desses indivíduos. Para tanto, nenhum dos primers testados responderam de forma esperada, ainda não sendo visualizados quaisquer fragmentos de material genético. Assim, pode-se inferir sobre a não funcionalidade dos primers ISSR utilizados neste trabalho para a espécie em questão e para as temperaturas adotadas para a reação de PCR. Nesse sentido, este trabalho foi adaptado para seleção e otimização das técnicas metodológicas adotadas para o estudo do grau de diferenciação genética dos indivíduos citados, mantendo o foco da importância do estudo genético em populações naturais como bioindicadores de fragmentação florestal.

Palavras-chave: Extração de DNA; Marcador ISSR; Variabilidade Genética

ABSTRACT

OLIVEIRA, Thainá Dal Pozzo de. **Trials with primers of ISSR and PCR to study the genetic Variability of *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) in the region Campo Mourão – Paraná.** 2015. (50f) Trabalho de Conclusão de Curso. Bacharelado em Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2015.

The bees belonging to *Meliponini* tribe live in tropical and sub-tropical areas in the planet, covering an average of 60 genders. Its importance role is pollination, regarding the key piece of ecosystem maintenance. *Tetragonisca angustula* is a Meliponini that spread in almost all Latin America, adjusts well to different substrates to nests, accepts been handled by man and produces pleasant sweet taste honey. Due to its importance, they must be conserved, in order to avoid inbreeding and a possible extinction, make it possible keep up with the biggest evolutionary potential. For such, genetic becomes allied with, in order to determine the differential degree of gene between them. This way, the present study aimed to analyze this variability in *Tetragonisca angustula* throughout molecular marker ISSR. The bees were collected in Iretama and Campo Mourão cities. Its was analyzed a worker bee by colony, in 12 different colonies. After collecting, the samples were put through laboratoty procedures of DNA extraction, PCR and agarose gel electrophoresis, next, there was no evidence DNA band migrate through agarose gel. Therefore, due to this result, 11 different primers ISSR were tested in order to find out ideal sequence and temperature of annealing to its reaction and amplification, and then see the DNA band, after that analyze differential degree of gene of them. To this end, no primers tested replied to what was expected, so it could not be seen any fragment of genetic material. This way, we can infer that ISSR primers functionality used in this work was not successful to the species and to temperatures related to PCR reaction. In this sense, this work was adapted to selection and optimization of methodology techniques adopted to the study of the differential degree of gene cited, keeping up the focus on importance of genetic study in natural population as bioindicators of forest fragmentation.

Key-words: DNA Extraction; ISSR Marker; Genetic Variability

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 OS MELIPONÍNEOS	12
3.2 <i>Tetragonisca angustula</i> (Latreille, 1811) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) ..	13
3.3 FRAGMENTAÇÃO DE HABITATS X VARIABILIDADE GENÉTICA de <i>Tetragonisca angustula</i> (Latreille, 1811)	14
3.4 MARCADOR <i>INTER SIMPLE SEQUENCE REPEAT</i> (ISSR) PARA ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	20
4.2 COLETA DE <i>Tetragonisca angustula</i> (Latreille, 1811)	23
4.3 TÉCNICAS LABORATORIAIS	23
4.3.1 Extração de DNA Genômico	24
4.3.2 Quantificação das amostras	25
4.3.3 Reação em Cadeia Polimerase (PCR)	26
4.3.4 Eletroforese em gel de agarose	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37
ANEXO – PROTOCOLOS DE PCR ADAPTADOS DE NOGUEIRA (2009) QUE FORAM TESTADOS NO PRESENTE TRABALHO	46

1 INTRODUÇÃO

Os meliponíneos, popularmente conhecidos como abelhas sem ferrão, assumem um papel importante nos ecossistemas por meio da polinização (MORGADO et al., 2002). O serviço ecossistêmico dos indivíduos desse grupo é fundamental para o bom desenvolvimento da agricultura, com abrangência global. Devido sua intolerância à perturbações, os meliponíneos podem atuar como indicadores da qualidade de habitats (BROWN e ALBRECHT, 2001). Há evidências de que esses organismos estejam em declínio, como consequência da degradação ambiental (BIESMEIJER et al., 2006).

Apesar do eficiente serviço ecossistêmico desse grupo, Nogueira-Neto (2002) aponta o comprometimento dessas populações por meio de atividades antrópicas, tornando-as mais vulneráveis à fatores externos. Dentre essas atividades, as alterações resultantes da fragmentação de áreas por meio do avanço da agricultura, contribuem para o isolamento de subpopulações, levando-as à endogamia devido à baixa variabilidade genética.

Dentre os meliponíneos, a espécie *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811), popularmente conhecida como Jataí, possui ampla distribuição geográfica, grande capacidade de transporte de pólen, aceita manejo pelo homem, e adapta-se às colmeias racionais (FEIDEN, 1994). Essas características notáveis justificam sua criação doméstica frequente.

Pouco se sabe sobre a variabilidade genética populacional da espécie em questão. Nesse sentido, os parâmetros genéticos são de extrema importância, possibilitando assim, traçar estratégias de conservação para as mesmas, apresentando-se essenciais para a manutenção dessas populações em períodos ecológicos e evolutivos. (COUCEIRO et al., 2011; MOUTOU et al., 2011; FINGER et al., 2007). Através dos marcadores moleculares *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR), torna-se possível o conhecimento da distribuição da variabilidade genética de uma espécie.

Esses marcadores, fenótipos moleculares de polimorfismos específicos na sequência do DNA, apresentam-se em abundância ao longo do genoma dos seres eucariontes, sendo intensamente utilizados em estudos genético populacionais.

Dentre estes estudos, destaca-se principalmente a caracterização de níveis e organização de variabilidade genética dentro e entre espécies afins, subpopulações e grupos de reprodução e progênies. Assim, atuam na amplificação de uma seqüência de DNA delimitada por duas regiões microssatélites invertidas (BENZAQUEM et al., 2009).

Nesse sentido, o estudo da variabilidade genética dessa espécie empregando os marcadores do tipo (ISSR), pode ser bastante informativo complementando o que já se conhece sobre as perturbações em seu habitat e a conseqüente redução da diversidade genética. Portanto, entre outros objetivos deste estudo, destaca-se a caracterização genético-populacional de abelhas Jataí da região de Iretama e Campo Mourão – Paraná, a seleção de primers ISSR que amplifiquem regiões entre blocos microssatélites entre os indivíduos, e o aperfeiçoamento das condições de amplificação dos mesmos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar geneticamente as populações de *Tetragonisca angustula* da região de Campo Mourão – Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair DNA genômico de amostras das populações de *Tetragonisca angustula*;
- Utilizar marcadores moleculares ISSR para interpretação dos padrões de bandas em gel de eletroforese;
- Testar a temperatura ideal de anelamento de primers marcadores ISSR, já utilizados para o gênero *Melipona*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 OS MELIPONÍNEOS

A tribo *Meliponini* compreende cerca de 60 gêneros distribuídos pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo (MICHENER, 2007). Os meliponíneos são abelhas sociais, que apresentam um ferrão muito atrofiado, não podendo ser utilizado para defesa, o que deu origem ao seu nome popular: abelhas sem ferrão. Esses organismos são responsáveis pela polinização de cerca de 40 a 90% das espécies vegetais, conforme o ecossistema (KERR, CARVALHO e NASCIMENTO, 1996). Assim, são considerados por muitos autores a peça chave na manutenção de diversos ecossistemas em que ocorre, sendo de grande importância o desenvolvimento de estratégias que visem a sua conservação.

Essas abelhas mantêm uma estreita relação co-evolutiva de alta especificidade com as plantas angiospermas, pois devido ao seu tamanho diminuto, muitas vezes são responsáveis únicas pela polinização de plantas que desenvolvem flores pequenas. Além do serviço de polinização, também são importantes do ponto de vista econômico pela produção de mel (MORGADO et al., 2002). Embora o produzam em menor quantidade, o produto se diferencia do mesmo ofertado pela *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, apresentando doçura e aroma característicos, atraindo consumidores distintos, dispostos a pagar altos preços pelo produto no mercado (CARVALHO et al., 2005).

Os indivíduos de *Meliponini* apresentam grande fragilidade quando expostos à destruição de habitats (KERR, CARVALHO e NASCIMENTO, 1996). Por essa baixa tolerância à perturbações, segundo Brown e Albrecht (2001), podem ser utilizados como bioindicadores de degradação de ambientes. A alta sensibilidade dessas abelhas deve-se a presença de um abdômen que foi desenvolvido em rainhas fecundadas, impedindo-as de voar a longas distâncias, assim, não conseguem fugir de áreas de alta perturbação. O uso excessivo de defensivos agrícolas, devido a seu poder letal, também pode contribuir para a extinção de espécies em muitos locais.

3.2 *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)

Vulgarmente conhecida por jataí, a espécie *Tetragonisca angustula* possui nicho ecológico peculiar, tratando-se de uma espécie que sobrevive muito bem em locais onde há grande número de colônias de outras abelhas. Sua ampla distribuição geográfica faz com que seja encontrada praticamente em toda a América Latina (NOGUEIRA – NETO, 1997). Caracteriza-se por possuir um corpo pequeno e delgado, de 4 a 5 mm e uma corbícula extremamente pequena que não ocupa toda a largura da tíbia (MICHENER, 2007). Adaptam-se bem a diferentes substratos para nidificação, encontrando-se ninhos no solo, em construções humanas, e em cavidades pré-existentes em troncos de árvores vivas ou mortas (BATISTA, RAMALHO e SOARES, 2003).

Nakasugui, Takasusuki e Falco (2011), destacam além do seu importante papel ecossistêmico como agente polinizador, sua utilização como bioindicadores frente a presença destes produtos tóxicos. Esses organismos podem, então, determinar a qualidade do habitat em relação a presença de agrotóxicos no ambiente e o nível de toxicidade perigosa frente a estes.

A abelha jataí produz mel de sabor muito apreciado, chegando a ser oito vezes mais valorizado do que o mel de *Apis mellifera*, sendo amplamente utilizado na medicina popular (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 1984; NOGUEIRA NETO, 1997; FREITAS e SOARES, 2004). Tanto o mel quanto a própolis de *T. angustula* possuem atividade antibacteriana (MIORIN et al., 2003; SGARIGLIA et al., 2010). Essas características peculiares justificam a atratividade dos produtores pelo cultivo doméstico dos indivíduos, seja para fins alimentícios ou para fins econômicos.

A grande importância e abrangência desses indivíduos justifica a realização de estudos referentes à genética dessas populações a fim de incentivar a sua conservação e entender sua dinâmica. Nesse sentido, estudos acerca desses indivíduos são encontrados principalmente próximos à região de estudo. Na Universidade Estadual de Maringá, na unidade de Pós Graduação em genética e melhoramento, trabalhos são realizados para avaliar a estrutura genética entre as populações dessas abelhas.

