

REJANE BEZERRA DA SILVA

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Melipona quadrifasciata*
(HYMENOPTERA: APIDAE, MELIPONINA) NO ESTADO DE
MINAS GERAIS – BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586v
2007

Silva, Rejane Bezerra da, 1972-
Variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata*
(Hymenoptera : Apidae, Meliponina - Brasil) no Estado de
Minas Gerais / Rejane Bezerra da Silva. – Viçosa, MG,
2007.

x, 41f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Mara Garcia Tavares.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 32-41.

1. Abelha - Genética. 2. Abelha - Distribuição
geográfica. 3. Marcadores genéticos.
4. *Melipona quadrifasciata*. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 595.79913

REJANE BEZERRA DA SILVA

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Melipona quadrifasciata*
(HYMENOPTERA: APIDAE, MELIPONINA) NO ESTADO DE
MINAS GERAIS – BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2007

**Prof. Lúcio Antônio de Oliveira Campos
(Co-Orientador)**

**Prof.^a Tânia Maria F. Salomão
(Co-Orientadora)**

Prof.^a. Ana Maria Waldschmidt

Prof. Luiz Antônio dos Santos Dias

**Prof.^a. Mara Garcia Tavares
(Orientadora)**

“Os fracos julgam e desistem, enquanto os fortes compreendem e têm esperança.

Não somos perfeitos. Decepções, frustrações e perdas sempre acontecerão.

Mas Deus é o artesão do espírito e da alma humana. Não há o que temer.

Depois da mais longa noite, surgirá o mais belo amanhecer.”

(Augusto Cury)

A Deus dedico este trabalho!

SERÁ QUE VALE A PENA?

Esta foi a frase da semana. Dos últimos dias e dos dias que virão.
Entre nossos encontros, soa agora a despedida.
Primeiro encontro, um desconhecido.
Conquista. Novos amigos. Novos horizontes.
Novo despertar no amanhecer de nossas vidas.
Daqui para frente. Um gosto de despedida. Gosto na boca, à saliva da vida.

Chegamos cá, vislumbrado com o que estava por vir.
Será que vale a pena?
Inicialmente, sem dúvidas. Vale tudo. Serei eu. Farei. Conquistarei. Serei o melhor. Darei o melhor de mim. É o que eu quero. É o que eu posso fazer por mim.

Será que vale a pena?
O que antes não existia. Agora há dúvidas.
Dúvida do que está por vir. Dúvida da nova conquista.
Não era o que estimava ser o incontestável? O desejável?
Agora há dúvidas?

Será que vale a pena?
Noites longas, mal dormidas. Sonhos. Pesadelos. Sopas de letras. Letras cá, letras lá. Dores de cabeça... de barriga... nas pernas... nos ombros... no peito... no corpo.
Será que vale a pena?

Nós compramos em espécie ou não. Neste caso... é o preço do que se quis.
Pagamos pelo o que se quer deste ponto em diante.
O passo maior será dado agora.
Fui o que pude ser. Fiz. Conquistei. Tentei ser o melhor. Dei o melhor de mim.
Valeu tudo. É o que eu pude fazer por mim.
Será que vale a pena?

Tenho o gosto da saliva da vida. Gosto de despedida. Gosto da saudade.
Saudades das noites longas... das risadas... dos choros... das dores... dos
meus amigos que deixarei no cercado do meu coração.

Latifúndio da saudade.

Será que vale a pena?

Ainda há dúvidas?

O gosto de despedida impregnado nos lábios, na língua, na boca.

A saudade nascente aperta meu peito, rasga minhas entranhas.

Sentirei saudades dos meus amigos.

Valeu a pena.

Maria Ignêz Castrillon

Agradecimentos

A Deus, a razão da minha existência. Obrigado meu Senhor pela oportunidade de realizar mais um sonho.

À Professora Mara Garcia por todos os ensinamentos, compreensão, amizade e, sobretudo, pela confiança que depositou em mim.

Ao Professor Lúcio pelos conselhos, apoio e carinho.

À Professora Ana Maria por todas as sugestões, incentivo e amizade.

À Professora Tânia por suas palavras de confiança.

Ao Professor Luiz Antônio, pela disponibilidade, paciência e ajuda com as análises estatísticas.

Ao Professor Fabiano R. de Melo da Universidade Federal Goiás, pela ajuda com a identificação dos fragmentos.

À Universidade Federal de Viçosa e todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade e apoio para a realização desse trabalho.

Aos colegas de Laboratório, Filipe, Camila, Daniela, Helder, Denilce, Marcília, Jefferson, Gustavo, Fábila, Moteiro e Bering, pela amizade e ajuda, em especial a Andréia e ao Henrique, que muito contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos funcionários do apiário da Universidade Federal de Viçosa Íris e Geraldo, que foram muito importantes na coleta das abelhas.

À Secretaria de Educação do Estado de Alagoas pelo apoio e concessão dos meus vencimentos.

Ao Município de São Sebastião, em especial, ao Prefeito José Pacheco, ao Secretário de Educação Luiz Carlos, sua irmã, Leoneide Marta e ao Puscas, do Departamento de Recursos Humanos, por todo apoio e incentivo financeiro. E a todos em Alagoas que torceram por mim.

Aos amigos que fiz em Viçosa, Reggiane, Max, Sirlene, Edson, Patrizia, Sirlei, Marcília, Mônica, Gláucia, Gisele, Michele e Ana Lúcia, por todos os momentos de descontração, alegria e apoio. Um agradecimento especial às amigas Ignêz e Dinha, por terem estado presentes em todos os momentos, bons e ruins, durante esses dois anos. Obrigada por toda ajuda, carinho e amizade. A Cláudia, pela amizade verdadeira desde a graduação.

Aos meus pais Elias e Maria e aos meus irmãos, pelo apoio, carinho e incentivo. Em especial a minha irmã Rosilene, que sempre arranjava um tempinho para resolver as coisas por mim em Alagoas.

BIOGRAFIA

Rejane Bezerra da Silva, filha de Elias José da Silva e Maria Bezerra da Silva, nasceu em Arapiraca, Alagoas, Brasil, em 21 de janeiro de 1972.

Em março de 1998, graduou-se em Ciências Biológicas, Licenciatura, pela Universidade Estadual de Alagoas (UNEAL), antiga FUNESA, Arapiraca – AL, Brasil. Em 1999, iniciou a atividade de docência, como professora efetiva do Ensino Fundamental, pela Prefeitura de São Sebastião – AL. Em 2001, passou a fazer parte do quadro de professores efetivos do Ensino Médio da Secretaria de Educação do Estado de Alagoas, onde leciona a disciplina de Biologia.

Em 2005, iniciou o curso de Mestrado em Biologia Celular e estrutural, na Universidade Federal de Viçosa – MG, Brasil, defendendo dissertação em fevereiro de 2007.

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1. Importância e caracterização das abelhas sem ferrão.....	1
I.2. Meliponíneos X Fragmentação florestal.....	2
I.3. Marcadores moleculares microssatélites	6
II. OBJETIVOS.....	11
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
III.1. Material genético.....	12
III.2. Extração de DNA genômico.....	14
III.3. Amplificação das regiões microssatélites.....	14
III.4. Visualização dos produtos PCR.....	15
III.5. Análises estatísticas.....	15
IV. RESULTADOS.....	17
V. DISCUSSÃO.....	25
VI. CONCLUSÕES GERAIS.....	31
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

RESUMO

SILVA, Rejane Bezerra, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007. **Variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) no Estado de Minas Gerais – Brasil.** Orientadora: Mara Garcia Tavares. Co-orientadores: Lúcio Antônio de Oliveira Campos e Tânia Maria Fernandes Salomão.

A espécie *Melipona quadrifasciata* Lep. (mandaçaia) é uma abelha sem ferrão que se distribui ao longo da costa brasileira, desde a Paraíba até o Rio Grande do Sul. Esta espécie, juntamente com outras espécies de meliponíneos, apresenta um importante papel na polinização das árvores nativas do Brasil. Entretanto, tem sido observado que muitas espécies de meliponíneos têm sofrido uma grande redução populacional causada, principalmente, pela fragmentação ambiental. Com o objetivo de verificar como a fragmentação florestal afeta a variabilidade genética de algumas colônias de *Melipona quadrifasciata* foram analisados doze locos microssatélites em 22 colônias coletadas em diversos fragmentos do estado de Minas Gerais. Os resultados obtidos demonstraram uma baixa variabilidade genética ($P=16,67\%$) entre as colônias analisadas. Dos doze locos microssatélites analisados, apenas dois foram polimórficos. O valor médio da heterozigosidade observada foi de 0,046. Não foi possível verificar uma relação entre o tamanho dos fragmentos amostrados e a variabilidade genética (número de alelos detectados) das diferentes colônias. A distância genética média entre as colônias foi de 0,05. Não foi possível agrupar as colônias de acordo com a localidade de origem das mesmas. Houve apenas a formação de dois grupos, cada qual contendo colônias de diferentes localidades. Assim, análises futuras, envolvendo um maior número de colônias bem como “primers” microssatélites específicos para *M. quadrifasciata*, deverão ser realizadas para verificar como a fragmentação ambiental afeta a variabilidade genética desta espécie.

ABSTRACT

SILVA, Rejane Bezerra, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2007. **Genetic variability of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) in the State of Minas Gerais - Brazil.** Adviser: Mara Garcia Tavares. Co-advisers: Lúcio Antônio de Oliveira Campos and Tânia Maria Fernandes Salomão.

The stingless bee *Melipona quadrifasciata* Lep. (mandaçaia) is distributed along the Brazilian coast, from Paraíba to Rio Grande do Sul. This species presents an important role in the pollination of the Brazilian native trees. However, many stingless bee species are being drastically reduced due to deforestation. Thus, in order to verify how deforestation affects the genetic variability of *M. quadrifasciata*, 22 colonies collected in several fragments of Minas Gerais state were analyzed with twelve microsatellite loci. Results demonstrated a low genetic variability ($P=16,67\%$) in the analyzed colonies. Only two, out of the twelve loci analyzed were polymorphic. The mean observed heterozygosity was of 0,046. It was not possible to verify a relationship between the size of the fragments sampled and the genetic variability (number of detected alleles) of different colonies. The mean genetic distance among the colonies was of 0.05. Although it was not possible to group colonies according to their geographic origin, colonies clustered into two groups, each one containing colonies of different localities. Thus, future analyses involving a larger number of colonies as well as microsatellite "primers" specific for *M. quadrifasciata*, should be necessary to demonstrate how deforestation affects the genetic variability of this species.

I. INTRODUÇÃO

I.1. Importância e caracterização das abelhas sem ferrão

Segundo Kerr et al. (2001), um terço da produção mundial de alimento depende da visita de animais às flores, sendo que 38% da polinização das plantas floríferas é realizada pelas abelhas.

