

JULIANO NOGUEIRA

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Melipona capixaba* MOURE &
CAMARGO, 1994 (HYMENOPTERA: APIDAE), ESPÉCIE AMEAÇADA DE
EXTINÇÃO: SUBSÍDIOS PARA SUA CONSERVAÇÃO**

**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
2009**

JULIANO NOGUEIRA

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Melipona capixaba* MOURE &
CAMARGO, 1994 (HYMENOPTERA: APIDAE), ESPÉCIE AMEAÇADA DE
EXTINÇÃO: SUBSÍDIOS PARA SUA CONSERVAÇÃO**

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: 19 de março de 2009.

**Profa. Tânia Maria F. Salomão
(Co-orientadora)**

**Prof. Lucio A. de Oliveira Campos
(Co-orientador)**

Prof. Jorge A. Dergam dos Santos

Prof. Luiz Antônio dos Santos Dias

**Profa. Mara Garcia Tavares
(Orientadora)**

Ao Senhor, Deus do Universo.
À minha Mãe e Avós. Familiares e amigos que
se alegram com as minhas conquistas.

DEDICO

"Toda a ciência, comparada com a realidade,
é primitiva e infantil e, apesar de tudo,
é o que temos de mais valioso."

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, fé e esperança que me sustentam durante os desafios de minha vida. Meu porto seguro. *“Mesmo na tempestade, mesmo que se agite o mar. Te louvo, te louvo em verdade. Pois somente tenho a Ti. Tu és a minha herança. Te louvo, te louvo em verdade.”*

Ao Departamento de Biologia Geral e ao Programa de Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa.

À Secretaria de Estado de Educação e ao Governo do Estado de Minas Gerais, na pessoa da Secretária Estadual de Educação, Vanessa Guimarães Pinto, pela concessão de licença remunerada para minha qualificação profissional.

À Superintendência Regional de Ensino de Muriaé, na pessoa da Superintendente Regional de Ensino, Márcia Olivier Ferreira Dornelas, pelo parecer favorável à minha qualificação profissional.

À minha orientadora, Profa. Mara Garcia Tavares, por todos os ensinamentos, pela disponibilidade, compreensão, dedicação, paciência e confiança em mim depositada.

Aos meus Co-orientadores, Tânia Maria Fernandes Salomão e Lúcio Antônio de Oliveira Campos, pelos ensinamentos e importantes sugestões para uma melhor execução do trabalho.

Ao professor Jorge Dergam, pelas sugestões e apoio.

Ao Helder Resende pela ajuda nas análises, nos mapas e fotos.

Aos professores do Programa de Biologia Celular e Estrutural e das disciplinas que cursei, pelos ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora, professores Lucio A. de Oliveira Campos, Tânia Maria Fernandes Salomão, Jorge Dergam e Luis Antônio dos Santos Dias.

À Equipe que coletou as abelhas utilizadas no estudo.

Aos amigos do laboratório pelos ensinamentos nas técnicas de extração e amplificação do DNA e eletroforese: Marcília Nascimento, Aline Rocha, Margarete Wernek, Ana Waldschmith, Henrique Batalha e Denilce Meneses.

Aos demais amigos do laboratório que vieram ao longo do tempo e cuja convivência me proporcionou momentos que guardarei com carinho no meu coração.

Aos colegas de “república”, Renan, Paulo, Jorge, Diego e Nicolas, pelos papos descontraídos e pelo companheirismo.

Aos tantos colegas que fiz no curso das disciplinas, ficarão sempre em minhas lembranças os momentos de sufoco, de aprendizado e brincadeiras.

Aos colegas da SRE/Muriaé, que se alegraram com a minha conquista e pelo incentivo.

À minha família, que são tudo aquilo que eu sou.

À minha noiva, Rubia, e família, pelo incentivo, pelo amor e por sempre acreditar nos meus propósitos e sonhos. Rubia, te amo.

À Maria Santíssima , Mãe de Deus e minha, que intercede por mim junto a seu Filho e Senhor Jesus Cristo.

E a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Juliano Nogueira, filho de José Geraldo Nogueira e Maria Helena Nogueira, nascido em 02 de fevereiro de 1981, no Rio de Janeiro – RJ.

Em 1990, mudou-se para Muriaé – MG, onde vive até hoje. Concluiu o Ensino Fundamental na Escola Estadual Dr. Olavo Tostes, em 1994. Em 1997, concluiu o Ensino Médio na Escola Estadual Professor Orlando de Lima Faria.

Ingressou no serviço público estadual de Minas Gerais em maio de 2002, no cargo de Assistente Técnico Educacional, lotado na Superintendência Regional de Ensino de Muriaé, órgão da Secretaria de Estado de Educação.

Em 2003, ingressou no curso superior de Ciências Biológicas, da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras Santa Marcelina – FAFISM, de Muriaé – MG, tendo se graduado em dezembro de 2006.