Baitala (2005a) estudou o polimorfismo molecular entre as populações dessa espécie nas regiões paranaenses de Maringá, Iguatemi e Cianorte, e em

Junqueirópolis – São Paulo. O autor encontrou um isolamento entre as populações do Noroeste do Paraná (Maringá e Cianorte) da população de Junqueirópolis (SP). Em outro estudo, Baitala (2005b), abordando a *Tetragonisca angustula fibriegi* (Schwarz, 1938), subespécie da *T. angustula*, analisou a variabilidade e estrutura genética dessas populações provenientes de dois meliponários, localizados em Maringá e Cianorte (PR). Por meio das análises pertinentes, obteve altos valores de polimorfismo e fluxo gênico entre as populações, sugerindo que, apesar da distância geográfica entre as mesmas, está ocorrendo hibridização entre as populações de jataí analisadas. Esses resultados são um indicativo que essas abelhas estão se mantendo no ambiente natural apesar da fragmentação das matas, melhores práticas de manejo desses indivíduos podem ser desenvolvidas para polinização e produção de mel. Ribeiro (2011) estudou a amplificação heteróloga e diversidade genética em *T. angustula* e *T. fibriegi* de populações pertencentes às localidades de Maringá – PR; Dracena, São Carlos e Santa Cruz do Rio Pardo – SP. A análise populacional apresentou a boa estruturação das populações e a observação de homozigotos em excesso.

3.3 FRAGMENTAÇÃO DE HABITATS X VARIABILIDADE GENÉTICA de *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811)

O Brasil possui dezenas de espécies de abelhas nativas que apresentam importante papel na fecundação de inúmeras espécies vegetais originais de nossa flora. Porém, a destruição de matas naturais, o extrativismo, e o aumento das áreas agricultáveis contribuem para a redução da diversidade desses organismos (STUCHI, 2008).

A fragmentação de habitat é a modificação de regiões de vegetação natural contínua em porções isoladas, com dimensões, formas e graus de isolamento diversos, sendo consequências da atual dinâmica de uso da terra pelo homem. Os efeitos de borda são os mais importantes fatores que levam às mudanças em comunidades fragmentadas, causando a redução da população de polinizadores, como as abelhas (FERREIRA e GALBIATI, 2008).

Além de eliminar várias espécies vegetais do planeta, essa fragmentação afeta particularmente as populações de abelhas eussociais, como os Meliponinae (Apidae) que utilizam ocos de árvores para nidificarem (ADAIR, 1996). Esse comportamento eussocial causa a diminuição do tamanho da população, pois apesar de existir muitos indivíduos pertencentes ao mesmo ninho, apenas a rainha e o macho são reprodutivos, o que juntamente com sua haplodiploidia, diferença de número de cromossomos entre machos e fêmeas, gerando menos cópias genéticas que populações diplóides, contribuem para a diminuição da variabilidade genética (PAMILO, PEKKA e VARVIO- AHO, 1978). Outro fator que também contribui para essa redução em pequenas populações, como a desses organismos, é a deriva genética (alterações aleatórias nas frequências genéticas entre gerações), que causa a perda de alelos raros em uma população (NASCIMENTO, 2008).

Portanto, devido às barreiras impostas, esse isolamento das populações também ocasiona a redução do fluxo gênico, e conseqüentemente perda da variabilidade genética, já que impedem a troca gênica por não haver possibilidade de migração de machos e rainhas virgens para o acasalamento (ADAIR, 1996). Assim, cada vez mais haverá o acasalamento entre indivíduos aparentados, gerando um incremento na ocorrência de homozigotos na população (GUEDES, 2004). Como resultado da endogamia, pode haver um desaparecimento eventual, causado pela escassez de recursos, competição, ou por ação de organismos invasores (SILVEIRA, MELO e ALMEIDA, 2002).

A baixa variabilidade genética pode representar perigo para as espécies no geral, pois se o ambiente em que vive naturalmente sofrer alguma mudança importante, a população poderá rapidamente se extinguir por não ter variabilidade suficiente para suportá-la (CÂMARA, 2009). Portanto, essa diversidade de genes é crucial para manter a capacidade natural das populações em responder às mudanças climáticas e a todos os tipos de estresses bióticos e abióticos impostos pelo meio (MACHADO, 2008).

A variabilidade genética, em termos de biodiversidade, permeia os representantes de cada espécie. Antes da extinção da espécie, grande parte dessa biodiversidade já se extinguiu em termos de diferenciação genética. Acredita-se que cada espécie possui um número particular viável de indivíduos, que garanta a manutenção da espécie, para que sua biodiversidade de genes não seja erodida pela endogamia e deriva genética. Dessa forma, o diagnóstico da redução dessa

variabilidade é o primeiro sintoma de extinção de uma espécie qualquer (SANTOS, GUIMARAES e REDONDO, 2002).

A deriva genética e o endocruzamento são inversamente proporcionais ao tamanho populacional. Então, as espécies que estejam ameaçadas em extinção, pertencem a um pequeno tamanho populacional, e costumam ter baixos níveis de heteroziguidade. Assim, este nível, além de um alto tamanho populacional, devem ser mantidos (MARQUES, 2003).

No entanto, nem todas as espécies que possuam baixa variabilidade genética necessariamente irão se extinguir. Isso se aplica ao caso da última espécie restante de cavalo selvagem, o cavalo de Przewalski, *Equus przewalskii* Poliakov, 1881, que apesar de sua perda de habitat e redução de seus números populacionais, devido à caça e utilização de terras para agricultura, ainda não entrou em extinção, apesar de sua diversidade genética reduzida (WILLIAMS, 2010). Isso, não exclui a necessidade de estratégias para a sua conservação, que já estão sendo realizadas, através de produção seletiva da espécie, programas de melhoramento genético, formação de grupos sociais estáveis, e criação de padrões de comportamento que auxiliem a sobrevivência desses animais na natureza, e posterior realocação dos mesmos.

Outro caso de animal onde sua baixa variabilidade genética durante anos não os levou à extinção, é a dos *Acinonyx jubatus* (Schreber, 1776), conhecidos por guepardos, na Namíbia, África Austral, resultado de períodos de declínio populacional, intercalados por períodos estáveis, sem sinal de expansão desde 60.000 anos. O estudo de Fabiano (2013), relaciona a baixa variabilidade genética desta população com um declínio gradual, causado por flutuações e reduções de habitat devidas a oscilações climáticas no Pleistoceno e Holoceno, além do aumento da aridez em tempos mais recentes no país. Algumas hipóteses alternativas incluem uma estrutura de metapopulação e a persistência desse tamanho efetivo baixo, que se deve à ocorrência de poliglinia, ocasionando uma alta variância reprodutiva.

No caso de *T. angustula*, torna-se importante manter um número mínimo de colônias no mesmo local, a fim de garantir a manutenção da variabilidade genética, pois apesar de mesma atrair grande quantidade de produtores interessados em seu mel, sua importância vai muito além, pois está diretamente ligada ao importante mecanismo utilizado pela natureza para dar continuidade à vida no planeta, seja pela polinização de vegetais ou pela cópula, aumentando número de indivíduos e a diversidade de genes (ADAIR, 1996).

Vale ressaltar também, que nem todas as plantas são afetadas com a redução da amostra populacional desses polinizadores, pois algumas espécies vegetais, em áreas fragmentadas, desenvolveram novos mecanismos, necessários à sua sobrevivência, como o mecanismo de apomixia, para DALL'AGNOL e SCHIFINO-WITTMANN (2005), a formação de sementes sem fecundação, que ocorre em 15% das famílias das angiospermas (Magnoliophytas). Para Pessoa, Moraes e Silva (2013), a espécie *Similax fluminensis* Steud, dióica de fragmentos florestais, encontrada no centro oeste do Brasil, realiza apomixia facultativa, estratégia reprodutiva vantajosa, garantindo sua reprodução mesmo na ausência de polinizadores. Rodrigues (2010) destaca o aumento desse evento, juntamente com a poliembrionia, ocorrência de mais de um embrião por semente, no bioma Cerrado, onde ainda predominam sistemas sexuais de reprodução vegetal. Esses mecanismos seriam alternativas de escape das espécies, frente à fragmentação deste habitat, resultado da diminuição da fauna de polinizadores e o fluxo de pólen, ou ainda a redução de populações naturais que inviabilizam a manutenção de espécies por processos sexuais (SCHALL e LEVERICH, 1996) .

3.4 MARCADOR *INTER SIMPLE SEQUENCE REPEAT* (ISSR) PARA ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA

Os marcadores moleculares são marcas presentes ao longo do genoma mitocondrial e nuclear, que evidenciam as variações genéticas existentes entre as populações, podendo indicar o grau de distanciamento genético das mesmas (HILSDORF, 2011). Por meio dessas técnicas, torna-se possível, além de detectar a variabilidade de organismos em diferentes níveis de táxons e sua funcionalidade, executar o monitoramento de atividades específicas desses organismos por meio de seu respectivo acompanhamento. (STRALIOTTO, 2006).

Os marcadores ISSR foram desenvolvidos a partir da necessidade de explorar repetições de microssatélites sem a necessidade do conhecimento prévio da sequência – alvo do DNA (ZIETJIEWICZ, RAFALSKI e LABUDA, 1994). Destacam-se dos demais e são frequentemente utilizados em diversas pesquisas, devido ao seu custo relativamente baixo e alto nível de reprodutibilidade e

confiabilidade, combinando a facilidade do *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) com a robustez dos marcadores *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e *Simple Sequence Repeats* (SSR) (TIKUNOV, KRUSTALEVA e KARLOV, 2003). Dessa maneira, o grande número de fragmentos amplificados por uma PCR usando os marcadores em questão pode auxiliar no processo de exploração da estrutura genética de uma espécie.

Para Pessoa da Silva et al.(2011), a *Inter Simple Sequence Repeat* tem se mostrado uma poderosa ferramenta para análise da diversidade genética, utilizando uma sequência simples repetida como oligonucleotídeo iniciador, a fim de amplificar um fragmento de DNA, delimitado por dois microssatélites invertidos, o que gera um alto nível de polimorfismo.

Baseada no princípio da Reação em Cadeia Polimerase (PCR), a aplicação dessas sequências é recomendada para análises de espécies relacionadas evolutivamente, reproduzindo resultados confiáveis devido a sua abundância e dispersão no genoma, gerando locos polimórficos em quantidades satisfatórias. Além disso, apresentam rapidez em seus resultados com custos razoavelmente menores em comparação com outros marcadores. Em contrapartida, são bastante criticados por causa da impossibilidade de distinção entre indivíduos homozigotos e heterozigotos (NOGUEIRA, 2009; RODRIGUES, 2010; DONG et al., 2008).

A técnica da PCR é baseada na capacidade da enzima polimerase replicar a sequência do DNA em certas condições laboratoriais, partindo de um par de pequenos fragmentos iniciadores da fita molde, os chamados primers, que flanqueiam a sequência de interesse a ser amplificada por meio de variações alternadas e cíclicas de temperatura, permitindo assim a desnaturação, o anelamento e extensão de determinadas sequências do material genético, ciclo após ciclo. Assim, será possível a visualização do DNA no gel na forma de banda após sua separação pela etapa de eletroforese (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998).

Portanto, os marcadores moleculares proporcionam uma visão mais ampla das características genéticas dos indivíduos, sendo uma importante ferramenta para o estudo da variabilidade genética, essencial para o controle e preservação das populações de abelhas indígenas (STUCHI et al., 2008). Atualmente, os ISSR têm sido utilizados para análise de insetos em estudos genéticos em nível intra e interespecífico, porém, em abelhas, os estudos utilizando os mesmos são menos comuns. Em sua maioria, se restringem a abelhas do gênero *Apis*, sendo *Apis*

mellifera uma espécie modelo (NASCIMENTO 2008; BARROSO, 2012). Não foram encontrados trabalhos utilizando o marcador ISSR para análise da diversidade genética da espécie *Tetragonisca angustula*. Porém, encontram-se estudos na literatura com a aplicação de outros marcadores, como o de Gurgel (2009), que estudou a variabilidade genética desta espécie por meio da aplicabilidade da técnica dos microssatélites, analisando a resposta dessas populações à heterogeneidade de habitats na costa Atlântica.