As abelhas são os agentes polinizadores mais adaptados à visita das flores das angiospermas. Essa relação baseia-se em um sistema de dependência recíproca, onde as plantas fornecem o alimento para as abelhas, principalmente pólen e néctar, e em troca recebem os benefícios da transferência de pólen (Kevan e Baker, 1983; Proctor et al., 1996).

Entretanto, a importância das abelhas para as plantas vai além da transferência de pólen de uma flor para outra, pois, por serem vetores muito ativos, elas promovem o cruzamento entre plantas que estão separadas por grandes distâncias, assegurando a manutenção do ciclo de reprodução sexuada das plantas e, conseqüentemente, a disponibilidade de alimento para outros animais. Assim, a extinção de uma espécie de abelha poderá levar a extinção de uma ou mais espécies de plantas por ela polinizadas, bem como de animais que dependem dessas plantas para se alimentarem (Campos, 1998).

As abelhas indígenas sem ferrão são reconhecidas como o principal grupo de polinizadores, das árvores nativas, no Brasil. Essas abelhas pertencem à família Apidae e a subtribo Meliponina (Silveira et al., 2002) e, por apresentarem o ferrão atrofiado, são incapazes de ferroar (Kerr e Lelo, 1962). Esta subtribo compreende 55 gêneros e mais de 340 espécies, as quais se distribuem nas regiões tropicais do mundo, assim como nas regiões subtropicais da América do Sul, América Central, África Índia, Malásia e Austrália (Camargo e Pedro, 1992). No Brasil, o gênero *Melipona* apresenta grande número de espécies e apresenta grande diversificação na bacia amazônica (Silveira et al., 2002).

Melipona quadrifasciata Lep. (mandaçaia) distribuí-se ao longo da costa brasileira, desde a Paraíba até o Rio Grande do Sul (Moure e Kerr, 1950),

sendo conhecidas duas subespécies: *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. e *M. quadrifasciata quadrifasciata* Lep.

Melipona quadrifasciata anthidioides apresenta bandas terciais amarelas interrompidas em operárias e machos, enquanto que em *M. quadrifasciata quadrifasciata* essas bandas são contínuas. A primeira é uma subespécie de regiões com temperaturas mais elevadas (Melo e Campos, 1987), sendo encontrada em Minas Gerais e Rio de Janeiro. Já a subespécie *M. quadrifasciata quadrifasciata* ocorre principalmente em regiões de altitudes mais elevadas e frias, como Sul de São Paulo, Paraná e Santa Catarina e Rio Grande do Sul. No entanto, já foi verificado na região norte do estado de Minas Gerais, habitando regiões baixas e quentes, populações de *M. quadrifasciata* com um padrão de bandas igual ao de *M. quadrifasciata quadrifasciata* (Melo e Campos, 1987).

Alguns trabalhos têm sido realizados com o objetivo de detectar diferenças moleculares entre as subespécies de *M. quadrifasciata* Lep. Waldschmidt et al. (2000), por exemplo, utilizando PCR-RAPD, encontraram um marcador de DNA que estava presente em *M. q. quadrifasciata* e ausente em *M. q. anthidioides*. Entretanto, esse marcador estava ausente em indivíduos coletados no norte do Estado de Minas Gerais, os quais apresentavam um padrão de bandas similar ao de *M. q. quadrifasciata*. Moretto e Arias (2005), utilizando RFLP, identificaram três enzimas com padrões de restrição diferentes, no DNA mitocondrial, entre as duas subespécies. Estes resultados demonstram a importância de estudos moleculares para confirmar o status taxonômico dessas subespécies.

I.2 Meliponíneos X Fragmentação florestal

Apesar de sua importância ecológica, muitas espécies de meliponíneos têm tido seu número grandemente reduzido. A destruição dos ambientes naturais é apontada como a principal causa dessa redução populacional. Sendo um grupo isolado e muito especializado, esses insetos dependem das características climáticas e florísticas de suas regiões de origem. Dentre os fatores que contribuem para a destruição ambiental

destacam-se os desmatamentos, uso indiscriminado de agrotóxicos e a ação predatória de meleiros, que derrubam árvores para coletar o mel e abandonam o ninho no chão (Kerr et al., 1999).

Os desmatamentos isolam áreas que pertenciam anteriormente a ecossistemas contínuos, formando ilhas florestais. A diminuição de áreas de florestas, em geral, resulta na redução do tamanho das populações que vivem e dependem desses habitats. A intensidade desses efeitos está relacionada, principalmente, ao tamanho dos fragmentos remanescentes, a distância entre eles e as condições em que se encontravam quando isolados (Viana e Melo, 1987).

Segundo Aidar (1996), os desmatamentos, que ocorrem principalmente com a expansão da pecuária, exploração de madeira, carvão e as queimadas indiscriminadas, além de eliminar várias espécies vegetais, ocasiona a redução da diversidade de insetos, promovendo um rápido decréscimo na disponibilidade de recursos naturais. O que afeta em particular os meliponíneos, que utilizam os ocos de árvores para nidificarem.

No estado de Minas Gerais, as populações de abelhas têm sido intensamente afetadas pelos desmatamentos. Algumas formações vegetais do estado foram drasticamente reduzidas, como é o caso da mata Atlântica. Os fragmentos remanescentes, geralmente, muito pequenos, não apresentam condições de suportar um grande número de espécies com alto número populacional (Viana e Melo, 1987).

Esta estratificação e descontinuidade da mata têm como conseqüências, dentre outras, o extermínio de colônias de meliponíneos e a diminuição do fluxo gênico entre colônias de diferentes regiões. Esta diminuição no fluxo gênico ocorre porque às distâncias que separam estas colônias umas das outras impedem a migração de machos e rainhas virgens para acasalamento (Aidar, 1996).

Brown e Albrecht (2001) investigaram a quantidade de espécies abelhas do gênero *Melipona* em áreas com variados graus de desmatamentos na Amazônia, sugerindo que estas abelhas podem ser utilizadas como bioindicadores. Esta alta sensibilidade é devida, entre outros fatores, a presença de um abdômen desenvolvido nas rainhas fisogástricas,

o que as impossibilita de voar. Assim, as colônias não conseguem fugir de áreas com alguma perturbação, como desmatamentos ou queimadas.

Silveira et al. (2002) citam que muitas espécies de *Melipona* dependem das condições ambientais locais para sua sobrevivência. De acordo com esses autores, *M. bicolor*, *M. marginata*, *M. quadrifasciata* e *M. rufiventris*, que eram amplamente distribuídas na extensa região coberta pela mata Atlântica, atualmente, têm sua ocorrência limitada aos fragmentos remanescentes desta mata, localizados na extensa faixa situada entre a cadeia do Espinhaço e os estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia. Dessas espécies, *M. marginata* e *M. rufiventris*, parecem ser as mais exigentes com relação ao tamanho e/ou qualidade desses fragmentos, não ocorrendo a não ser nos maiores, mais antigos e menos perturbados. *M. marginata*, registrada na cidade de Belo Horizonte no início do século 20, parece estar completamente extinta nos remanescentes florestais do município e regiões limítrofes, embora nestas mesmas áreas ainda sejam encontradas *M. bicolor* e *M. quadrifasciata*, com relativa frequência.

Devido à destruição de seus habitats e à exploração predatória do seu mel, *M. rufiventris* foi incluída na lista das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais e *M. bicolor* e *M. marginata* são consideradas presumivelmente ameaçadas no Estado (Campos, 1998). A dependência da floresta no caso dessas espécies é explicada em parte, pela necessidade de árvores de porte relativamente grande, onde são encontrados ocos que essas abelhas utilizam para nidificarem.

Assim, a fragmentação florestal tem levado a uma redução das populações de muitas espécies de meliponíneos o que, conseqüentemente, contribui para a perda da variabilidade genética destas populações.

A perda da variabilidade genética está associada à redução do tamanho populacional, uma vez que, em populações pequenas, a segregação aleatória dos genes e a reprodução desigual entre os indivíduos, promovem mudanças nas frequências alélicas (Lande e Barrowclough, 1987) podendo levar a fixação e/ou perda de alelos (Futuyma, 1992). Assim, a variabilidade genética é diretamente proporcional ao tamanho efetivo da população, ou seja, a quantidade de indivíduos que através da reprodução contribuem para a próxima geração (Beiguelman, 1994).

A endogamia (cruzamento entre indivíduos aparentados) e a deriva genética (mudanças aleatórias nas frequências gênicas entre gerações) são fatores que também contribuem para a diminuição da variabilidade genética em pequenas populações. A endogamia colabora para o aumento da similaridade genética entre indivíduos de uma mesma população, contribuindo para elevar a proporção de locos homozigotos (Hartl, 1987). O aumento da homozigose favorece a expressão de alelos recessivos deletérios e diminui o valor adaptativo de locos co-dominantes, o que pode levar a uma diminuição da capacidade adaptativa dos indivíduos às flutuações ambientais provocadas por fatores bióticos e abióticos.

Devido ao mecanismo genético de determinação do sexo em Hymenoptera, os cruzamentos endogâmicos levam ao surgimento de indivíduos homozigotos no loco sexual, os quais se desenvolvem em machos diplóides. Em *Melipona*, esses machos são inviáveis, às vezes nem chegam a nascer ou morrem logo depois de emergirem dos favos. O aumento da proporção de machos diplóides na colônia determina a eliminação da rainha pelas operárias. Estes fatores levam, primeiramente, à redução das populações das colônias e, eventualmente, à sua extinção (Kerr et al., 1996). A recuperação de uma população que passou por um determinado período de endogamia pode ser muito lenta ou não ocorrer, o que pode levar a uma extinção da população por uma endogamia recorrente (Unruh e Messing, 1993).

Kerr e Vencovsky (1982) verificaram que é necessária a manutenção de 44 colônias de uma mesma espécie de abelhas sem ferrão, em uma área de reprodução para manter a população geneticamente estável. Com um número menor de colônias, a probabilidade de rainhas acasalarem-se com machos que possuem alelos sexuais iguais a um dos seus é de 17,3%, o que leva a produção de 50% de machos diplóides (Kerr, 1987).

Por sua vez, a deriva genética causa a perda de alelos raros em uma população, contribuindo para a redução da variabilidade genética intrapopulacional e, conseqüentemente, para fixação ao acaso de alelos diferentes nas populações, o que resulta na diferenciação interpopulacional. Em grandes populações ou em populações pequenas em que há troca de genes por meio da migração constante de indivíduos, os efeitos de deriva

genética são irrelevantes, no entanto, em populações pequenas e isoladas, são grandemente acentuados.

Em populações naturais, a perda da variabilidade genética pode ser equilibrada pela introdução de novos alelos, através de mutações e/ou migração. Contudo, em um ambiente fragmentado, a redução do fluxo gênico entre as populações isoladas, juntamente com as reduzidas taxas de mutação aumentam a perda da variabilidade genética.