Em relação ao marcador em questão, entre estudos encontrados, o mesmo foi utilizado por Nogueira (2009), que baseando-se também pelo protocolo de Nascimento (2008), estudou a variabilidade genética de outro meliponíneo, *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994, visando subsídios para a conservação da espécie. O autor utilizou 10 primers ISSR, observando grande percentual de locos polimórficos, e por meio de suas análises, obteve baixos valores de distância genética entre as populações, que revelaram uma alta similaridade genética entre as mesmas, sugerindo que compartilham de um mesmo “pool” gênico.

Shouhani et al. (2014) estudou a aplicação desses marcadores para analisar a diversidade genética da *Apis mellifera* em algumas regiões do Irã. Todos os primers utilizados mostraram polimorfismo nos locos amplificados, indicando assim uma alta variabilidade genética na maioria das áreas estudadas, porém indica baixos níveis de similaridade entre as raças em cinco províncias diferentes, o que pode ser justificado pelas sucessivas migrações dos indivíduos. O respectivo estudo mostrou que a técnica ISSR é um método adequado para a detecção do polimorfismo na referida espécie.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

Para a execução deste estudo foram escolhidos os municípios de Iretama e Campo Mourão (Figura 1a), onde as abelhas foram coletadas.

Segundo a Classificação Climática de Köppen-Geiger, o clima da região de Campo Mourão é sub-tropical úmido mesotérmico com verões quentes e geadas pouco frequentes, com tendência de concentração das chuvas nos meses de verão, sem estação seca definida e a média das temperaturas dos meses mais quentes é superior a 22° C e a dos meses mais frios é inferior a 18° C. Os índices pluviométricos apresentam-se em média entre 1.600 mm e 1.800 mm por ano (CAVIGLIONE et al., 2000).

Em relação a fitogeografia, Iretama encontra-se sob predominante domínio da Floresta Ombrófila Mista Montana, com pequeno fragmento de Floresta Estacional Semidecidual Montana. Campo Mourão também situa-se em uma área de contato entre a Floresta Estacional Semidecidual Montana e a Floresta Ombrófila Mista Montana, mas apresenta algumas manchas de Campos e Cerrado (RODERJAN et al., 2002).

Para Liberali (2013), o relevo que constitui a região de estudo é bastante movimentado em algumas áreas, principalmente na região de Iretama, inviabilizando em grande parte as atividades agrícolas mecanizadas. Existem outras áreas mais planas, ocorrentes em Campo Mourão, que permitem, portanto esse tipo de cultura. Essa organização da paisagem influencia diretamente o tipo de uso do solo, que na mesorregião do estado do Paraná, onde estão inseridos os municípios em questão, encontra-se a agricultura Intensiva, uso misto e cobertura florestal (Figura 1b). Em Iretama destaca-se a atividade agrícola local, constituída por culturas de café, mandioca, plantio de eucalipto, maracujá, dentre outros cultivos. Dessa forma, principalmente na região de Iretama, a estrutura fundiária constitui-se predominantemente pela agricultura familiar, representada em diversos fragmentos. Em Campo Mourão não é muito diferente, destaca-se também a produção agrícola,

principalmente de oleaginosas, juntamente com outras atividades que em menor participação contribuem para o Produto Interno Bruto, como a silvicultura, extração vegetal e pecuária (IBGE, 2010).

A produção de mel também está presente na região de estudo. Em meliponários, abelhas nativas são cultivadas, como a espécie *Tetragonisca angustula*. Assim, torna-se uma atividade de incremento à economia municipal, e incentivo à conservação desses organismos, resultando em uma possível potencialização da produção de mel, e conseqüentemente produção agrícola, devido à polinização.

Torna-se importante destacar que em Campo Mourão encontra-se a sede de uma das maiores cooperativas agrícolas da América Latina, a COAMO Agroindustrial Cooperativa, incentivando o desenvolvimento de melhores padrões de produção, oferecendo suporte aos cooperados, desde o planejamento do plantio até a comercialização da safra. Assim, como consequência, novas áreas foram destinadas ao uso agrícola para expansão da atividade na região (ONOFRE, 2005). Portanto, essa expansão pode refletir também de forma negativa nas populações de abelhas devido ao seu isolamento e formação de grandes mosaicos agrícolas, referentes aos fragmentos formados tanto em áreas com a agricultura mais desenvolvida, quanto em culturas não mecanizáveis.

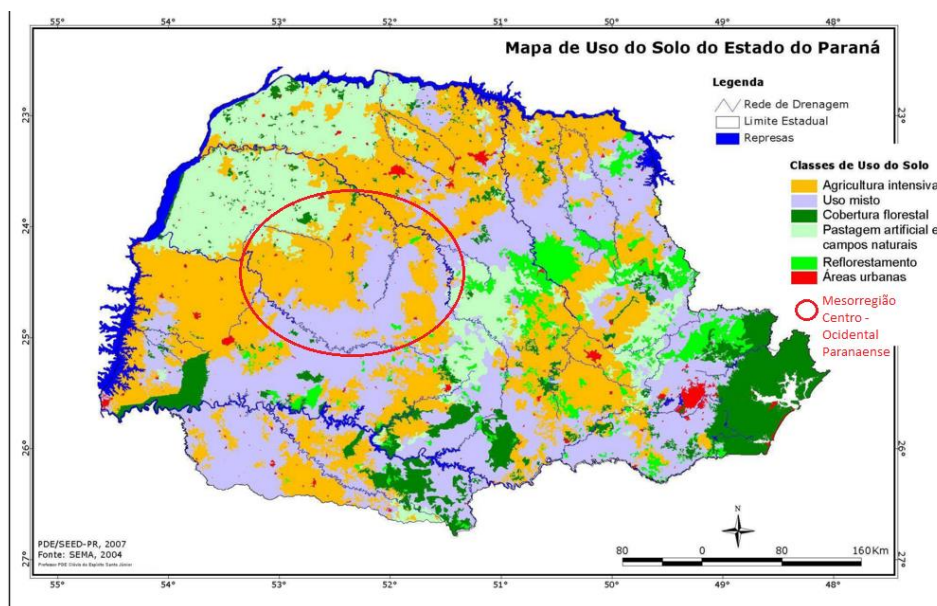
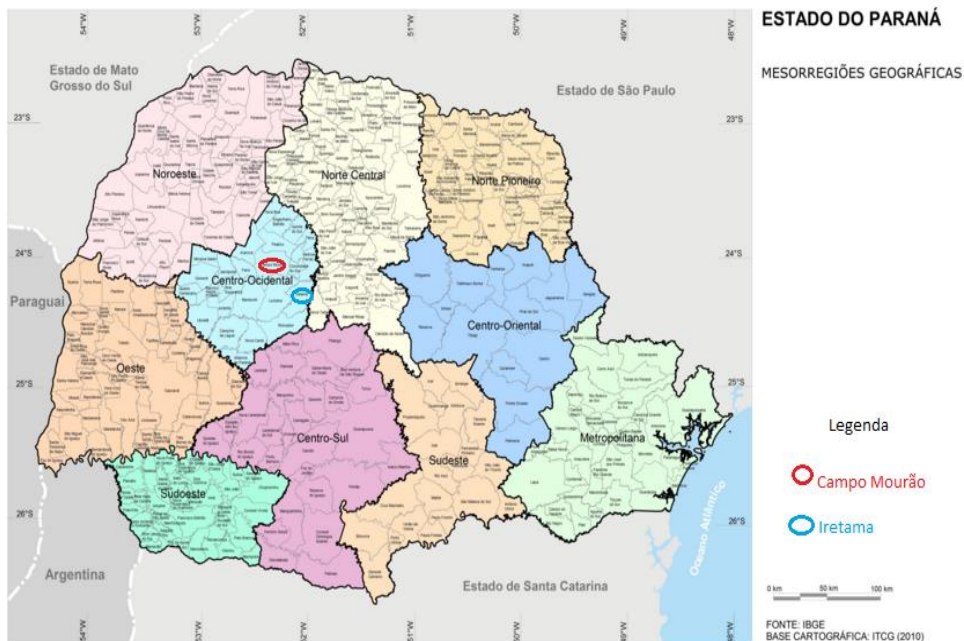


Figura 1a: Localização dos municípios de Campo Mourão, e Iretama no estado do Paraná.

Fonte: Adaptado de IPARDES (2015).

Figura 1b: Mapa de uso do solo da Mesorregião Centro-Ocidental Paranaense, na qual estão incluídos as regiões de Iretama e Campo Mourão.

Fonte: Adaptado de Governo do Estado do Paraná (2015).

4.2 COLETA DE *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811)

Foram coletadas no total 12 operárias adultas de *Tetragonisca angustula* na região de Iretama, e em Campo Mourão, municípios paranaenses, no mês de Agosto de 2015, de forma que uma operária fosse coletada por ninho, em 12 diferentes ninhos, de forma aleatória (Tabela 1). Ao passo que as colônias foram encontradas, os indivíduos foram coletados. As operárias foram armazenadas em frascos contendo álcool 70%, que posteriormente foram acondicionados em freezer.

Tabela 1: Indivíduo, local de coleta, e procedência das 12 operárias de *Tetragonisca angustula* amostradas em Iretama e Campo Mourão – Paraná.

Indivíduo	Local de Coleta	Procedência
1	Porteira	Iretama
2	Casa 1	Iretama
3	Igreja	Iretama
4	Casa 2	Iretama
5	Frente da casa 3	Iretama
6	Trás da casa 3	Iretama
7	Galinheiro	Iretama
8	Paiol	Iretama
9	Figueira	Iretama
10	Porteira Donizete	Iretama
11	Ninho 1 UTFPR	Campo Mourão
12	Ninho 2 UTFPR	Campo Mourão

4.3 TÉCNICAS LABORATORIAIS

O material biológico coletado foi processado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão. Os procedimentos seguiram três etapas laboratoriais: Extração de DNA genômico; PCR, e Eletroforese. Por meio desses processos, objetiva-se o acesso ao DNA da espécie em questão e sua amplificação para possíveis análises.

4.3.1 Extração de DNA Genômico

A etapa de Extração consiste na separação do material genético a partir de restos celulares e de proteínas, principalmente as DNases, degradadoras de moléculas de DNA, tanto em células bacterianas como eucarióticas. Para tanto, diferentes reagentes e substâncias são combinados e utilizados para esse procedimento, variando de acordo com o tipo celular (LIMA, 2008).

Nesse sentido, para extração do DNA genômico dessas operárias pertencentes à diferentes colônias, utilizou-se como base o protocolo de Fernandes-Salomão et al. (2005), com adaptações, a fim de otimizar o processo e obter concentrações viáveis de DNA na quantificação.