No estado de Minas Gerais, é verificado que a fragmentação florestal resultante do desmatamento tem provocado uma redução nas populações de muitas espécies de meliponíneos. Assim, estudos sobre a estrutura genética das populações desses importantes polinizadores, são de grande relevância, uma vez que podem fornecer dados importantes que poderão ser usados para o desenvolvimento de programas que visam a sua conservação.

I.3. Marcadores moleculares microssatélites

Devido à impossibilidade de se estudar todos os alelos presentes em uma população, à busca de marcadores moleculares que produzam estimativas da diversidade genética em uma população é de grande importância (Tregenza e Butlin, 1999). Entende-se por marcador molecular, todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma) (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

No campo das técnicas moleculares, vários métodos têm sido utilizados para a investigação da variabilidade genética em populações naturais, existindo atualmente grande quantidade de marcadores moleculares (isoenzimas, RAPD, RFLP, ISSR, entre outros) que são utilizados em vários tipos de estudos.

No início dos anos 1980, diferentes experimentos demonstraram que os genomas de eucariotos possuem várias classes de seqüências repetitivas (Hamada et al., 1982; Tautz e Renz, 1984). Algumas dessas seqüências foram chamadas de minissatélites ou microssatélites, de acordo com o tamanho da seqüência repetitiva. Os microssatélites são seqüências simples

(Litt e Luty, 1989), possuem de 1 a 6 nucleotídeos de comprimento repetidos em tandem, são muito freqüentes e estão distribuídos ao acaso por todo o genoma do indivíduo.

Esses marcadores moleculares apresentam várias características que os tornam úteis em estudos de paternidade, poliandria, filogeografia, genética de populações, etc. Destaca-se o fato de serem caracteres mendelianos, codominantes, seletivamente neutros (suas seqüências são não-codificadoras) e altamente polimórficos.

Os microssatélites são considerados uma região “instável” do genoma, pois essas regiões possuem uma taxa de mutação muito maior do que outros locos no mesmo genoma (Eisen, 1999). Essa “instabilidade” produz alelos polimórficos (Sia et al., 1997). Apesar de existirem diferentes tipos de polimorfismos que podem ocorrer nos locos microssatélites, o mais comum é a alteração no seu tamanho, devido à seqüências com diferentes números de elementos repetitivos (Eisen, 1999).

Dois mecanismos são sugeridos para explicar a elevada taxa de mutação dos microssatélites (Strand et al., 1993). No “**crossing-over desigual**”, a presença das seqüências repetitivas dificulta o pareamento entre os cromossomos homólogos, acarretando troca de fragmentos cromossômicos de tamanhos desiguais entre os mesmos e alterando o número original de repetições de cada cromossomo. Já no “**slippage**”, ocorre um “deslize” da DNA polimerase durante a replicação do DNA, o que pode resultar no acréscimo ou na perda de repetições.

As regiões microssatélites são amplificadas por meio de PCR (“Reação da polimerase em cadeia”), utilizando-se “primers” específicos que flanqueiam essas regiões. Os diferentes alelos de um mesmo loco são representados pelos fragmentos amplificados com tamanhos diferentes.

“Primers” microssatélites já foram desenvolvidos para algumas espécies de insetos, tais como abelhas (Estoup et al., 1993; Estoup et al., 1994; Peters et al., 1998; Paxton et al., 1996; 1999b), vespas (Choudhary et al., 1993; Hughes e Queller, 1993), formigas (Evans, 1993; Gertsch et al., 1995), thrips (Chapman e Crespi, 1998). Estes “primers” têm possibilitado a

realização de estudos sobre a poliandria, paternidade e genética de populações (Paxton et al., 1999a; Peters et al., 1999; Paxton, 2000).

Choudhary et al. (1993) e Hughes e Queller (1993) verificaram que os microssatélites são marcadores que apresentam altos níveis de polimorfismo, até mesmo em insetos onde foi observado baixos níveis de variabilidade utilizando-se outros marcadores, como as aloenzimas. Em um estudo com a vespa *Polistes annularis*, por exemplo, seis locos microssatélites apresentaram uma heterozigosidade de 0,62 ao passo que 33 aloenzimas apresentaram heterozigosidade de 0,035 (Hughes e Queller, 1993). Isso sugere que este tipo de marcador é uma poderosa ferramenta que pode ser utilizada em estudos de genética de populações.

Os primeiros “primers” microssatélites para abelhas foram descritos por Estoup et al. (1993) e, em 1995, estes “primers” começaram a ser utilizados para estudar a estrutura genética de populações destes organismos (Estoup et al., 1995). A partir daí, vários estudos têm sido realizados utilizando-se esse marcador molecular.

Marcadores microssatélites foram utilizados para análise de associações filogeográficas entre *Bombus terrestris*, presente no continente europeu e *B. canariensis* e *B. maderiensis* presentes nas ilhas Canárias e Madeira, respectivamente, as quais estão localizadas no continente africano (Widmer et al., 1998). Os dados obtidos com essas análises possibilitaram diferenciar *B. canariensis* de *B. maderiensis*, bem como verificar o grau de similaridade entre as três espécies.

Ao se estudar *Platythyrea punctata*, uma formiga telítica, utilizando marcadores microssatélites, Schilder et al. (1999) encontraram baixo índice de heterozigosidade e pequeno número de alelos, sendo comum indivíduos que compartilhavam o mesmo genótipo. Os autores ressaltam que isto pode ser reflexo de seu tipo de reprodução, juntamente com efeitos do fundador e gargalo genético pelos quais passaram as populações estudadas.

Marcadores microssatélites foram utilizados para estudar o comportamento reprodutivo em rainhas da abelha *Scaptotrigona postica*. Os genótipos das operárias analisadas mostravam rainhas acasalando-se uma única vez e, em outros casos, rainhas acasalando-se com até seis machos

diferentes, o que levou o autor a considerar que *S. postica* é uma abelha poliândrica facultativa (Paxton, 2000).

Goodisman et al. (2001) utilizaram marcadores microssatélites no estudo de quatro populações introduzidas da vespa *Vespula germanica* na Austrália. Eles observaram significativa diferenciação alélica entre as populações e diminuição da similaridade genética em uma mesma população com o aumento da distância geográfica entre as colônias.

Palmer et al. (2002), utilizando marcadores microssatélites, estudaram a frequência de cruzamentos das rainhas e origem dos machos em algumas espécies de abelhas sem ferrão mexicanas e australianas. Os resultados obtidos revelaram que todas as espécies analisadas eram monoândricas, além de demonstrarem dominância da rainha na produção dos machos.

Francisco (2002) utilizou “primers” heteroespecíficos (construídos para *Scaptotrigona postica* e *Melipona bicolor*) para analisar a diversidade genética em populações de *Plebeia remota*, uma abelha sem ferrão. Dos 25 “primers” testados, 12 puderam ser utilizados no cálculo da heterozigose e diferenciação entre as populações.

Estudos com *Bombus hypnorum*, utilizando-se marcadores microssatélites, revelaram que as rainhas analisadas acasalaram-se uma única vez e que, em todas as colônias onde as operárias tinham papel reprodutivo, a ovoposição das operárias ocorria paralelamente à ovoposição da rainha. Entretanto, apesar dos altos níveis de reprodução das operárias, a rainha mantinha o controle da razão sexual (Brown et al., 2003).

Shao et al. (2004) encontraram significativa diferenciação entre populações de *Bombus iginitus* do continente e das ilhas asiáticas utilizando esses marcadores. Os resultados encontrados sugeriram que um recente gargalo populacional e o isolamento geográfico foram às causas da divergência apresentada por essas populações.

Lopes (2004) utilizou “primers” heteroespecíficos (construídos para *Melipona bicolor*) para analisar a estrutura genética de populações de *M. mondury* e *M. rufiventris* e obter a estimativa da variabilidade genética dessas espécies. Filho (2006), também utilizando “primers” heteroespecíficos (construídos para *M. bicolor*), estudou a estrutura genética de populações de *M. mondury* no estado da Bahia. O alto valor encontrado

de F_{ST} (0,4483) demonstrou uma alta estruturação entre as subpopulações analisadas.

Oito “primers” microssatélites foram desenvolvidos para *Ceratina flavipes* com o objetivo de obter informações sobre a sociabilidade e o sistema de acasalamento das abelhas do gênero *Ceratina*. Esses “primers” também demonstraram ser uma ferramenta útil para análise genética de espécies congênicas (do mesmo gênero) como *C. okinawana* (Azuma et al., 2005).

A maior dificuldade no uso de marcadores microssatélites é a construção dos “primers”, sendo necessário uma biblioteca genômica. Entretanto, como visto em trabalhos anteriores, é possível a utilização de “primers” heteroespecíficos para espécies relacionadas, o que torna a técnica mais acessível e menos dispendiosa.

Uma vez que não existe “primers” microssatélites construídos especificamente para *M. quadrifasciata*, no presente trabalho foram utilizados “primers” construídos para *M. bicolor* (Peters et al., 1998), com o objetivo de estudar a variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata* no estado de Minas Gerais.

II. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral verificar como o processo de fragmentação florestal afeta a variabilidade genética de colônias de *Melipona quadrifasciata* no Estado de Minas Gerais.

Objetivos específicos:

- a) estimar, em algumas amostras de *M. quadrifasciata*, a variabilidade genética intra e intercolonial;
- b) analisar como as variações genéticas se posicionam entre colônias de *M. quadrifasciata* coletadas em fragmentos de diferentes tamanhos.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III. 1. Material genético

Foram amostradas operárias adultas de colônias de *M. quadrifasciata* provenientes de fragmentos florestais (mata Atlântica e cerrado) de seis localidades de Minas Gerais: Materlândia, Rio Vermelho, Cristiano Otoni, Resende Costa, Januária e Guaraciaba (Tabela 1 e Figura 1). As abelhas coletadas foram trazidas para o laboratório vivas ou fixadas em álcool comum ou em nitrogênio líquido. No laboratório, estas abelhas foram armazenadas a -80°C até o momento da extração do DNA.

As amostras de *M. quadrifasciata* coletadas na localidade de Januária apresentaram bandas amarelas terçais contínuas semelhantes ao padrão morfológico de *M. q. quadrifasciata* que ocorre no sul do país, e não bandas interrompidas como é característico para a *M. q. anthidioides* que ocorre no resto do estado de Minas Gerais.

Para a realização das análises moleculares, foram utilizados 5 indivíduos de cada colônia, sendo 11 colônias de regiões de mata e 11 de regiões de cerrado (Tabela 1).

Tabela 1: Localidade, bioma, área do fragmento e número de colônias de *Melipona quadrifasciata* amostradas.