Para o acesso ao material genético, cabeça e mesossoma dos indivíduos foram macerados em recipiente de porcelana, e posteriormente foi adicionado 500 µl de Tampão de Extração, composto por diferentes reagentes (Tabela 2). O material biológico juntamente com o Tampão foi acondicionado em tubo tipo eppendorf® de 1,5 ml e foi incubado em banho seco com agitação (Loccus biotecnologia) durante 20 min, á temperatura de 65 °C, a 600 rpm. O DNA foi desproteinado utilizando uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1. Posteriormente ao processo de desproteinação, o material retornou ao banho seco com agitação para agitação somente, a 200 rpm, durante 15 minutos, a fim de liberar os gases provenientes da reação, evitando que os tubos estourassem na centrífuga. Após este procedimento, os tubos foram para a centrífuga (Daiki), a 12000 rpm durante 10 min. Ao retirar os tubos da centrífuga, o sobrenadante das amostras foi retirado e acondicionado em outro tubo para a realização das próximas etapas. O próximo passo, o de precipitação do DNA, consistiu na adição de 700 µl de Isopropanol, e RNase, utilizando 1 µl da solução a 20 mg/ml para 100 µl da mistura, onde as amostras foram incubadas a 20 °C negativos em freezer, durante no mínimo 24 horas. Após o tempo determinado, o material foi novamente centrifugado a 12.000 rpm durante 10 min. O precipitado formado foi lavado com etanol 70%. Por fim, adicionou-se 140 µl de água destilada no DNA suspenso, e os mesmos foram acondicionados novamente em freezer até a realização das próximas etapas.

Tabela 2: Reagentes que compõem o tampão utilizado para extração do DNA de *Tetragonisca angustula*.

Reagente	Concentração	Volume
CTAB	5%	4ml
EDTA	20Mm	0,8ml
NaCl	5M	14ml
Proteinase K	100 ug/ml	400 µl
Tris – HCL	1M	5ml

4.3.2 Quantificação das amostras

Após a etapa de extração, foi realizada a quantificação do DNA. As amostras foram ressuspensas, e dois µl de volume foi colocado no aparelho quantificador de DNA L-Quant (Loccus Biotecnologia) (Figura 2), que através de absorvância de luz que as mesmas apresentavam, mediu a quantidade de material genético presente em cada amostra, encontrada em ng/µl.

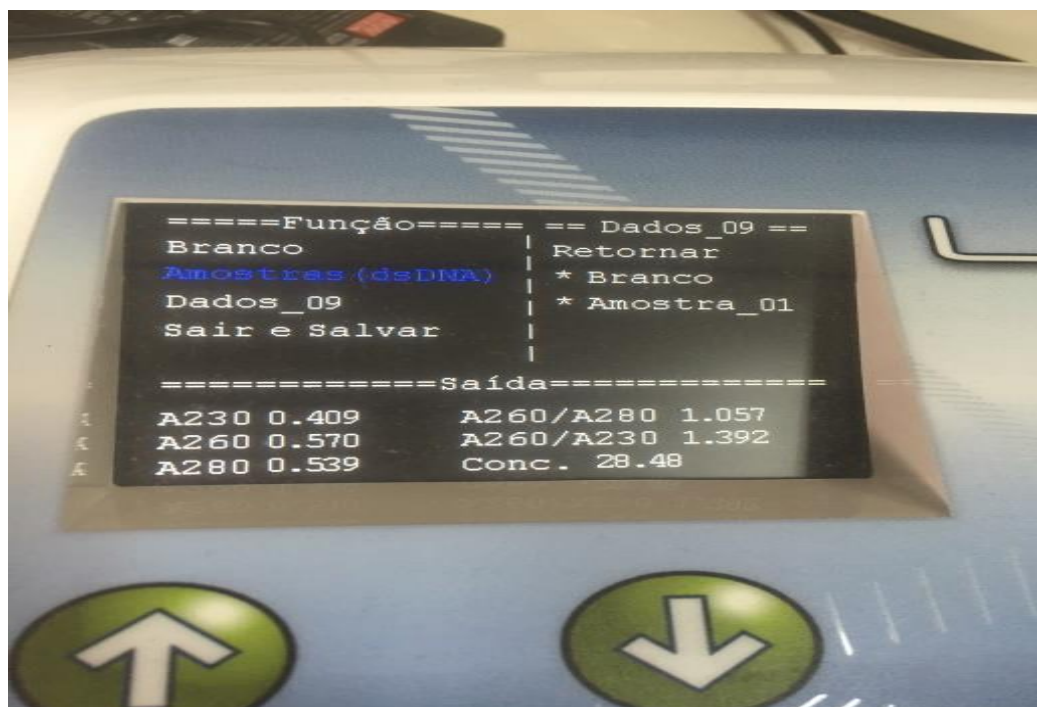


Figura 2: Quantificador L-Quant, equipamento responsável pela leitura da concentração das amostras de DNA extraídas.

4.3.3 Reação em Cadeia Polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia Polimerase consiste na amplificação de determinadas regiões do DNA do organismo, proporcionando amostras de qualidade. A técnica utilizada para tal baseou-se na metodologia de Nascimento (2008), com algumas modificações referentes às concentrações e temperatura de incubação das amostras. O material obtido na extração foi adicionado a um mix de reagentes e posteriormente incubado no equipamento termociclador A300 (LongGene) (Figura 3), programado para ciclos, tempo e temperaturas distintas, capaz de realizar gradiente de temperaturas (Figura 4), a fim de otimizar essa condição de anelamento dos primers correspondentes ao processo. O volume de cada reagente contido no mix foi sendo adaptado conforme as reações eram realizadas, para sua otimização, sempre completando o volume final de 25 µl.

Primeiramente, para desnaturação do material, as amostras foram incubadas no equipamento a temperatura de 94 °C durante 1,5 min, seguida de mais 45 segundos a mesma temperatura. Na fase de anelamento, onde os primers se ligam à região alvo da amplificação, as amostras foram submetidas a temperaturas específicas para os respectivos primers testados. Por fim, na fase de extensão, para o posicionamento da enzima taq polimerase e início da nova fita de DNA, as amostras foram incubadas à temperatura de 72 °C durante 6,5 minutos. Após cada ciclo, o processo foi repetido 40 vezes para obtenção de quantidade necessária de material genético.

Cada reação constituiu de um volume total de 25 µl, contendo: DNA, Primer (respectiva sequência do marcador molecular, responsável por delimitar a região de interesse da amplificação), Taq polimerase, Buffer 10x, Dntp, MgCl, e H₂O ultrapura. As reações foram acompanhadas por controle negativo contendo todos os componentes, exceto DNA genômico.

Diversas reações de PCR foram testadas. Algumas das receitas adaptadas com as concentrações, volume dos reagentes e as temperaturas de incubação encontram-se nos anexos.



Figura 3: Equipamento Termociclador responsável pela incubação das amostras durante a fase de PCR.

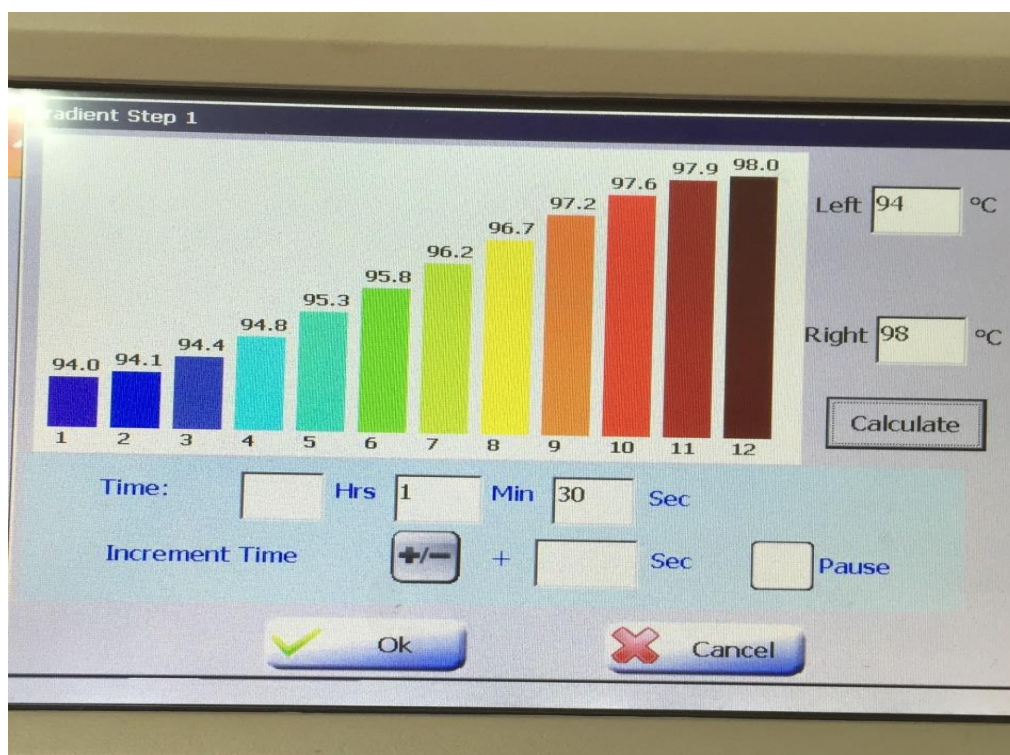


Figura 4: Exemplo de Incubação das amostras no termociclador em gradiente de temperatura.

4.3.4 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose. Nessa etapa, os equipamentos utilizados foram fonte e cuba de eletroforese, que consistem em corrente elétrica aplicada à uma cuba horizontal. Nesta encontrava-se gel de agarose 1,5% (p/v) mergulhado em tampão TBE 1x. As amostras de DNA foram inseridas em pequenos poços do gel (Figura 5), dispostos na cuba. Por meio da voltagem do equipamento, os fragmentos do material genético se separam por tamanho reprodutível e forma, resultado da migração das moléculas.

Também, um marcador de peso molecular de DNA (DNA Ladder da Kasvi 100pb) foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos gerados, e facilitar a identificação das bandas.

Posteriormente, esse gel foi analisado em um sistema de fotodocumentação L-Pix ex (Loccus Biotecnologia), versão 1.0.1, fotodocumentador provido de transiluminador ultravioleta, capaz de capturar as imagens obtidas para análise de dados.



Figura 5: Amostras de DNA inseridas no gel de agarose presente na cuba de eletroforese.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à etapa de extração de DNA, dos 12 indivíduos que foram extraídos o material genético, apresentaram as maiores concentrações os indivíduos 4, 5 e 8 (Tabela 3). Já os indivíduos 6, 7 e 10, apresentaram as menores concentrações, abaixo de 5 ng/μl.

Tabela 3: Concentração de DNA obtida por Indivíduo através do equipamento quantificador de DNA.

Indivíduo	Cidade	[DNA (ng/μl)
1	Iretama	17.75
2	Iretama	9.33
3	Iretama	10.66
4	Iretama	25.63
5	Iretama	37.95
6	Iretama	4.86
7	Iretama	3.47
8	Iretama	81.86
9	Iretama	25.32
10	Iretama	3.35
11	Campo Mourão	5.26
12	Campo Mourão	13.08

Para a realização da extração, todos os indivíduos foram armazenados seguindo a mesma metodologia. Essa diferença entre concentrações deve-se às características de cada indivíduo. O estudo de Machado (2013), referente ao desenho e validação de marcadores SSR para a mamoneira, apresenta em seus resultados que apesar de pertencerem à mesma espécie, e o DNA ser extraído da mesma forma, e com mesma integridade, as particularidades de cada organismo resultam em divergências de concentrações.