Localidade	Bioma	Área do fragmento (ha)	Número de colônias
Materlândia	Mata	80,82	1
Rio Vermelho 1	Mata	164,97	1
Rio Vermelho 2	Cerrado	53,91	1
Rio Vermelho 3	Mata	18,18	1
Cristiano Otoni 1	Cerrado	114,93	1
Cristiano Otoni 2	Mata	66,98	1
Cristiano Otoni 3	Mata	139,43	1
Cristiano Otoni 4	Mata	139,45	1
Cristiano Otoni 5	Mata	42,12	1
Cristiano Otoni 6	Mata	10,26	1
Cristiano Otoni 7	Mata	2,61	1
Resende Costa	Mata	5,04	1

Tabela 1: continuação

Localidade	Bioma	Área do fragmento (ha)	Número de colônias
Januária 1	Cerrado	433,48	1
Januária 2	Cerrado	42,58	1
Januária 3	Cerrado	42,58	1
Januária 4	Cerrado	42,58	1
Januária 5	Cerrado	42,58	1
Januária 6	Cerrado	72,23	1
Januária 7	Cerrado	154,35	1
Januária 8	Cerrado	42,58	1
Januária 9	Cerrado	17,37	1
Guaraciaba	Mata	80,28	1
Total			22

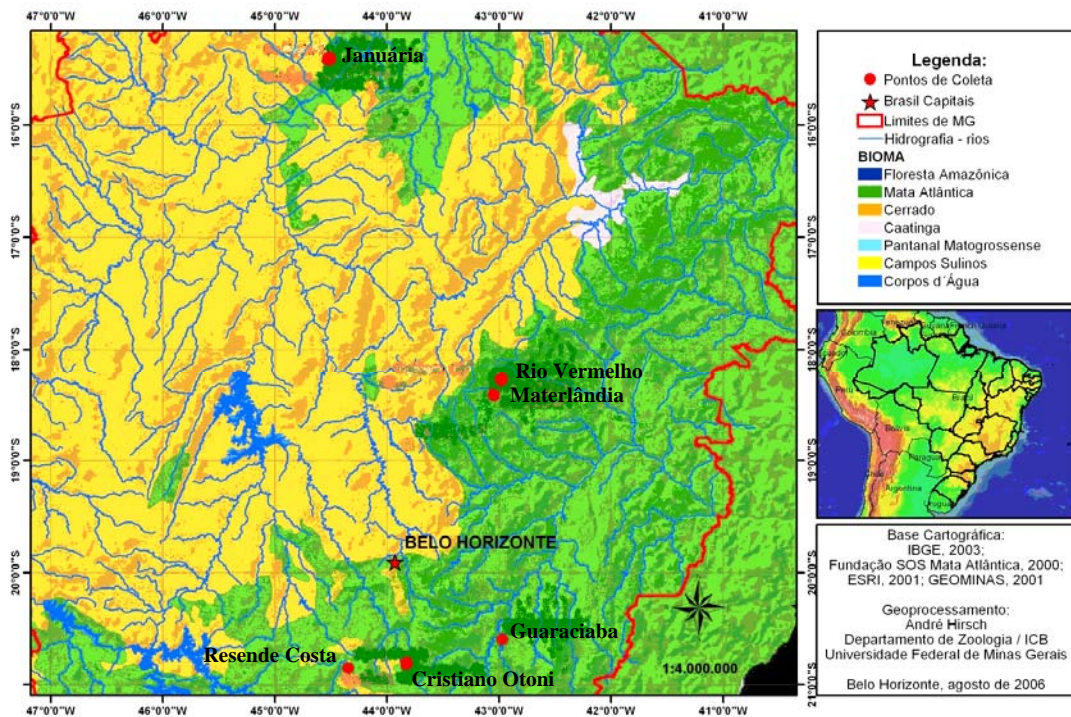


Figura 1: Localização geográfica das seis localidades onde foram coletadas amostras de *M. quadrifasciata* no estado de Minas Gerais.

III. 2. Extração de DNA genômico

A extração do DNA total das operárias foi realizada conforme o protocolo recomendado por Waldschmidt et al. (1997). A cabeça e o mesossoma de cada indivíduo foram macerados em gral de porcelana contendo 1 ml de tampão de extração gelado constituído de: CTAB 2% (Hexadecil Trimetil Brometo de Amônio); EDTA (Ácido Tetraacético Diamina Etileno) 20 mM (pH 8,0); NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM (pH 8,0) e 100 µg/ml de protease. O macerado foi incubado a 65 °C por 30 min. A desproteínização foi feita com 1 volume de clorofórmio por duas vezes. Após cada desproteínização o macerado foi centrifugado a 13.000 rpm por 8 min em centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5415C). A precipitação do ácido nucléico foi feita com 1 volume de isopropanol seguida de incubação a 20°C por 24 h. O material foi, então, submetido à centrifugação a 14.000 rpm por 30 min e o precipitado formado foi lavado duas vezes com etanol 70% e seco à temperatura ambiente. O ácido nucléico foi ressuspendido em 100 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0). Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0,2 µg/ml de brometo de etídio, para quantificação e verificação da integridade e pureza do DNA extraído.

III. 3. Amplificação das regiões microssatélites

A amplificação do DNA extraído foi realizada de acordo com metodologia descrita por Peters et al. (1998), com modificações. A mistura de reação de 10 µL consistiu de: 0,1 mM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 2,5 µM de cada “primer”; 0,5 unidade de *Taq* polimerase, tampão 1X e 10 ng de DNA total. A mistura foi incubada em termociclador modelo PTC – 100 (MJ Research). O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 92° C por 30 segundos, anelamento com temperatura específica para cada “primer” por 1 minuto e alongação a

72° C por 30 segundos. Ao final desses ciclos, foi feito um passo extra de alongação a 72° C por 5 min.

Dos 25 pares de “primers” testados (Peters et al., 1998), 12 amplificaram bandas satisfatórias, sendo, por isso, utilizados no presente trabalho.

III. 4. Visualização dos produtos PCR

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 8%, e visualizados através de coloração com nitrato de prata 0,2%. A coloração foi feita conforme o seguinte protocolo: o gel foi fixado por 10 minutos em fixador 10% de etanol absoluto e 0,5% de ácido acético. Em seguida o gel foi colocado em solução de nitrato de prata 0,2% por 10 minutos. Após esse tempo foi feita uma lavagem em água destilada por um minuto e o gel foi submetido à revelação em solução reveladora 3% NaOH e 0,6 % formol até o aparecimento das bandas. O revelador foi descartado e foi adicionado o fixador para interromper a revelação. Todas as etapas foram feitas sob leve agitação. Em seguida, os géis foram fotodocumentados para análises posteriores.

III. 5. Análises estatísticas

O programa Popgene versão 1.32 (Yeh et al., 1999) foi utilizado para calcular os seguintes estimadores de diversidade genética: frequência alélica, porcentagem de locos polimórficos (P), número médio de alelos por locos (A) e heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e).

A distância genética entre pares de colônias foi calculada utilizando-se a distância genética de Nei (Nei, 1972). Em seguida, a matriz de distância genética foi submetida a uma análise de agrupamento, utilizando-se o algoritmo UPGMA e a uma análise de escala multidimensional, pelo algoritmo de Coordenadas Principais. Essas análises foram realizadas pelo programa Statistica 5.0 (StatSoft, 1997) .

Com o intuito de verificar o grau de diferenciação genética entre as colônias, estas foram reunidas em três grupos, de acordo com a proximidade das localidades: grupo 1: uma colônia de Materlândia e três colônias de Rio Vermelho; grupo 2: sete colônias de Cristiano Otoni, uma colônia de Resende Costa e uma de Guaraciaba; grupo 3: nove colônias de Januária, e foi realizada uma análise de variância molecular (AMOVA) (Arlequin versão 2.000) (Schneider et al., 2000).

IV. RESULTADOS

Dos 25 pares de “primers” testados, 12 apresentaram resultados satisfatórios, em termos de amplificação, para *Melipona quadrifasciata* após alterações nas temperaturas de anelamento (Tabela 2). Destes, apenas dois (Mbi 232 e Mbi 305) foram polimórficos (P=16,67%), com uma média de 1,41 alelos/loco. Estes locos apresentaram 5 e 2 alelos, respectivamente, os quais permitiram a identificação de 10 e 2 genótipos (Tabela 3). Dos 10 genótipos encontrados para o loco Mbi 232, sete eram compostos por dois alelos distintos, o que demonstra a presença de heterozigotos na população. Por outro lado, não foi verificada a presença de indivíduos heterozigotos para o loco Mbi 305 e também não foi verificada a presença de alelos exclusivos em nenhuma das populações analisadas. Em uma das colônias de Rio Vermelho foi verificada a presença de 5 alelos.

Tabela 2: Descrição dos locos microssatélites utilizados, seqüência dos “primers”, repetição do microssatélite, *Ta: temperatura de anelamento sugerida por Peters et al. (1998) e **Ta: temperatura de anelamento utilizada nos experimentos.

Loco	Seqüência (5' → 3')	Repetição	*Ta (C°)	**Ta (C°)
Mbi28	TTTTATCGCTCCTATCCTCC AATCCAACAGGACGGTGT	(TCC) ₆ ACC(TCC) ₃	57,5	57,5
Mbi32	CTTTATCCGGTGCGTGCGAA GAAGGCATTCCGGGTTGTT	(GGA) ₄ (GGAGAA) ₅	57,5	64
Mbi33	ATCACCTAACTTGGCATCCC GATCAAGGGCCAAGAGGA	TTC(TCC) ₂ TCTTCC(TCT) ₂ (TCC) ₃	60	70
Mbi88	GCCGCCGTACGTTCTGA GCGCTCGAGCAGCGTT	(GAAA) ₂ GGAAG(AAAGA) ₄ (AAGGA) ₂ AAAGAAAC(GAG) ₂	57,5	64
Mbi103	CCCCACAGTGTAACCAGAAAG TTATGGTGATAAACGGCGAAG	(ATT) ₆	50	60
Mbi219	GCAGCGAAAGACTAATTTACC GACGTTGGAATGGAACTC	(AAT) ₄	57,5	60
Mbi221	CATTTGCGCCGCTCTCTATCT CTTGAATCTTTTGACACAACGTCT	(AGA) ₂ TGGCT(AGA) ₅	60	62,5
Mbi232	TTTTTCTCTTAAATTTTCTTCT CTTACTCGACGACTTTATTT	(CTT) ₁₃	50	52

Tabela 2: continuação

Mbi259	CGACGTTAACATTTTCGCTA	(AGG)(AGA) ₅ (GGA) ₂ GAA	57,5	66
	CTGTTCCGACTGTTCTCACTCT	(GGA) ₂		
Mbi278	GTTCGTGTTTCGTGGTGAAT	CTT(CTC) ₂ CTTCTCTGCTTC	60	68
	GTTGCGAGAACTCTGACGAT	C (TCT) ₉ CCTTCG(TCT) ₂		
Mbi305	GATCCGCTGCGCGAGAC	(CAT) ₃ (CAG)(CAT) ₂ (CCT) ₃	60	62,5
	GGACGAGGCTGAGGCATG	(TCT)(CTT) ₂ (CCT)(CTC)		
Mbi522	CCCTGGACAAATACAAACGTA	(TGC) ₄ TGT(TGC) ₃	60	60,5
	GAACAATGCTCTTCTCCGAA			

Tabela 3: Genótipos observados nos locos microssatélites polimórficos detectados em *M. quadrifasciata*.