Concentrações de DNA obtidas em quantidades inadequadas podem implicar em falhas nas etapas subsequentes. Também, a baixa concentração do mesmo, poderá resultar em amplificação errada ou não amplificação de segmentos com perfis de

eletroforese não reproduzíveis (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). A concentração mínima de DNA para a execução da PCR é de 5 ng/μl de DNA, porém, quantidades bem menores também podem ser utilizadas (VIEIRA, 2006).

Dessa forma, as concentrações de DNA obtidas sugerem que o protocolo de extração adaptado para tal procedimento foi capaz de obter resultados satisfatórios, capazes de serem utilizados para a reação de amplificação. Dessa maneira, podemos inferir sobre a sua funcionalidade, garantindo quantidades adequadas de DNA para as técnicas posteriores a serem realizadas. Porém, a qualidade das mesmas ainda será provada pelas etapas em seguida, já citadas anteriormente.

Em geral, trabalhos envolvendo variabilidade genética dessa espécie em questão não citam as concentrações de DNA encontradas para que haja uma comparação direta. Os referidos trabalhos direcionam os estudos de diversidade genética dessas espécies, abordando diretamente o grau dessa diferenciação e heterozigosidade dos indivíduos. Em abelhas da espécie *Apis mellifera*, Philomeno et al. (2004) avaliou e comparou diferentes metodologias de extração sobre o material genético desses organismos, obtendo para dois diferentes protocolos, as concentrações em média de 31,6 ng/μl e 67,2 ng/μl.

A real comparação da variabilidade genética só poderá ser realizada após a aplicação das amostras amplificadas e consequente obtenção dos géis com padrões de bandas do marcador, finalmente indicando similaridades e reflexos de ações antrópicas, como fragmentação de habitats, endogamia por criação de abelhas, entre outros. Assim, destaca-se a importância de uma amplificação com quantidades adequadas de DNA para tal.

Em relação à PCR, primeiramente, foi utilizado o primer do tipo ISSR 13 (primer de larga utilização), baseando-se nas concentrações de reagentes do protocolo utilizado por Nascimento (2008). Porém, não houve anelamento para a reação de amplificação das amostras para nenhum dos 12 organismos, o que não permitiu a visualização de bandas de DNA desses indivíduos, tornando assim necessário alguns ajustes metodológicos. Então, para este primer, foram alteradas as concentrações e volumes dos reagentes inclusos no Mix. Ainda, foi realizado um teste de gradiente de temperatura testando a resposta de apenas 1 indivíduo, já que cada qual responde de forma singular às condições, para que fosse encontrada a melhor temperatura da fase de anelamento da sequência de primer escolhida. No entanto, as bandas não foram visualizadas em quaisquer testes com as alterações,

o que justifica a aplicação de outros primers como novos testes, para encontrar dentre os primers do estoque laboratorial alguma sequência que apresente anelamento com o material genético da *T. angustula*.

Assim, foram testados neste trabalho 11 diferentes primers, exceto ISSR 13 (Tabela 4), os mesmos utilizados por Nogueira (2009), justamente por já apresentar resultados para o gênero *Melipona*, ou seja, diferentes sequências foram aplicadas às amostras. A finalidade desses testes, como a do primeiro, foi encontrar primers que apresentem anelamento com a sequência do DNA do indivíduo, além de encontrar a temperatura de anelamento ideal para o respectivo marcador, visando qual condição apresenta melhor visualização das banda de DNA na imagem analisada. Cada sequência de marcador exige temperaturas específicas, então, para todos os marcadores utilizou-se um indivíduo para a aplicação das amostras, e posterior corrida do gel a analisar a melhor temperatura de amplificação.

Tabela 4: Primers ISSR utilizados para testar a amplificação de DNA dos indivíduos de *Tetragonisca angustula*, suas respectivas sequências de nucleotídeos, e o gradiente de temperatura de anelamento por primer a qual as amostras foram submetidas

Primer/Código	Sequência de Nucleotídeos	Temperatura de Anelamento
13	ACACACACACACACACC	48° - 55°
866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	42° - 52°
Terry	GTGGTGGTGGTGRG	45° - 52°
827	ACACACACACACACACG	45° - 55°
890	VHVGTGTGTGTGTGTGT	42° - 52°
C	GTGGTGGTGGTGGTGRG	42° - 52°
841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	42° - 52°
807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	42° - 52°
808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	42° - 52°
815	CRCTCTCTCTCTCTG	42° - 52°

Não foram visualizadas bandas de DNA em nenhum dos testes realizados para nenhum dos primers, sendo visualizado apenas na banda 1, os fragmentos do Ladder aplicado (Figura 6). Assim, pode-se constatar que para a espécie utilizada, os primers aplicados não são adequados para a reprodução de bandas.

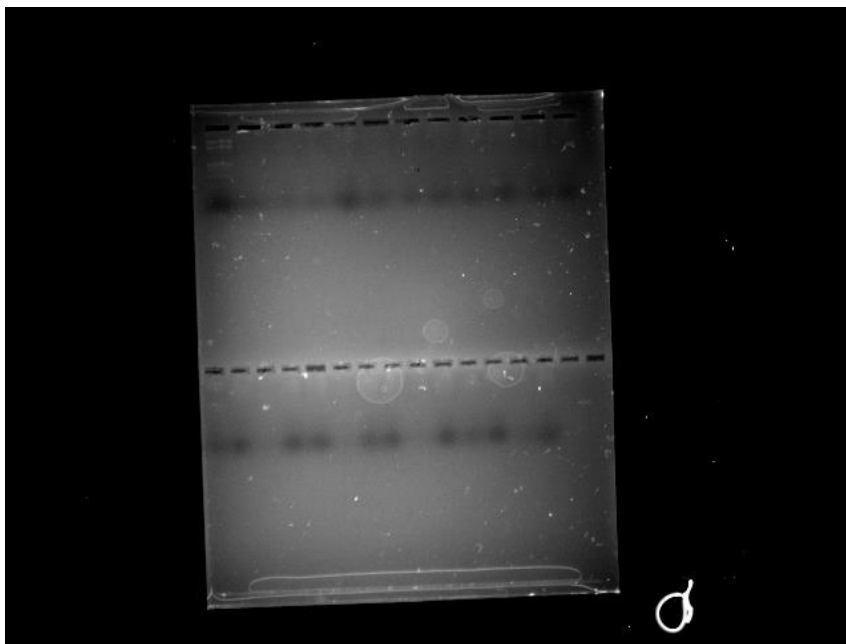


Figura 6: Ausência de fragmentos de DNA produzidos a partir dos primers ISSR selecionados.

Parâmetros para a realização dos testes utilizando a metodologia apresentada foram difíceis de serem traçados, visto que não foram encontrados trabalhos utilizando esses tipos de marcadores para a espécie estudada. Em contrapartida, trabalhos que estudem a variabilidade genética da *T. angustula* envolvendo a aplicação de outros marcadores como o RAPD, Isoenzimas, e microssatélites apresentaram resultados satisfatórios e bandas nitidamente visualizadas em gel de agarose.

Alves (2006) estudou os polimorfismos desses indivíduos por meio dos marcadores RAPD. As reações de amplificação foram realizadas utilizando o volume total de 20 μ l, utilizando 2 μ l de Tampão Tris – KCL 1x, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,3 μ M de primer, 0,1 mM de Dntp, 1 unidade de taq polimerase e 20 ng de DNA molde. Iniciando as reações com aquecimento da tampa do termociclador a 105 °C, e programado para 37 ciclos, sendo os três primeiros constituídos a cada ciclo de um minuto a 94 °C, um minuto a 35 °C, e dois minutos a 72 °C. Após a desnaturação inicial, cada ciclo restante constituiu em 10 segundos restantes a 94 °C, 20 segundos a 36°C e dois minutos a 72 °C, e uma extensão final a 72 °C por cinco minutos. Nesse estudo, foram testados 74 primers dos quais foram selecionados 13 deles para a análise. Todos estes reproduziram diferentes padrões de fragmentos RAPD. Baitala (2005a), também com o uso dos marcadores RAPD, avaliou a

estrutura genética em cinco populações (14 colônias) do meliponíneo em questão, utilizando 12 primers que reproduziram 171 fragmentos, dos quais 150 foram polimórficos, destacando a alta variabilidade genética entre os indivíduos

Ruiz (2006) também estudou a genética de populações de *T. angustula*, na região Noroeste do Paraná, por meio de Isoenzimas. Santiago (2013) adotou como marcadores moleculares os microssatélites para a análise da variabilidade genética desses indivíduos em meliponários, contando com dois pares de primers para a amplificação do DNA dos indivíduos, obtendo nove locus amplificados polimórficos.

Com o uso do ISSR, foram encontrados estudos acerca de espécies vegetais, quanto animais. O estudo de Nogueira (2009), referente à variabilidade genética de *Melipona capixaba* no estado de Minas Gerais, foi um dos trabalhos encontrados em que mais se aproximou taxonomicamente da espécie utilizada. O autor baseou-se também no protocolo de Nascimento (2008), e selecionou os primers 807, 808, 815, 827, 836, 841, 866, 890, C e Terry (Tabela 5) (todos em comum com este estudo). Através das análises de dados pôde visualizar 118 bandas, possibilitando que chegasse às conclusões de que as amostras de *M. capixaba* analisadas apresentaram alta similaridade genética e estruturação característica de uma espécie endêmica, e que não há aparentemente correção entre a variabilidade genética e as distâncias geográficas das amostras.

O estudo de Nascimento (2008), base para as concentrações de reagentes e temperaturas de anelamento dos primers das reações de amplificação, adaptadas neste trabalho, analisou o grau de diferenciação genética da *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836, também no estado de Minas Gerais. Testou 93 primers ISSR para amplificação do DNA, e com base no padrão de amplificação obtido, selecionou 20 primers. Destes 20, 11 foram selecionados para as análises, considerando o número e a resolução das bandas obtidas (Tabela 6). As reações de amplificação foram constituídas de volume total de 25 μ l contendo 10 ng de DNA, Dntp's a 100mM, 0,5 unidade de taq polimerase, 50 pmoles de primer, 2,5 ml de tampão 10X e H₂O ultrapura. O programa de amplificação constituiu de desnaturação inicial de 3 minutos a 94 °C, seguida de 40 ciclos de 1 minuto a 92 °C, 2 minutos à temperatura de pareamento do primer (variável conforme o primer), 2 minutos a 72 °C e um passo final de 7 minutos a 72 °C. As reações utilizando 11 primers resultavam em 147 bandas identificadas no total. Dentre estes, os primers 807 e 811 produziram o

maior numero de bandas, 19 e 18 respectivamente, enquanto o menor numero foi produzido utilizando-se os primers 836 (8 bandas) e 840 (9 bandas).

Tabela 5: Sequência dos primers ISSR, temperaturas de pareamento utilizadas por Nogueira (2009), e seus respectivos número de bandas obtidas na reação de PCR.

Primer /Código	Sequência (5' – 3')	Temperatura de Pareamento	N° bandas obtidas
807	AGAGAGAGAGGAGAGT	54,8°	14
808	AGAGAGAGAGGAGGC	49,6°	12
815	CRCTCTCTCTCTCTG	52°	16
827	ACACACACACACACACG	54,8°	11
836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	55,4°	13
841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	50,7°	9
866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	58,4°	7
890	VHVGTTGTGTGTGTGTGT	49,6°	20
C	GTGGTGGTGGTGGTGRG	53,4°	8
Terry	GTGGTGGTGGTGRG	54,8°	8
Total			118

Tabela 6: Sequência dos primers ISSR, temperaturas de pareamento utilizadas por Nascimento (2008), e seus respectivos número de bandas obtidas na reação de PCR.