Loco	Localidades					
	Materlândia	R. Vermelho	C. Otoni	R. Costa	Januária	Guaraciaba
Mbi232	CD	AC	AC	AA	AB	BB
		BE	AB	AC	AC	BE
		CC	BB		BB	
		CD	BC		BC	
		CE	BE		BE	
			CC		CC	
			CD		CE	
Mbi305	BB	AA	AA	AA	AA	
		BB	BB	BB	BB	BB

As Figuras 2 e 3 mostram alguns dos genótipos encontrados para os locos analisados.

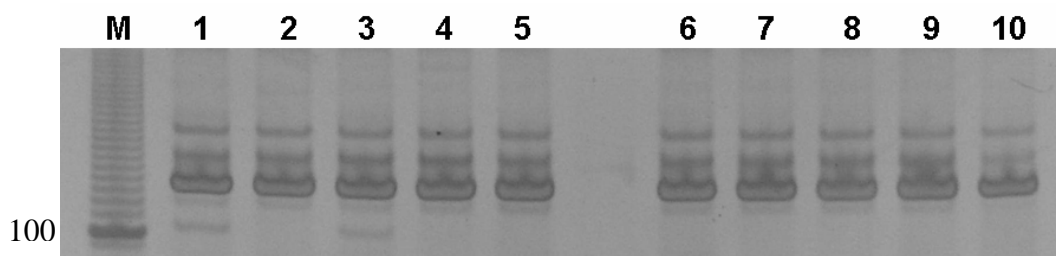


Figura 2: Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida 8% mostrando alguns dos genótipos do loco Mbi 522 verificados em *Melipona quadrifasciata*. M: marcador de peso molecular (em pares de bases).

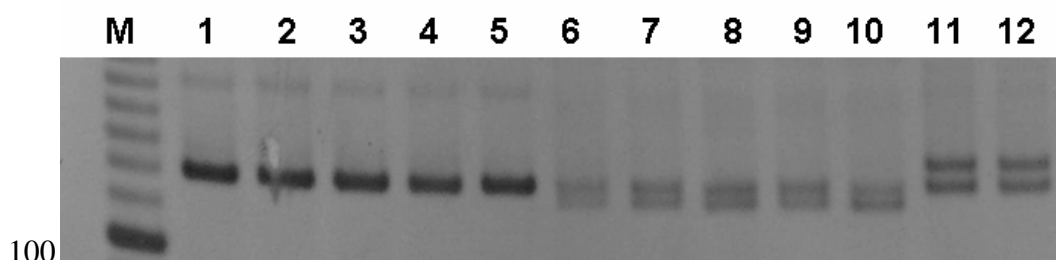


Figura 3: Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida 8% mostrando alguns dos genótipos do loco Mbi 232 verificados em *Melipona quadrifasciata*. M: marcador de peso molecular (em pares de bases).

A Tabela 4 evidencia a frequência alélica verificada para os locos polimórficos, em cada colônia analisada. Os doze locos microssatélites analisados mostraram baixos níveis de diversidade genética, conforme revelado pela média dos valores da heterozigosidade observada ($H_o = 0,046$) e esperada ($H_e = 0,086$).

Tabela 4: Freqüências alélicas e heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e) para os locos microssatélites polimórficos em cada colônia analisada.

Colônia	Mbi 232					Mbi 305		H_o	H_e
	A	B	C	D	E	A	B		
Materlândia	-	-	0,625	0,375	-	-	1,000	0,062	0,044
Rio Vermelho1	-	-	1,000	-	-	-	1,00	0,000	0,000
Rio Vermelho2	0,125	0,250	0,250	0,125	0,250	0,800	0,200	0,083	0,104
Rio Vermelho3	-	-	0,800	-	0,200	-	1,000	0,033	0,029
Cristiano Otoni1	0,500	-	0,500	-	-	-	1,000	0,083	0,047
Cristiano Otoni2	-	-	0,500	0,500	-	-	1,000	0,083	0,046
Cristiano Otoni3	-	1,000	-	-	-	-	1,000	0,000	0,000
Cristiano Otoni4	-	0,500	-	-	0,500	-	1,000	0,083	0,047
Cristiano Otoni5	-	1,000	-	-	-	-	1,000	0,000	0,000
Cristiano Otoni6	0,100	0,500	0,400	-	-	0,200	0,800	0,083	0,083
Cristiano Otoni7	-	-	1,000	-	-	-	1,000	0,000	0,000
Resende Costa	0,900	-	0,100	-	-	0,600	0,400	0,016	0,061
Januária1	-	-	0,800	-	0,200	1,000	-	0,033	0,029
Januária2	-	-	0,200	0,300	0,500	0,200	0,800	0,083	0,087
Januária3	-	0,200	-	0,300	0,500	0,400	0,600	0,083	0,101
Januária4	-	0,600	0,400	-	-	-	1,000	0,000	0,044
Januária5	-	-	1,000	-	-	0,600	0,400	0,000	0,044
Januária6	0,500	0,500	-	-	-	-	1,000	0,083	0,046
Januária7	-	0,500	-	-	0,500	-	1,000	0,083	0,046
Januária8	0,300	0,200	0,500	-	-	0,400	0,600	0,083	0,101
Januária9	-	-	1,000	-	-	-	1,000	0,000	0,000
Guaraciaba	-	0,700	-	-	0,300	-	1,000	0,050	0,038
Média								0,046 (0,161)	0,086 (0,219)

Entre parênteses são apresentados os valores de desvio padrão.

A distância genética variou de 0.003 a 0.090 para as colônias coletadas em Rio Vermelho, de 0.0 a 0.087 para aquelas coletadas em Cristiano Otoni e de 0.007 a 0.147 para as colônias coletadas em Januária. Quando todas as colônias foram analisadas em conjunto, a distância genética média foi de 0,05 (0,000 a 0,147) (Tabela 5).

A análise de agrupamento (Figura 4) e a análise de escala multidimensional (Figura 5) demonstraram a formação de apenas dois grupos. O primeiro agrupou uma colônia proveniente de Rio Vermelho, duas colônias de Januária, e uma de Resende Costa, enquanto o segundo grupo reuniu as demais colônias. O valor do stress ($S = 0,119$, após 13 iterações) que avalia a relação entre a distância genética e as distâncias geradas pelo gráfico de escala multidimensional demonstrou boa adequação dos grupos formados pelo gráfico e as distâncias genéticas, de acordo com a classificação proposta por Kruskal (1964).

Pop.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	9	20	21	22
1	****																					
2	0.012	****																				
3	0.075	0.090	****																			
4	0.009	0.003	0.077	****																		
5	0.018	0.021	0.075	0.016	****																	
6	0.001	0.021	0.075	0.016	0.022	****																
7	0.067	0.087	0.090	0.073	0.066	0.066	****															
8	0.046	0.066	0.069	0.043	0.044	0.044	0.021	****														
9	0.067	0.087	0.090	0.073	0.066	0.066	0.000	0.021	****													
10	0.023	0.030	0.041	0.024	0.022	0.027	0.021	0.022	0.021	****												
11	0.012	0.000	0.090	0.003	0.021	0.021	0.087	0.066	0.087	0.030	****											
12	0.089	0.105	0.038	0.093	0.046	0.089	0.115	0.093	0.115	0.059	0.105	****										
13	0.100	0.092	0.021	0.089	0.108	0.108	0.169	0.137	0.169	0.079	0.092	0.075	****									
14	0.023	0.046	0.041	0.027	0.034	0.020	0.064	0.020	0.064	0.029	0.046	0.068	0.083	****								
15	0.045	0.076	0.023	0.053	0.055	0.040	0.057	0.022	0.057	0.031	0.076	0.059	0.072	0.007	****							
16	0.024	0.031	0.070	0.024	0.027	0.027	0.013	0.018	0.013	0.004	0.031	0.090	0.117	0.037	0.044	****						
17	0.044	0.031	0.036	0.035	0.054	0.054	0.123	0.101	0.123	0.042	0.031	0.073	0.017	0.059	0.067	0.064	****					
18	0.046	0.066	0.075	0.052	0.022	0.044	0.021	0.022	0.021	0.018	0.066	0.051	0.147	0.043	0.045	0.018	0.101	****				
19	0.046	0.066	0.069	0.043	0.044	0.044	0.021	0.000	0.021	0.022	0.066	0.093	0.137	0.020	0.022	0.018	0.101	0.022	****			
20	0.027	0.030	0.023	0.025	0.018	0.031	0.057	0.045	0.057	0.010	0.030	0.029	0.044	0.029	0.032	0.026	0.020	0.031	0.045	****		
21	0.012	0.000	0.090	0.003	0.021	0.021	0.087	0.066	0.087	0.030	0.000	0.105	0.092	0.046	0.076	0.031	0.031	0.066	0.066	0.030	****	
22	0.049	0.069	0.072	0.050	0.048	0.048	0.007	0.003	0.007	0.017	0.069	0.097	0.145	0.033	0.031	0.011	0.105	0.016	0.003	0.045	0.069	****

Tabela 5 – Matriz das distâncias genéticas de Nei (1972), obtidas pela análise de 12 locos microssatélites, entre as 22 colônias de *Melipona quadrifasciata* coletadas em Materlândia (1), Rio Vermelho (2 – 4), Cristiano Ottoni (5 – 11), Resende Costa (12), Januária (13 – 21) e Guaraciaba (22).

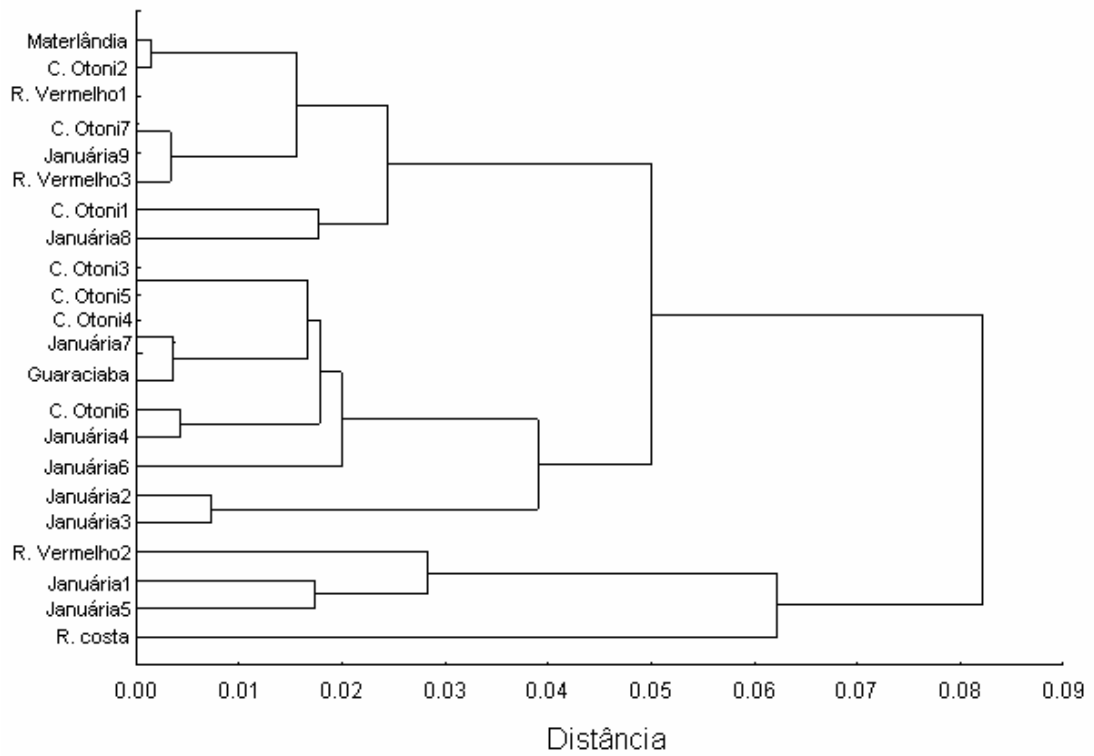


Figura 4: Dendrograma UPGMA ilustrando as distâncias genéticas médias, calculadas a partir de dados dos locos microssatélites analisados, entre as colônias de *Melipona quadrifasciata*.

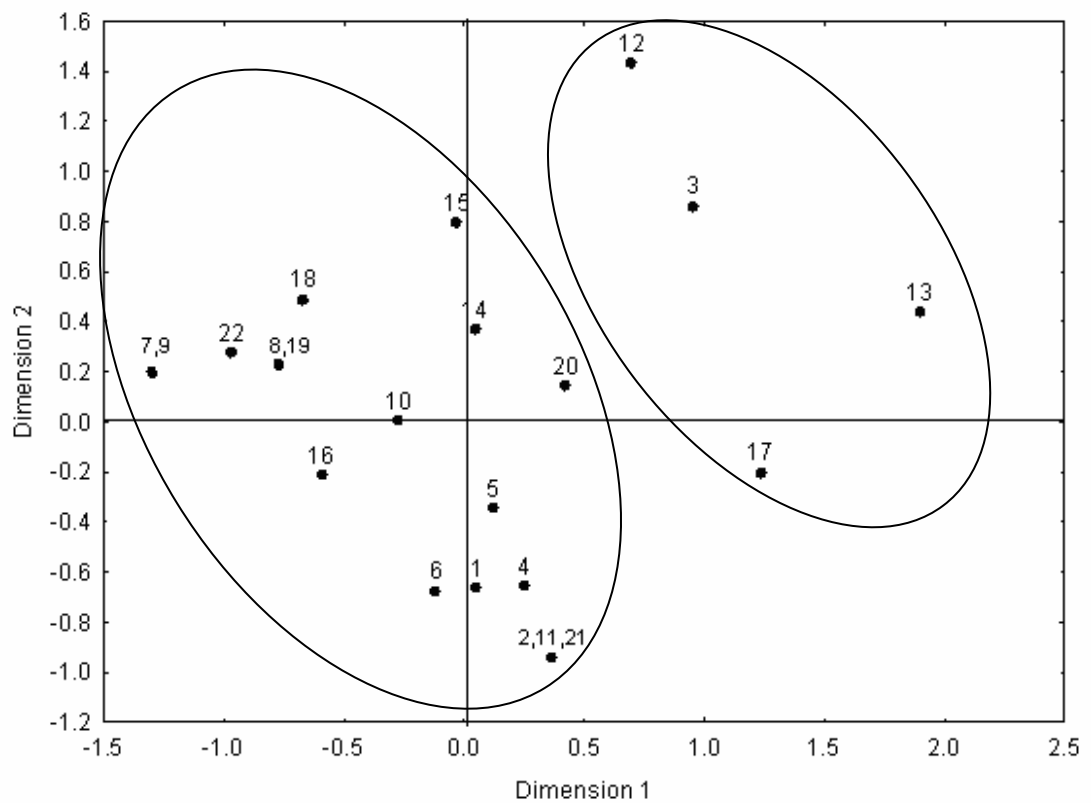


Figura 5: Gráfico da escala multidimensional (MDS) para as distâncias genéticas entre as 22 colônias de *M. quadrifasciata* analisadas, construído com base nas frequências alélicas dos doze locos microssatélites. $S = 0,119$, após 13 iterações. Materlândia (1), Rio Vermelho (2 – 4), Cristiano Otoni (5 – 11), Resende Costa (12), Januária (13 – 21) e Guaraciaba (22).

O resultado da análise de variância molecular (AMOVA) (Tabela 6) demonstrou que 42,93% e 55,42% da variação genética total estão distribuídas entre e dentro das colônias, respectivamente.

Tabela 6: Análise de Variância Molecular (AMOVA) realizada com base nos locos microssatélites analisados.

Componentes de variância	d.f.	Porcentagem de variação
Entre Grupos	2	1,64
Colônias/ grupos	19	42,93
Dentro das colônias	198	55,42

$P < 0,00000$ após 1023 permutações.

V. DISCUSSÃO

Os dados obtidos no presente estudo demonstraram que as colônias de *M. quadrifasciata* analisadas são caracterizadas por uma baixa variabilidade genética com grau de polimorfismo ($P=16,67\%$) e número de alelos/loco ($A = 1,41$), o que não era esperado, uma vez que esses marcadores moleculares constituem uma classe altamente polimórfica (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Entretanto, na ausência de “primers” microssatélites construídos especificamente para *M. quadrifasciata*, foram utilizados “primers” heteroespecíficos construídos para *M. bicolor* o que pode ter contribuído para o baixo nível de polimorfismo detectado.

Segundo Callen et al. (1993), alelos nulos são um dos principais fatores que leva a um baixo nível de polimorfismo ou a um déficit de heterozigotos e, a utilização de “primers” heteroespecíficos pode contribuir para isso (Pépin et al., 1995). Normalmente, os alelos nulos surgem devido a mutações dentro dos sítios de ligação dos “primers” impedindo a amplificação de alelos. Como consequência, indivíduos heterozigotos que possuam um alelo nulo serão considerados erroneamente como homozigotos, o que diminui a variabilidade genética observada do organismo em análise.

A homoplasia de tamanho também é outro fator que pode levar a uma redução de polimorfismo. As homoplasias ocorrem quando diferentes cópias de um loco possuem o mesmo tamanho, porém, podem apresentar seqüências diferentes (Estoup et al., 2002). Assim, dois alelos (de um mesmo loco), idênticos em estado (possuem o mesmo tamanho), mas que apresentam seqüências diferentes, podem ser considerados como um único alelo.

Peters et al. (1998), ao desenvolverem “primers” para *Melipona bicolor*, já haviam detectado que os níveis de polimorfismo para os locos microssatélites amplificados com “primers” heteroespecíficos são menores do que quando se utilizam “primers” homoespecíficos. Estes autores também verificaram que, além da redução do número de locos polimórficos em espécies congênicas, ocorria a não amplificação de alguns locos. Em

M. quadrifasciata, por exemplo, seis locos não amplificaram e apenas oito, dos 19 “primers” polimórficos para *M. bicolor*, apresentaram polimorfismos. Em *T. clavipes* e *S. postica*, a metade, aproximadamente, dos locos amplificaram e, destes, apenas três e quatro locos, respectivamente, foram polimórficos. Resultados semelhantes foram verificados por Azuma et al. (2005) ao desenvolverem oito “primers” microssatélites para a abelha solitária *Ceratina flavipes*, todos polimórficos. A efetividade desses “primers” foi testada com outras três espécies de *Ceratina*. Em *C. okinawana* apenas um loco não amplificou e os demais foram polimórficos. Porém nas outras duas espécies, *C. japonica* e *C. iwati*, apenas três locos produziram fragmentos do tamanho esperado, sendo apenas um deles polimórfico. Francisco et al. (2006) também chegaram à mesma conclusão, ao comparar dados obtidos a partir de locos microssatélites de três espécies de abelhas sem ferrão (*P. remota*, *P. mulata* e *P. helleri*).

Porém, o valor do polimorfismo verificado em *M. quadrifasciata*, pode ser considerado muito baixo, mesmo quando se compara com outros trabalhos que também utilizaram “primers” heteroespecíficos. Lopes (2004), por exemplo, utilizando “primers” construídos para *M. bicolor* detectou, em populações de *M. rufiventris* e *M. mondury*, polimorfismos de 33,33% e 22,2%, respectivamente.

A heterozigosidade média esperada estimada para *M. quadrifasciata* também foi baixa em comparação àquela verificada em outras espécies de abelhas, com o uso de “primers” específicos (Estoup et al., 1995; Widmer et al., 1998). Assim, o uso de “primers” desenhados especificamente para *M. quadrifasciata* poderia confirmar se a baixa variabilidade genética detectada nesta espécie é devido a: 1) problemas técnicos, tais como presença de alelos nulos, o uso de “primers” heteroespecíficos e homoplasias de tamanho, como mencionado anteriormente; 2) características próprias da espécie, tais como o sistema de determinação sexual haplodiplóide dos Hymenoptera ou o tamanho efetivo das populações analisadas ou 3) degradação ambiental.

Segundo Graur (1985), o tamanho efetivo da população pode ser o principal fator determinante da baixa heterozigosidade encontrada nos himenópteros, com a haplodiploidia, provavelmente, tendo apenas um

pequeno efeito sobre a diversidade genética. A haplodiploidia leva a um aumento da seleção devido à expressão hemizigota de alelos recessivos deletérios em machos, aumentando a deriva genética devido ao reduzido tamanho efetivo da população (Pamilo e Crozier, 1981). Segundo Lynch et al. (1995), populações com tamanhos normais costumam apresentar um grande número de alelos deletérios em baixas frequências. Esses alelos, quase sempre recessivos, são mantidos em frequências reduzidas pela ação da seleção natural sobre os homozigotos. Entretanto, em populações pequenas, a fixação desses alelos impede a ação da seleção natural pela falta de alternativa genética que possa ser selecionada. Assim, a perda da variabilidade genética é inversamente proporcional ao tamanho efetivo da população, ou seja, ao número de indivíduos que através da reprodução participam na produção da próxima geração (Beiguelman. 1994).