Primer /Código	Sequência (5' – 3')	Temperatura de Pareamento	N° bandas obtidas
807	AGAGAGAGAGGAGAGT	54°	19
808	AGAGAGAGAGGAGGC	54°	15
811	GAGAGAGGAGAGAGAC	49°	18
834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	48°	13
836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	54°	8
840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	50°	9
842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	56°	15
848	CACACACACACACACARG	56°	10
856	ACACACACACACACACYA	48°	12
857	ACACACACACACACACYG	50°	15
888	BDBCACACACACACACA	49°	13
Total			147

Em espécies vegetais, Pepineli et al. (2014) estudaram a seleção de primers para análise de ISSR's na cultivar de *Vitis vinifera* L., popularmente conhecida como uva Itália. Foram testados 15 primers, utilizando-se de 2 ul de DNA purificado, 02 ul de taq polimerase, 0,8 ul de Dntp, 1,6 ul de MgCl₂, 2 ul de solução tampão, e água para completar o volume final de 20 ul. Dentre os primers adotados, os que apresentaram número satisfatório de bandas nítidas (106 no total), foram ISSR – 2, ISSR – 3, ISSR – 5, ISSR – 6, ISSR – 7, ISSR – 8, ISSR – 9, ISSR – 11, ISSR – 12, ISSR – 14, ISSR – 14 e ISSR 15, usando 50 °C de temperatura para ligação dos primers na PCR.

Destaca-se que a etapa de Eletroforese em Gel de Agarose foi realizada de forma eficaz e íntegra, já que quando aplicado o Ladder (sequência de DNA que serve como parâmetro para análise das bandas), tornou-se visível nas imagens obtidas, ao contrário das amostras amplificadas.

Portanto, apesar de vários ensaios de ajustes de condições de incubação serem executados com diferentes primers na tentativa de visualizar bandas de DNA no gel de agarose, não houve anelamento dos fragmentos de DNA com as sequências utilizadas. Vale ressaltar que os marcadores moleculares ISSR, adotados neste trabalho funcionaram bem para outras espécies, como no caso da *M. capixaba*, em que os mesmos primers utilizados apresentaram bandas de DNA nas imagens do gel de agarose. Nesse sentido, não são os primers que não são funcionais, e sim a espécie que não apresentou anelamento com as sequências adotadas. Portanto, o fato dos mesmos primers adotados funcionarem bem para outras espécies e não para a *T. angustula*, leva-nos a inferir sobre a não adaptação dessa espécie para a aplicação das sequências em questão.

6 CONCLUSÃO

A ausência de trabalhos que estudem a análise da variabilidade genética de *T. angustula* com o uso de marcadores moleculares ISSR impossibilitou a obtenção de parâmetros para a execução deste, já que cada espécie responde de forma singular às sequências as quais são submetidas no processo de amplificação do DNA. Através dos estudos encontrados, pode-se observar que alguns dos primers utilizados nas análises, obtiveram bandas visualizadas para outras espécies, tanto vegetais quanto animais, contribuindo como ferramenta para analisar o grau de distanciamento genético entre os indivíduos, e assim, garantir o entendimento da dinâmica dessas populações, contribuindo assim para auxiliar tanto os agricultores para um bom desenvolvimento de suas culturas, quanto às próprias populações, garantindo um número alto de polimorfismos.

Por meio das técnicas laboratoriais executadas, não foram obtidas bandas de DNA visualizadas nas imagens do gel de agarose, o que não tornou possível analisar o grau de diferenciação genética dos indivíduos. Apesar de diferentes primers do marcador ISSR serem testados, nenhum apresentou anelamento com o material genético da espécie estudada.

Nesse sentido, pode-se inferir sobre a funcionalidade do protocolo de extração adaptado para tal, garantindo quantidades adequadas para a realização da PCR, e que os primers utilizados para esta reação, não são adequados para a espécie analisada. Assim, sugere-se a utilização de outros marcadores, como Isoenzimas, RAPD, e microssatélites, e seus respectivos primers, para atingir finalmente o grau de distanciamento genético, e correlacioná-lo com o distanciamento geográfico, assim, apresentando o potencial bioindicador da *T. angustula*, respondendo através desta ferramenta molecular, à fragmentação de habitats e ao reflexo de alterações ambientais.

REFERÊNCIAS

ADAIR, David S. **A mandaçaia: biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de *Melipona quadrifasciata* Lep, (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae).** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1996. 104 p.

ALVES, Davi J. **Polimorfismos de RAPD em populações de *Tetragonisca angustula* L. (Apidae, Meliponinae).** 2006. 45 f. Dissertação (Pós graduação em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

BAITALA, Tatiane V. **Polimorfismo molecular em populações de *Tetragonisca angustula* Latreille (Apidae, Trigonini).** 2005. 52f. Dissertação (Pós graduação em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005a.

BAITALA, Tatiane V.; CANTAGALLI, Liriana B.; RONQUI, Ludimilla; RUIZ, José B; TAKASUSUKI, Maria C. C. ; MANGOLIN, Claudete A.; DE TOLEDO, Vagner A. A. Estrutura genética em populações de *Tetragonisca angustula* fibriebrigi (Hymenoptera, Meliponinae) no noroeste do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., 2005. ÁGUAS DE LINDÓIA – SÃO PAULO. **Anais eletrônicos...** Ribeirão Preto: SBG, 2005b. Disponível em: <http://web2.sbg.org.br/congress/CongressosAnteriores/Pdf_resumos/51/GA77.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2015.

BARROSO, Gustavo. **Variabilidade Genética de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) de duas áreas urbanizadas.** 2012. 105f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

BATISTA, Milson A.; RAMALHO, Mauro; SOARES, Ademilson E.E. Nesting sites and abundance of Meliponini (Hymenoptera: Apidae) in heterogenous habitats of the Atlântic Rain Forest, Bahia, Brazil. **Lundiana**, v.4, n.1, p. 19-23, 2003.

BENZAQUEM, Denise C.; FREITAS, Danival V.; VERAS, Ydrielly T.; BARROS, Waldir G.; SAMPAIO, Paulo de T. Seleção de Primers ISSR para análise genético-populacional em espécies do gênero *Aniba*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 61, 2009. Manaus - Amazonas. **Anais eletrônicos...** São Paulo: SBPC, 2009. Disponível em: <<http://www.sbpnet.org.br/livro/61ra/resumos/resumos/4493.htm>>. Acesso em: 15 dez. 2015.

BIESMEIJER, Jacobus C.; ROBERTS, Stuart P. M.; REEMER, Menno; OHLEMULLER, Ralf; EDWARDS, Mike; PEETERS, Théo M. J.; SCHAFFERS, André P.; POTTS, Simon G.; KLEUKERS, Roy M. J. C.; THOMAS, Chris; SETTELE, Josef; KUNIN, William. **Parallel Declines in Pollinators and Insect-Pollinated Plants in Britain and the Netherlands**, 2006. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/6927929_Parallel_declines_in_pollinators_and_insect-pollinated_plants_in_Britain_and_The_Netherlands>. **Acesso em: 15 dez. 2015.**

BROWN, Christopher. J.; ALBRECHT, Christian. The effect of tropical deforestation on stingless bees of the genus *Melipona* (Insecta: Hymenoptera: Apidae: *Meliponini*) in central Rondonia, **Brazil Journal Biogeography**. (as *Melipona crinita*, geographic record, habitat deforestation, relative abundance), v.28, p.623-634, 2001.

CÂMARA, Fernando P. **Variabilidade e Adaptação: As Bases Genéticas da Teoria Da Evolução**, 2009. Disponível em: <http://www.microbiologia.ufrj.br/documentos/setores/evolucao_e_genetica.doc>. Acesso em: 22 abr. 2015.

CARVALHO, Carlos. A. L. de.; SOUZA, Bruno de A.; SODRÉ, Geni. S.; MARCHINI, Luís. C.; ALVES, Rogério. M. O. **Mel de abelha sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química**. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia /SEAGRI-BA, 2005. Disponível em: <http://www.researchgate.net/profile/Bruno_Souza11/publication/228436975_Mel_de_abelhas_sem_ferro_contribuio_para_a_caracterizao_fisico-quimica/links/53f38cd50cf256ab87b27753.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2015.

CAVIGLIONE, João H.; KIIHL, Laura R. B.; CARAMORI, Paulo H.; OLIVEIRA, Dalziza. **Cartas climáticas do Paraná**. Londrina: IAPAR, 2000.

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

DALL'AGNOL, Miguel; SCHIFINO-WITTMANN, Maria T. Apomixia, genética e melhoramento de plantas. **Revista brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.11, n. 2, p. 127-133, abr. 2005.

DONG, Yuan-Huo.; CHEN, Jin-Ming; ROBERT Gituru W.; WANG, Qing-Feng. Genetic variation in the endangered aquatic fern *Ceratopteris thalictroides* (Parkeriaceae) in China: implications from RAPD e ISSR data. **Botanical Journal of Linnean Society**, v.157, p. 657-671, 2008.

FABIANO, Ezequiel C. **Demografia histórica e contemporânea de guepardos (*Acinonyx jubatus*) na Namíbia, África Austral**, 2013. Disponível em: <file:///C:/Users/Sony/Desktop/TCC%201/Leitura/FABIANO%202013%20-%20GUEPARDO.html> Acesso em: 29 set 2015.

FEIDEN, Armin. **Desenvolvimento da colônia e hábito da abelha Jataí (*Tetragonisca angustula* Latreille) em duas florestas estacionais semidecíduais**. 1994. 103f. Dissertação (Pós Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1994.

FERNANDES-SALOMÃO, Tânia; ROCHA, Rodrigo B.; CAMPOS, Lucio A. O.; ARAÚJO, Eliseu F. The first internal transcribed spacer (ITS-' of *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, *Meliponini*): characterization and phylogenetic analysis. **Insectes Sociaux**, v.52, p.11-18, 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

FERREIRA, Michelli B.; GALBIATI, Carla. **Avaliação do efeito da fragmentação de habitat sobre *Apis mellifera* e abelhas nativas em vegetação de pantanal, Cáceres – mt**, 2008. Disponível em: http://www.unemat.br/eventos/jornada2008/resumos_conic/Simples_00643.pdf. Acesso em: 20 mai. 2015.

FINGER, Luis. F.; CAMPOS, Lúcio. A. de O.; SALOMÃO, Tânia, M.F.; OLIVEIRA, Luis de. **Genética Molecular Aplicada à Conservação**, 2007. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/resumos/claudineiaMR>>. Acesso em 20 abr. 2015.

FREITAS, Geusa S. de; SOARES, Ademilson. E. E. (2004). **Procurando Irá: um passeio ecológico**. Ribeirão Preto: FFCL de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ. **Geografia do Paraná**, 2015. Disponível em: <http://www.geografia.seed.pr.gov.br/modules/galeria/uploads/8/1377635363solos_parana.jpg>. Acesso em 10 jan. 2015.