Carvalho-Zilse e Kerr (2006) utilizaram “primers” desenvolvidos para *M. bicolor* para amplificar locos de operárias de *M. scutellaris* e, verificaram que dos sete locos analisados cinco tiveram valores de heterozigosidade menores quando comparados aos de *M. bicolor*. Tal resultado foi explicado considerando-se que várias rainhas fisogástricas ativas podem estar presentes, ao mesmo tempo, em uma colônia de *M. bicolor*, o que aumenta a variabilidade genética, quando comparada com *M. scutellaris*, onde a poliginia nunca foi observada.

O valor de heterozigosidade média destes locos, para *M. scutellaris* também foi menor do que o verificado a partir de 10 locos microssatélites em *A. mellifera mellifera* (Estoup et al., 1994). O que levou os autores a sugerirem que, acasalamentos múltiplos (poliandria) também têm implicações na variabilidade genética dos himenópteros, pois em *A. mellifera*, a rainha pode cruzar com até 17 machos (Adms et al., 1977), enquanto em *M. scutellaris* foi verificado que, em apenas 2% dos casos, a rainha cruza com mais de 1 macho (Carvalho, 2001).

Estudos baseados em observações de zangões próximos a colônias de *T. angustula* que possuíam rainhas virgens, também sugerem que as rainhas dessa espécie acasalam-se mais de uma vez (Imperatriz-Fonseca et al., 1998). Falcão e Contel (1991), analisando a segregação de marcadores bioquímicos em operárias de *Plebeia droryana*, também sugerem a

ocorrência de poliandria ou poliginia nesta espécie, enquanto Paxton (2000) sugere que as rainhas de *Scaptotrigona postica* são poliândricas facultativas, pois ele identificou casos de rainhas acasalando-se com até seis machos diferentes. Neste sentido, a detecção de cinco alelos em uma das colônias de Rio Vermelho, no presente estudo, pode ser um indício de poliandria, ou seja, de que a rainha pode ter se acasalado com mais de um macho. Entretanto, uma única colônia não é suficiente para afirmar se rainhas de *M. quadrifasciata* podem se acasalar com mais de um macho. Outra possibilidade para explicar este resultado seria a presença de operárias de outras colônias que, entraram nesta colônia, em busca de alimento (saque), próximo do momento da coleta.

A destruição de habitats naturais representa uma explicação alternativa para os baixos níveis de variabilidade genéticas detectada em *M. quadrifasciata*. De fato, atualmente, esta degradação tem provocado uma diminuição nas populações de abelhas em todo o mundo (Michener, 2000). O desmatamento, um dos fatores que tem contribuído para isso, leva a uma redução das áreas de florestas e, concomitantemente, a uma diminuição das populações que vivem nesses habitats (Viana e Melo, 1987). Assim, considerando-se que as colônias analisadas no presente trabalho foram coletadas em áreas fragmentadas, pode-se sugerir um aumento da endogamia e, conseqüente, redução da diversidade genética devido à redução populacional que as mesmas sofreram.

Goropashnaya et al. (2001) também verificaram uma redução na variabilidade de microssatélites em populações pequenas e geograficamente isoladas de *Formica cinerea*. Esses autores sugeriram, entretanto, que a redução é mais evidente em relação ao número de alelos por loco do que os níveis de heterozigosidade. O reduzido tamanho efetivo da população e a ocorrência de um gargalo populacional também foram citados como possíveis razões para os baixos níveis de polimorfismo encontrado na formiga *Diacamma indicum* (Viginier et al., 2004).

No presente estudo, entretanto, não foi possível verificar uma relação entre o tamanho dos fragmentos amostrados e a variabilidade genética (números de alelos detectados) das diferentes colônias. No maior fragmento amostrado (433,48ha), por exemplo, foi detectada a presença de

apenas dois alelos para o loco Mbi 232 e apenas um alelo para o loco Mbi 305 na colônia de “Januária 1”, enquanto que, na colônia “Rio Vermelho 2”, coletada em um fragmento de apenas 53,91ha foi detectada a presença de cinco e dois alelos, nos locos Mbi 232 e 305, respectivamente.

Os baixos valores encontrados na matriz de distância genética revelaram alta similaridade entre as colônias analisadas. Estes resultados indicam uma alta relação genética entre as mesmas e sugere que elas, possivelmente, compartilharam um mesmo “pool” gênico no passado. De um modo geral, verifica-se que as colônias que estão em fragmentos mais próximos apresentam maior similaridade genética do que colônias que estão em fragmentos mais distantes. Entretanto, algumas vezes, até mesmo colônias muito distantes geograficamente apresentaram alta similaridade genética, por exemplo, a colônia de “Rio Vermelho 3” e a colônia “Cristiano Otoni 7”, cujo valor de distância genética foi apenas 0,0033.

O dendrograma (Figura 4) e a análise de escala multidimensional (Figura 5) corroboram os resultados obtidos na análise da distância genética, demonstrando que não foi possível agrupar as colônias de acordo com a localidade de origem das mesmas. Houve apenas a formação de dois grupos, cada qual contendo colônias de diferentes localidades.

As análises realizadas, portanto, não permitiram a separação das colônias de Januária, as quais possuem um padrão morfológico semelhante ao de *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*. O fato de não terem sido detectados alelos exclusivos, provavelmente reflexo do uso de “primers” heteroespecíficos, pode ter contribuído para o padrão de agrupamento verificado. Contudo, o loco Mbi 232 gerou um genótipo (DE) que foi verificado exclusivamente nas colônias de Januária, demonstrando que análises futuras, utilizando-se “primers” microssatélites específicos para esta espécie, poderão ser úteis na distinção das duas subespécies, como já realizado através de marcadores RAPD (Waldschmidt et al., 2000) e PCR-RFLP (Moretto e Arias, 2005).

Os resultados obtidos com a análise de variância molecular (AMOVA) mostraram que a maior variação encontra-se dentro das colônias, o que demonstra uma grande estruturação entre as mesmas. Esta diferenciação genética, entre as colônias, pode ter sido aumentada pela

fragmentação ambiental, a qual isola colônias em pequenos fragmentos e diminui o número de ninhos encontrados em cada localidade. Isso reforça a importância de se preservar o maior número possível de colônias dessas abelhas, se possível em seus ambientes naturais.

Por outro lado, essa diferenciação também pode ser resultado dos poucos locos polimórficos encontrados, devido à utilização de “primers” heteroespecíficos. Neste caso, devido à alta proporção de locos monomórficos, a detecção de um loco polimórfico em apenas uma colônia, ou a detecção do mesmo loco (polimórfico) em colônias geograficamente distantes poderia separar e/ou agrupar colônias, sem refletir a real relação genética entre as mesmas. Assim, fica evidente a importância, para análises futuras, do desenvolvimento de “primers” específicos para *M. quadrifasciata*, bem como a necessidade de se aumentar o número de colônias e o número de locos analisados.

VI. CONCLUSÕES GERAIS

- As colônias analisadas foram caracterizadas por um baixo nível de variabilidade genética, que pode ser consequência de uma redução populacional devido à fragmentação, ou devido ao uso de “primers” heteroespecíficos.
- Os locos microssatélites analisados não conseguiram separar as colônias de *M. quadrifasciata* provenientes de Januária (as quais apresentam um padrão de bandas semelhantes ao de *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*) das demais colônias de *M. quadrifasciata* coletadas em Minas Gerais.
- Os resultados obtidos com a análise de variância molecular (AMOVA) mostraram uma grande estruturação genética entre as colônias analisadas, o que deve ser levado em consideração no desenvolvimento de estratégias que visam à conservação desta espécie.
- Análises futuras, envolvendo um maior número de colônias, bem como “primers” microssatélites específicos, deverão ser realizadas para verificar a relação entre o tamanho dos fragmentos florestais e a variabilidade genética de *M. quadrifasciata*.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADMS, J., ROTHMAN, E.D., KERR, W.E, PAULINO, Z.L. (1977). Estimation of number of sex alleles and queen matings from diploid male frequencies in a population of *Apis mellifera*. *Genetics*, 86: 583-596.

AIDAR, D.S. (1996). A mandaçaia: Biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Série Monografias, Nº 4. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto – SP, 9-10.

AZUMA, N., TAKAILASHI, J., KIDOKORO, M., HIGASHI, S. (2005). Isolation and characterization of microsatellite loci in the bee *Ceratina flavipes*. *Molecular Ecology Notes*, 5: 433-435.

BEIGUELMAN, B. (1994). Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP.

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

BROWN, M.J.F., SCHMID-HEMPEL, R., SCHMID-HEMPEL, P. (2003). Queen-controlled sex ratios and worker reproduction in the bumble bee *Bombus hypnorum*, as revealed by microsatellites. *Molecular Ecology*, 12: 1599-1605.

CALLEN, D.F., THOMPSON, A.D., SHEN, Y., PHILLIPS, H.A., RICHARDS, R.I., MULLEY, J.C., SUTHERLAND, G.R. (1993). Incidence and Origin of "Null" Alleles in the (AC)_n Microsatellite Markers. *Am. J. Hum. Genet.*, 52:922-927.

CAMARGO, J.M.F., PEDRO, S.R.M. (1992). Systematic, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini review. *Apidologie*, 23: 1-32.

CAMPOS, L.A.O. *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836. (1998). In: Machado, A.B.M. Fonseca; R.B. Machado; L.M.S, Aguiar; L.V. Lins (ed.). Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna de Minas Gerais. Belo Horizonte. Biodiversitas, 560-561.

CARVALHO, G.A. (2001). The number of sex alleles (CSD) in a bee population and its practical importance. *Journal of Hymenoptera Research*, 10(1): 10-15.

CARVALHO-ZILSE, G. A. & KERR, W.E. (2006). Utilização de marcadores microssatélites para estudos populacionais em *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). *Magistra*, 18(4): 213-220.

CHAPMAN, T.W. & CRESPI. B. J. (1998). High relatedness and inbreeding in two species of haploiploid eusocial thrips (Insecta: Thysanoptera) revealed by microsatellite analysis. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 43: 301-306.

CHOUDHARY, M., STRASSMANN, J.E., SOLÍS, C.R., QUELLER, D.C. (1993). Microsatellite variation in a social insect. *Biochem.Genet.*, 31(1/2): 87-96.

EISEN, J.A. (1999). Mechanistic basis for microsatellite instability. *In* *Microsatellites: Evolution and Applications* (Goldstein, D.B. e Schlötterer C. eds.), Oxford University Press, New York, 34-48p.

ESTOUP, A., SOLIGNAC, M., HARRY, M., CORNUET, J.M. (1993). Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Res.*, 21: 1427-1431.

ESTOUP, A., SOLIGNAC, M., CORNUET, J.M. (1994). Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in honeybee colonies. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 258: 1-7.

ESTOUP, A., GARNERY, L., SOLIGNAC, M., CORNUET, J.M. (1995). Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*, 140: 679-695.

ESTOUP, A., JARNE, P., CORNUET, J.M. (2002). Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Mol. Ecol.*, 11: 1591-1604.

EVANS, J. (1993). Parentage analysis in ant colonies using simple sequence repeat loci. *Mol. Ecol.*, 2: 393-397.

FALCÃO, T.M.M.A & CONTEL, E.P.B. (1991). Genetic variability in natural population of Brazilian bees; II electrophoretic data for PMG and MDH give evidence for multiple fertilizations in stingless bees. *Rev. Brasil. Genet.*, 14:47-59.

FERREIRA, E.M. & GRATTAPAGLIA, D. (1998). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3^o ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 56p.

FILHO, H.B. (2006). Estrutura genética populacional de *Melipona mondury* Smith, 1863 (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) no estado da Bahia por meio de microssatélites. (Trabalho de conclusão de curso). Jequié-BA.

FRANCISCO, F.O. (2002). Diversidade genética de populações de abelhas sem ferrão *Plebeia remota*: análise do DNA mitocondrial e microssatélites. (Dissertação de Mestrado). São Paulo.

FRANCISCO, F.O., BRITO, R.M., ARIAS, M.C. (2006). Allele Number and Heterozygosity for Microsatellite Loci in Different Stingless Bee Species (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). *Neotropical Entomology*, 35(5): 638-643.

FUTUYMA, D.J. (1992). *Biologia Evolutiva*. 2ª ed. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, 16-28.

GERTSCH, P., PAMILO, P., VARVIO, S.L. (1995). Microsatellites reveal high genetic diversity within colonies of *Camponotus ants*. *Mol. Ecol.*, 4: 257-260.

GOODISMAN, M.A.D., MATTHEWS, R.W., CROZIER, R.H. (2001). Hierarchical genetic of the introduced wasp *Vespula germanica* in Australia. *Mol. Ecol.*, 10: 1423-1432.

GOROPASHNAYA, A.V., SEPPÄ, P., PAMILO, P. (2001). Social and genetic characteristics of geographically isolated populations in the ant *Formica cinerea*. *Mol. Ecol.*, 10: 2807-2818.

GRAUR, D. (1985). Gene Diversity in Hymenoptera. *Evolution*, 39(1):119-199.

HAMADA, H., PETRINO, M.G., KAKUNAGA, T. (1982). A novel repeat element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79: 64-65.

HARTL, D.L. (1987). *A primer of population genetics*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.

HUGHES, C.R. & QUELLER, D.C. (1993). Detection of highly polymorphic microsatellite loci a species with little allozyme polymorphism. *Mol. Ecol.*, 2 (3): 7-131.

IMPERATRIZ-FONSECA, V.L., MATOS, E.T., FERREIRA, F., VELTHUIS, H.H.W. (1998). A case of multiple mating in stingless bees (Meliponinae). *Insectes soc.*, 45: 231-233.

KERR, W.E. & LELLO, E. (1962). Sting glands in stingless bees – a vestigial character (Hymenoptera, Apidae). *J. New York Entomol. Society*, 70: 190-214.

KERR, W.E. & VENCOVSKY, R. (1982). Melhoramento genético em abelhas. I. Efeito do número de colônias sobre o melhoramento. *Rev. Brasil. Genet.*, 5: 279-285.

KERR, W.E. (1987). *Biologia, manejo e genética de Melipona compressipes fasciculata* Smith (Hymenoptera, Apidae). Univ. Fed. Maranhão, São Luiz, MA (Titular). 141p.

KERR, W.E.; CARVALHO, G.A. & NASCIMENTO, V.M. (1996). *Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação*. Coleção Manejo da Vida Silvestre, no. 2. Belo Horizonte, Acangaú.

KERR, W.E., CARVALHO, G.A., NASCIMENTO, V.M. (1999). The probable consequences of the destruction of brazilian stingless bees: 395-404. In: Padoch, C., Ayres, J.M., Pinedo-Vasquez, M, Henderson, A. (eds). *Várzea: diversity, development and conservation of Amazonia's whitewater floodplains*. New York botanical Garden Press, New York, 407p.

KERR, W.E., CARVALHO, G.A., SILVA, A.C., ASSIS, M.G.P. (2001). Biodiversidade, pesquisa e desenvolvimento na Amazônia: Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parcerias Estratégicas*, 12: 20p.

KEVAN, P. G.; BAKER, H. G. (1983). Insects as flower visitors and pollinators. *Annual Rev. Entomol.*, 28: 407-453.

KRUSKAL, J. B. (1964). Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika*, 29:1-27.

LANDE, R., BARROWCLOUGH, G.F. (1987). Effective population size, genetic variation, and their use in population management. In *Viable population for Conservation* (Soulé, M.E. ed.). Cambridge University Press, Cambridge, UK. 87-123p.

LITT M., LUTY J.A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 44: 397-401.

LOPES, D.M. (2004). Diversidade e Estrutura Genética em Populações de *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae) por análise de microssatélites. (Dissertação de Mestrado). Viçosa-MG

LYNCH, M., CORNERY, J. BURGER, R. (1995). Mutation accumulation and the extinction of small population. *Am. Nat.*, 146: 489-518.

MELLO, G.A.R., CAMPOS, L.A.O. (1987). Variação do padrão de faixas na população de *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1936 no Estado de Minas Gerais (Hymenoptera, Apidae, meliponinae). XIV Congresso Brasileiro de Zoologia. Juiz de Fora, MG, 1 a 6 de Fevereiro.

MICHENER, C.D. (2000). *The bees of the world*. The John Hopkins University Press. Baltimore.

MORETTO, G. & ARIAS, M.C., (2005). Detection of Mitochondrial DNA Restriction Site Differences Between the Subspecies of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Neotropical Entomology*. 34(3):381-385.

MOURE, J.S., KERR, W.E. (1950). Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apoidea). *Dusenía*, 12:105-129.

NEI, M. (1972). Genetic distance between populations. *Amer. Nat.*, 106: 283-292.

PALMER, K.A, OLDROYD, B.P.,QUEZADA-EUÁN, J.J.G., PAXTON, R.J., MAY-ITZA,W.J. (2002). Paternity frequency and maternity of males in some stingless bee species. *Mol. Ecol.*, 2107-2113.

PAMILO, P. & CROZIER, R.H. (1981). Genetic variation in male haploids under deterministic selection. *Genetics*, 98: 199-2141.

PAXTON, R.J., THORÉN, P.A., TENGO, J., ESTOUP, A., PAMILO, P. (1996). Mating structure and nestmate relatedness in a communal bee, *Andrena jacobí* (Hymenoptera, Andrenidae), using microsatellites. *Mol. Ecol.*, 5: 511-519.

PAXTON, R.J., WEIBSCHUH, N., ENGELS, W., HARTFELDER, K., QUEZADA-EUÁN, J.J.G. (1999a). Not only single mating in stingless bees. *Naturwissenschaften*, 86: 143-146.

PAXTON, R.J., WEIBSCHUH, N., QUEZADA-EUÁN, J.J.G. (1999b). Characterization of dinucleotide microsatellite locos for stingless bees. *Mol. Ecol.*, 8: 685-702.

PAXTON, R.J. (2000). Genetic structure of colonies and a male aggregation in the stingless bee *Scaptotrigona postica*, as revealed by microsatellites analysis. *Insectes Soc.*, 47: 63-69.

PÉPIN, L., AMIGUES, Y., LEPINGLE, A., BERTHIER, J.L., BENSAID, A., VAIMAN, D. (1995). Sequence conservation of microsatellites between *BOS taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. *Heredity* 74: 53-61.

PETERS, J.M., QUELLER, D.C., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L., STRASSMANN J.E. (1998). Microsatellite locos for stingless bees. *Mol. Ecol.*, 7: 783-792.

PETERS, J.M., QUELLER, D.C., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L., ROUBIK, D. W., STRASSMANN J.E. (1999). Mate number, kin selection and social conflicts in stingless bees and honeybees. *Proc. R. Soc. London B*, 266: 379-384.

PROCTOR, M., YEO, P. (1996). *The natural history of pollination*. Harper Collins Publishers. London, 479p.

SCHILDER, K., HEINZE, J., GROSS, R., HOLLDÖBLER, B. (1999). Microsatellites reveal clonal structure of population of the thelytokous ant *Platythyrea punctata* (F. Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *Mol. Ecol.*, 8: 1497-1507.

SCHNEIDER, S., ROESSLI, D. EXCOFFIER, L. (2000) ARLEQUIN version 2.000: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

SHAO, Z.Y., MAO, H.X., FU, W.J., ONO, M., WANG, D.S., BONIZZONI, M., ZHANG, Y.P. (2004). Genetic structure of Asian populations of *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae). *J. Hered.*, 95(1): 46-52.

SIA, E.A., JINKS-ROBERTSON, S., PETES, T.D. (1997). Genetic control of microsatellite stability. *Mutation Research*, 383: 61-70.

SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R., ALMEIDA, E.A.B. (2002). Abelhas Brasileiras: sistemática e identificação. Belo Horizonte, 41-42p.

STATFORTH. Statistica for Windows. (1997). <http://www.statsoft.com>.

STRAND, M., POLLA, T.A., LISKAY, R.M., PETES, T.D. (1993). Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutation affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365:274-276.

TAUTZ, D., RENZ, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.*, 12: 4127.

TREGENZA, T., BUTLIN, R.K. (1999). Genetic diversity: do marker genes tell us the whole story? In *Evolution of Biological Diversity* (A.E. Magurran e R.M.May, eds.). Oxford University press, Oxford, UK. 37-55p.

UNRH, T.R., MESSING, H. (1993). Intraspecific biodiversity in Hymenoptera: implications for conservation and biological control. In *Hymenoptera and diversity* (J. LaSalle e I.D. Gauld, eds.), CAB International, Oxon, UK. 27-52p.

VIANA, B.V., MELO, G.A.R. (1987). Conservação de abelhas. *Informativo Agropecuário*, 13 (149).

VIGINIER, B., PEETERS, C., BRAZIER, L., DOUMS, C. (2004). Very low genetic variability in the Indian queenless ant *Diacamma indicum*. *Mol. Ecol.*, 13: 2095-2100.

WALDSCHMIDT, A.M., SALOMÃO, T.M.F., BARROS, E.G., CAMPOS, L.A.O. (1997). Extraction de genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Braz. J. Gen.*, 20:421-423.

WALDSCHMIDT, A.M., BARROS, E.G., CAMPOS, L.A.O. (2000). A molecular marker distinguishes the subspecies *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). Gen. Mol. Biol. 23:609-611.

WIDMER, A., SCHMID-HEMPEL, P., ESTOUP, A., SCHOLL, A. (1998). Population genetic structure and colonization history of *Bombus terrestris* s.l. (Hymenoptera: Apidae) from the Canary Islands and Madeira. Heredity, 81: 563-572.

YEH, F.C., YANG, R., Boyle, T. (1999). POPGENE version 1.32: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Quick User Guide