GUEDES, Fátima B. **Genética da conservação como uma ferramenta para avaliar os problemas populacionais da fragmentação de habitat**. 2004. 43f. monografia (Estágio em Zoologia) – universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

GURGEL, Zafira E. da R. **Aplicabilidade de marcadores microssatélites na análise de resposta de populações de *Tetragonisca angustula* (Apoidea, Hymenoptera) à heterogeneidade de habitats na costa Atlântica**. 2009. 70f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Melhoramento) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

HILSDORF, Alexandre W. S. **Ferramentas Moleculares Aplicadas à Pesca e Aquicultura**, 2011. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/10Recip/palestras/X_ReCIP_p5_14-17.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2015.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Cidades, Paraná**. 2010. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=%20&codmun=410655&search=||info%EFicos:-informa%EF5es-completas>>. Acesso em: 20 de mai. 2015.

IMPERATRIZ-FONSECA, Vera L.; KLEINERT-GIOVANNINI, Astrid; CORTOPASSI-LAURINO, Marilda; RAMALHO, Mauro. Hábitos de coleta de *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Boletim de Zoologia da USP**, v.8, p.115-131, 1984.

IPARDES – INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONOMICO E SOCIAL – **Mesorregiões Geográficas (IBGE) - Paraná**. 2015. Disponível em: <http://www.ipardes.gov.br/pdf/mapas/base_fisica/mesorregioes_geograficas_base_2010.jpg>. Acesso em: 10 jan. 2015

KERR, Estevam W.; CARVALHO, Gislene A.; NASCIMENTO, Vânia A. **A Abelha uruçú: Biologia, Manejo e Conservação**. Belo Horizonte, Acangau, 1996, 144p. Disponível em: <<http://www.abelhasemferrao.com/wp-content/uploads/2013/05/Abelha-Uru%C3%A7u-Warwick-Estevam-Kerr.pdf>>. Acesso em: 15 mai. 2015.

LIBERALI, Lucimara. Sistemas agroflorestais: alternativa de renda para agricultura familiar do município de Corumbataí do Sul, Paraná. **Revista Geomae - Geografia, Meio Ambiente e Ensino**. v.04, n.01, 2013.

LIMA, Liziane M. de. **Conceitos básicos de técnicas em Biologia molecular**. 1 ed. Campina Grande: Embrapa-Algodão, 2008. 28 p.

MACHADO, Edna Lôbo; SILVA, Simone Alves. Desenho e validação de iniciadores microsatélites SSR para mamoneira. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.48, v.11, p. 1457 - 1463 , Nov. 2013

MACHADO, Altair T. **Manejo da Agrobiodiversidade, Direito dos Agricultores e Propriedade Intelectual**, 2008. Disponível em:
<http://www.encontroagroecologia.org.br/files/Manejo_Agrobiodiversidade.rtf>.
Acesso em: 25 abr. 2015.

MARQUES, Edmundo k.; **Diagnóstico genético-molecular**. Canoas: ULBRA, 2003. 372 p.

MICHENER, Charles. D. **The bees of the World**. 2 ed. London: The Johns Hopkins University Press, 2007. 953p.

MIORIN, Patrícia L.; LEVY JUNIOR, NORTON C.; CUSTODIO, Angela R.; BRETZ Walter A.; MARCUCCI, Maria C.; Antibacterial activity of honey and própolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.913-920, 2003.

MORGADO, Leila. N.; CARVALHO, César. F.; SOUZA, Brígida.; SANTANA Márcia. P. Fauna de Abelhas (HYMENOPTERA: APOIDEA) nas Flores de Girassol *Helianthus annuus* L. em Lavras – MG. **Ciência e agrotecnologia**, n.26, p.1167 - 1177, 2002.

MOUTOU, Katerina. A.; MAMURIS, Zissis.; FIRME, Tania.; KONTOU, Maria.; SARAFIDOU, Theologia.; STOUMBOUDI, Maria. T. **Patterns of variability at the major histocompatibility class I and class II loci in populations of the endangered cyprinid *Ladigesocypris ghigii***. **Conservation Genetics**, 2011.
Disponível em:
<http://www.researchgate.net/profile/Zissis_Mamuris2/publication/225766082_Patterns_of_variability_at_the_major_histocompatibility_class_I_and_class_II_loci_in_populations_of_the_endangered_cyprinid_Ladigesocypris_ghigii/links/0c960538277cdc407a000000.pdf>. Acesso em: 10 mai. 2015.

NAKASUGUI Lilian F.; TAKASUSUKI Maria C. C. R.; FALCO José R. P. **Avaliação das abelhas jataí (hymenoptera; trigonini) como bioindicadores após contaminação com organofosforados**, 2011. Disponível em:
<<http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/resumos/resumos/5716.htm>>. Acesso em: 20 mai. 2015.

NASCIMENTO, Mário A. **Variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) no Estado de Minas Gerais com marcadores ISSR**, 43f. Dissertação (Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

NOGUEIRA, Juliano. **Variabilidade Genética de *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994 (Hymenoptera: Apidae), Espécie Ameaçada De Extinção: Subsídios Para Sua Conservação**, 2009. 66f. Tese (Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa , 2009.

NOGUEIRA-NETO, Paulo. **Ainda a questão da variabilidade genética e ecológica das pequenas populações e dos fragmentos florestais**. Encontro sobre Abelhas, Ribeirão Preto, 2002. Anais. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2002, p. 15-17.

NOGUEIRA-NETO, Paulo. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**. São Paulo, Ed. Nogueirapis. 446 p, 1997.

ONOFRE, Gisele R. **Campo Mourão: Colonização, uso do solo e impactos Sócioambientais**, 2005. 206f. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.

PAMILO, Pekka; VARVIO- AHO, Sirkka L.; PEKKARINEN, Antti. **Low enzyme gene variability in Hymenoptera as a consequence of haplodiploidy**, 1978 Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-5223.1978.tb01607.x/pdf>>. Acesso em: 05 out. 2015.

PEPINELI, Afonso C.; STRIOTO, Danuza K.; MARINELLI, Giovana C.; MANGOLIN, Claudete A.; MACHADO, Maria de Fátima P. da. S. Seleção de Primers para Análise de *Inter Simple Sequence Repeats* na cultivar de 'itália' de *Vitis vinífera* L. 2014. **Revista Ciência e Técnica Vitivinícola**, v.29, n.2, ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ctv-jve-journal.org/articles/ctv/pdf/2014/02/ctv20142902p81.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2015.

PESSOA DA SILVA, Kaliny V.; ALVES Alfredo A. C.; MARTINS, Maria I. G.; MELO, Cláudio A. F de.; CARVALHO, Reginaldo de. **Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR**, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2011000900016&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 15 jul. 2015.

PESSOA, Seyla P. M.; MORAES, Juliana Q.; SILVA, Celice A. Apomixia facultativa em *Smilax fluminensis* Steud. (Smilacaceae), espécie dióica de fragmentos florestais, centro oeste do Brasil. **Revista árvore**, vol.37., n.6, Nov. 2013. Disponível em: <C:\Users\Sony\Desktop\TCC 1\Leitura\pessoa, moraes e silva 2013.html>. Acesso em 15 dez. 2015.

PHILOMENO, Fábio; PONTARA, Lucimar P. M.; TAKASUSUKI, Maria C.C.R ; POVH, Jayme A.; MANGOLIN, Claudete. A.; Moreira, Heden L.M; CANALLI, Junior L.C. **Avaliação de dois protocolos para extração de DNA genômico de abelhas *Apis mellifera* Africanizada, 2004.** Disponível em: <www.serapis.com.br/site/.../bio_eco_aval_doi_s_extr_dna_abel_afric.pdf>. Acesso em 20 set. 2015.

RIBEIRO, Aline B. **Amplificação heteróloga e diversidade genética em *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) e *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz, 1938).** 2011. 57f. Dissertação (Pós graduação em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

RODERJAN, C. V.; GALVÃO, Franklin.; KUNIYOSHI, Yoshiko. S.; HATSCHBACK, Gerdt. **As unidades fitogeográficas do Estado do Paraná. *Ciência e Ambiente, Santa Maria***, v. 24, p. 75-92, jan./jun, 2002.

RODRIGUES, Jucelene F. **Delimitação de Espécies e Diversidade Genética no Complexo *Cattleya Coccínea* Lindl. e *C. Mantiqueirae* (Flowie) Van Der Berg (Orchidaceae) Baseada em Marcadores Moleculares ISSR.** 2010. Dissertação de Mestrado, 81f. ESALQ/USP. Piracicaba, 2010.

RUIZ, Juliana B. **Análise Genética de Populações em *Tetragonisca angustula* na região Noroeste do Paraná por meio de Isoenzimas.** 2006. 64f. Dissertação (Pós graduação em Genética e melhoramento) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

SANTIAGO, Leandro R. Variabilidade Genética de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, *Meliponini*) de meliponários. 2013. 131f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SANTOS, Fabrício R.; GUIMARAES, Pedro E.M.; REDONDO, Rodrigo A. F. **Bancos de DNA: coleções estratégicas para estudos da biodiversidade,** 2002. Disponível em: <http://labs.icb.ufmg.br/lbem/pdf/bancodedna.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2015.

SCHALL, Barbara A.; LEVERICH, Wesley J. **Molecular variation and isolated plant populations**, 1996. Disponível em:

<file:///C:/Users/Sony/Desktop/TCC%201/Leitura/SCHALL%20E%20LEVERICH.htm
>. Acesso em: 15 dez. 2015.

SEOANE, C.; KAGEYAMA, Paulo Y.; RIBEIRO, André; MATIAS, Renato; REIS, Maurício S.; BAWA, Kamal; SEBBENN, Alexandre M. Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart. **Revista do Instituto Florestal**, v.5, n.5, p. 25 - 43. 2005.

SGARIGLIA, Melina A.; VATTUONE, Marta A.; SAMPIETRO, María M.V.; SOBERÓN, José R.; SAMPIETRO, Diego A. Properties of honey from *Tetragonisca angustula fiebrigi* and *Plebeia wittmanni* of Argentina. **Apidologie**, v.41, p. 667-675, 2010.

SHOUHANI, Hossein; DOUSTI, Aboufazel; RADJABI, Rouhollah; ZAREI, Mojtaba. Application of ISSR to study the genetic diversity of honeybee (*Apis mellifera* L.) populations in some areas of Iran. 2014. **Journal of BioScience and Biotechnology**, v.29, n.2, mar. 2014. Disponível em: < [http://www.jbb.uniplovdiv.bg/documents/27807/352486/jbb_2014-3\(2\)-pages_127-131.pdf](http://www.jbb.uniplovdiv.bg/documents/27807/352486/jbb_2014-3(2)-pages_127-131.pdf)>. Acesso em: 02 dez 2015.

SILVEIRA, Fernando A.; MELO, Gabriel A.R.; ALMEIDA, Eduardo A.B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte, Edição do autor. 2002. 253 p.

STRALIOTTO, Rosângela. **Aplicação e Evolução dos Métodos Moleculares no Estudo da Biodiversidade do Rizóbio**, 2006. Disponível em:

<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/biotacap11ID-Ym45o3LWOj.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2015.

STUCHI, Ana L.P.B.; TAKASUSUKI, Maria C.C.R.; TOLEDO, Vagner. de. A. Análise da genética de populações em abelhas jataí (*tetragonisca angustula latreille*) por meio de isoenzimas. **Revista Magistra**, v.20, n.1, p.68-77, Cruz das Almas-BA, jan./mar., 2008.

TIKUNOV, Yuri M.; KHRUSTALEVA Ludmila I.; KARLOV Gennady L. Application of ISSR Markers in the Genus *Lycopersicon*. **Euphytica**, v.131, p.71–80, 2003.

VIEIRA, Daniel P. **Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações**, 2006. Disponível em: < <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAjM8AE/tecnicas-pcr>>. Acesso em: 29 set. 2015.

WILLIAMS, Phillipa. **The Conservation of the Przewalski's Horse**, 2010. Disponível em: <<http://www.infertile.com/conservation-przewalskis-horse/>>. Acesso em: 15 dez. 2015.

ZIETKIEWICZ, Ewa; RAFALSKI, Antoni; LABUDA, Damian .**Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification**, 1994 Disponível em: <<http://www.lib.ctgu.edu.cn:8080/wxcd/qw/6.pdf>> Acesso em: 05 out. 2015.

ANEXO – PROTOCOLOS DE PCR ADAPTADOS DE NOGUEIRA (2009) QUE FORAM TESTADOS NO PRESENTE TRABALHO

INCUBAÇÃO	
°C	tempo
94	1.5 min
94	45 seg
°C anel.	45 seg
72	1.5 min
72	5 min
ciclos	40

DIA 15/10/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
1	5p1	ISSR13	2	6	0,2	2,5	2,5	0,75	11,05	25	48°C
2	6p1	ISSR13	2	6	0,2	2,5	2,5	0,75	11,05	25	48°C
3	7p1	ISSR13	2	6	0,2	2,5	2,5	0,75	11,05	25	48°C
N	controle negativo	ISSR13	0	6	0,2	2,5	2,5	0,75	11,05	25	48°C
4	5p1	ISSR13	2	6	0,2	2,5	2,5	0,75	11,05	25	48°C
5	5p1	ISSR13	2	6	0,2	2,5	2,5	0,75	11,05	25	48°C
6	5p1	ISSR13	2	6	0,2	2,5	2,5	0,75	11,05	25	48°C
7	5p1	ISSR13	2	6	0,2	2,5	2,5	0,75	11,05	25	48°C
DIA 19/10/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
8	5p1	ISSR13	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	45,5°C
9	5p1	ISSR13	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	49°C
10	5p1	ISSR13	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	53,8°C
11	5p1	ISSR13	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	58,6°C
12	5p1	ISSR13	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	63°C
13	5p1	ISSR13	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	65°C
DIA 21/10/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
14	5p1	ISSR13	8	6	0,2	2,5	2,5	0,75	5,05	25	45,5°C
15	5p1	ISSR13	8	6	0,2	2,5	2,5	0,75	5,05	25	49°C
16	5p1	ISSR13	8	6	0,2	2,5	2,5	0,75	5,05	25	53,8°C
17	5p1	ISSR13	8	6	0,2	2,5	2,5	0,75	5,05	25	58,6°C
18	5p1	ISSR13	8	6	0,2	2,5	2,5	0,75	5,05	25	63°C
19	5p1	ISSR13	8	6	0,2	2,5	2,5	0,75	5,05	25	65°C
DIA 22/10/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
20	8p1	ISSR13	8	3	0,2	2,5	2,5	1	9,3	26,5	42,2°C
21	8p1	ISSR13	8	3	0,2	2,5	2,5	1	9,3	26,5	46,8°C
22	8p1	ISSR13	8	3	0,2	2,5	2,5	1	9,3	26,5	52,2°C
23	8p1	ISSR13	8	3	0,2	2,5	2,5	1	9,3	26,5	57,7°C
24	8p1	ISSR13	8	3	0,2	2,5	2,5	1	9,3	26,5	62,7°C
25	8p1	ISSR13	8	3	0,2	2,5	2,5	1	9,3	26,5	65°C
DIA 26/10/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
26	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	42,2°C
27	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	46,8°C
28	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	52,2°C
29	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	57,7°C
30	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	62,7°C
31	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	65°C
DIA 26/10/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
32	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	42,2°C
33	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	46,8°C
34	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	52,2°C
35	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	57,7°C
36	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	62,7°C
37	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	65°C

DIA 04/11/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
38	6p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	45°C
39	6p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	47°C
40	6p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	53,8°C
41	6p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	58,6°C
42	6p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	63°C
DIA 05/11/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
43	7p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	45°C
44	7p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	47°C
45	7p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	53,8°C
46	7p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	58,6°C
47	7p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	63°C
DIA 06/11/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
48	8p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	45°C
49	8p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	47°C
50	8p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	53,8°C
51	8p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	58,6°C
52	8p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	63°C
DIA 09/11/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
53	9p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	45°C
54	9p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	47°C
55	9p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	53,8°C
56	9p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	58,6°C
57	9p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	63°C
DIA 10/11/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
58	10p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	45°C
59	10p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	47°C
60	10p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	53,8°C
61	10p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	58,6°C
62	10p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	63°C
DIA 11/11/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
1	P1	ISSR13	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	52,8°C
2	P2	ISSR13	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	52,8°C
3	P3	ISSR13	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	52,8°C
				18	0,6	7,5	7,5	2,25	27,15	75	52,8°C
DIA 17/11/2015 - TAMPÃO COM TRIS-HCL											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
4	P1	827	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	47°C
5	P2	827	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	47°C
6	P3	827	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	47°C
DIA 18/11/2015 - TAMPÃO COM TRIS-HCL											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
7	P1	827	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	45°C
8	P1	827	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	47°C
9	P1	827	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	50,6°C
10	P1	827	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	54°C
11	P1	827	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	55°C
DIA 19/11/2015 - TAMPÃO COM TRIS-HCL											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
12	P1	Terry	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	45°C
13	P1	Terry	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	46,4°C
14	P1	Terry	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	48,9°C
15	P1	Terry	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	50,6°C
16	P1	Terry	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	52°C
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
14	5p1	ISSR13	8	6	0,2	2,5	2,5	0,75	5,05	25	45,5°C
15	5p1	ISSR13	8	6	0,2	2,5	2,5	0,75	5,05	25	49°C
16	5p1	ISSR13	8	6	0,2	2,5	2,5	0,75	5,05	25	53,8°C
17	5p1	ISSR13	8	6	0,2	2,5	2,5	0,75	5,05	25	58,6°C
18	5p1	ISSR13	8	6	0,2	2,5	2,5	0,75	5,05	25	63°C
19	5p1	ISSR13	8	6	0,2	2,5	2,5	0,75	5,05	25	65°C
DIA 22/10/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
20	8p1	ISSR13	8	3	0,2	2,5	2,5	1	9,3	26,5	42,2°C
21	8p1	ISSR13	8	3	0,2	2,5	2,5	1	9,3	26,5	46,8°C
22	8p1	ISSR13	8	3	0,2	2,5	2,5	1	9,3	26,5	52,2°C
23	8p1	ISSR13	8	3	0,2	2,5	2,5	1	9,3	26,5	57,7°C
24	8p1	ISSR13	8	3	0,2	2,5	2,5	1	9,3	26,5	62,7°C
25	8p1	ISSR13	8	3	0,2	2,5	2,5	1	9,3	26,5	65°C

DIA 26/10/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
26	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	42,2°C
27	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	46,8°C
28	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	52,2°C
29	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	57,7°C
30	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	62,7°C
31	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	65°C
DIA 26/10/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
32	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	42,2°C
33	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	46,8°C
34	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	52,2°C
35	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	57,7°C
36	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	62,7°C
37	8p1	ISSR13	2	1,5	0,2	2,5	2,5	1	15,3	25	65°C
DIA 04/11/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
38	6p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	45°C
39	6p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	47°C
40	6p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	53,8°C
41	6p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	58,6°C
42	6p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	63°C
DIA 05/11/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
43	7p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	45°C
44	7p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	47°C
45	7p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	53,8°C
46	7p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	58,6°C
47	7p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	63°C
DIA 06/11/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
48	8p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	45°C
49	8p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	47°C
50	8p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	53,8°C
51	8p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	58,6°C
52	8p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	63°C
DIA 09/11/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
53	9p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	45°C
54	9p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	47°C
55	9p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	53,8°C
56	9p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	58,6°C
57	9p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	63°C
DIA 10/11/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
58	10p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	45°C
59	10p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	47°C
60	10p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	53,8°C
61	10p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	58,6°C
62	10p1	ISSR13	4	1,5	0,2	2,5	2,5	1	13,3	25	63°C
DIA 11/11/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
1	P1	ISSR13	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	52,8°C
2	P2	ISSR13	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	52,8°C
3	P3	ISSR13	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	52,8°C
				18	0,6	7,5	7,5	2,25	27,15	75	52,8°C
DIA 17/11/2015 - TAMPÃO COM TRIS-HCL											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
4	P1	827	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	47°C
5	P2	827	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	47°C
6	P3	827	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	47°C
DIA 18/11/2015 - TAMPÃO COM TRIS-HCL											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
7	P1	827	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	45°C
8	P1	827	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	47°C
9	P1	827	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	50,6°C
10	P1	827	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	54°C
11	P1	827	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	55°C
DIA 19/11/2015 - TAMPÃO COM TRIS-HCL											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
12	P1	Terry	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	45°C
13	P1	Terry	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	46,4°C
14	P1	Terry	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	48,9°C
15	P1	Terry	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	50,6°C
16	P1	Terry	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	52°C

DIA 20/11/2015 - TAMPÃO COM TRIS-HCL											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
17	P1	866	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	41°C
18	P1	866	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	46,4°C
19	P1	866	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	48,9°C
20	P1	866	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	50,6°C
21	P1	866	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	52°C
DIA 23/11/2015 - TAMPÃO COM TRIS-HCL											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
22	P1	890	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	41°C
23	P1	890	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	46,4°C
24	P1	890	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	48,9°C
25	P1	890	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	50,6°C
26	P1	890	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	52°C
DIA 24/11/2015 - TAMPÃO COM TRIS-HCL											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
27	P1	836	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	42°C
28	P1	836	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	44°C
29	P1	836	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	46,4°C
30	P1	836	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	50°C
31	P1	836	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	52°C
DIA 25/11/2015 - TAMPÃO COM TRIS-HCL											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
32	P1	C	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	42°
33	P1	C	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	44°
34	P1	C	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	46,4°
35	P1	C	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	50°
36	P1	C	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	52°
DIA 26/11/2015 - TAMPÃO COM TRIS-HCL											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
37	P2	808	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	42°
38	P2	808	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	44°
39	P2	808	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	46,4°
40	P2	808	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	50°
41	P2	808	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	52°
DIA 01/12/2015 - TAMPÃO COM TRIS-HCL											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
42	P2	807	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	42°
43	P2	807	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	44°
44	P2	807	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	46,4°
45	P2	807	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	50°
46	P2	807	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	52°
DIA 02/12/2015 - TAMPÃO COM TRIS-HCL											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
47	P2	841	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	42°
48	P2	841	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	44°
49	P2	841	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	46,4°
50	P2	841	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	50°
51	P2	841	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	52°
DIA 04/12/2015											
ID	INDIVÍDUO	primer	DNA 10ng	primer 5pmoles	Polimerase Taq	Buffer 10x	dNTP 100mM	MgCl 50mM	ddH2O	soma	°C anel.
52	P2	815	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	42°
53	P2	815	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	44°
54	P2	815	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	46,4°
55	P2	815	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	50°
56	P2	815	4	6	0,2	2,5	2,5	0,75	9,05	25	52°