Em março de 2007, iniciou o Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em 19 de março de 2009, sob orientação da Professora Mara Garcia Tavares.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. As abelhas sem ferrão.....	1
1.2. A importância das abelhas.....	7
1.3. Marcadores moleculares.....	9
1.4. Marcadores moleculares e estudos populacionais de Hymenoptera.....	11
1.5. Conservação e manejo de populações naturais	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Material genético.....	16
3.2. Características ambientais da região de estudo.....	17
3.3. Extração de DNA genômico.....	19
3.4. Reações de PCR e Eletroforese.....	20
3.5. Análise estatística dos dados.....	21
4. RESULTADOS E DICUSSÃO	24
5. CONCLUSÕES	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

RESUMO

NOGUEIRA, Juliano. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2009. **Variabilidade genética de *Melipona capixaba* MOURE & CAMARGO, 1994 (Hymenoptera: Apidae), espécie ameaçada de extinção: subsídios para sua conservação.** Orientadora: Mara Garcia Tavares. Co-orientadores: Lucio Antonio de Oliveira Campos e Tânia Maria Fernandes Salomão.

Melipona capixaba é uma espécie de abelha ameaçada de extinção, endêmica do Estado do Espírito Santo, mais especificamente restrita a formações florestais, em áreas montanhosas, de regiões próximas ao município de Domingos Martins (Região Serrana). O presente estudo teve como finalidade estimar a variabilidade genética de colônias de *M. capixaba*. Para tanto, foram utilizadas amostras de 95 colônias da espécie, oriundas de oito municípios capixabas. As amostras tiveram seu DNA extraído e submetido à amplificação e o produto da PCR foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose (1,5%). Um conjunto de dez *primers* de ISSR foi utilizado nas análises o que resultou em um total de 118 bandas, das quais 61,02% foram polimórficas. A diversidade genética de Nei (1973) e o índice de Shannon para a espécie foram estimados em 0,19 e 0,29, respectivamente. A matriz de distância genética apresentou baixas distâncias genéticas entre as colônias das 23 localidades amostradas e não houve relação entre as distâncias geográficas e genéticas. As análises de agrupamento (UPGMA), bem como as projeções tridimensionais mostraram a existência de estruturação genética, porém esta não tem relação com as distâncias geográficas. A AMOVA demonstrou que a maior parte da variabilidade é devida às variações existentes dentro das próprias localidades. Utilizando o software STRUCTURE, as colônias foram organizadas em quatro grupos e 25 subgrupos, diferindo das análises anteriores, o que possibilitou uma melhor separação das amostras. Esta divisão em grupos e subgrupos pode servir de ponto de partida para as estratégias de manejo e conservação.

ABSTRACT

NOGUEIRA, Juliano. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March of 2009.
Genetic variability of *Melipona capixaba* MOURE & CAMARGO, 1994 (Hymenoptera: Apidae), threatened of extinction species: subsidies for your conservation. Adviser: Mara Garcia Tavares. Co-advisers: Lúcio Antonio of Oliveira Campos and Tânia Maria Fernandes Salomão.

Melipona capixaba is a type of threatened of extinction bee, endemic of Espírito Santo State, more specifically restricted to forest formations, in mountainous areas, in mountainous areas, nearby the municipal district of Domingos Martins (Mountainous area). The present study had as purpose to esteem the genetic variability of colonies of *M. capixaba*. For this, samples of 95 colonies of the species were used, originated from eight municipal capixabas districts. The samples had their DNA extracted and submitted to the amplification and the product of PCR was examined by eletroforesis in agarose gel (1,5%). A group of ten primers of ISSR was used in the analyses what resulted in a total of 118 bands, from which 61,02% were polymorphics. Nei's genetic diversity (1973) and the index of Shannon for the species were evaluated in 0,19 and 0,29, respectively. The matrix of genetic distance presented low genetic distances among the colonies of the 23 selected places and there was not relationship among the geographical and genetic distances. The grouping analyses (UPGMA), as well as the three-dimensional projections showed the existence of genetic structuring, however this one doesn't have relationship with the geographical distances. AMOVA demonstrated that most of the variability is owed to the existent variations inside the places. Using the software STRUCTURE, the colonies were organized in four groups and 25 subdivisions, differing of the previous analyses, that made possible a better separation of the samples. This division in groups and subgrupos can serve as starting point for the handling strategies and conservation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. As abelhas sem ferrão

Das mais de 115.000 espécies da ordem Hymenoptera conhecidas (La SALLE & GAULD, 1993), o maior grupo é o Aculeata, que inclui as vespas, abelhas e formigas. Estima-se que existam mais de quatro mil gêneros e 16 mil espécies de abelhas distribuídas nas diferentes regiões do mundo (MICHENER, 2004).

Entre os diversos grupos de abelhas, a tribo Meliponini, abelhas indígenas sem ferrão, caracteriza-se pela presença de ferrão vestigial e, portanto, ineficiente para a defesa. A explicação para a perda do ferrão neste grupo de abelhas, provavelmente, está relacionada ao fato de a colônia não ficar exposta quando as abelhas enxameiam, e a construção dos ninhos ocorrer, geralmente, em lugares bem protegidos (ALONSO, 2001).

Estudos relativos ao comportamento dos meliponíneos demonstram que estas abelhas são capazes de defender suas colônias fechando a entrada do ninho quando são atacadas por outros insetos e, mesmo possuindo ferrão atrofiado, podem atacar os invasores com as mandíbulas, enrolando-se nos pelos, envolvendo-os com geoprópolis ou penetrando em orifícios dos inimigos de maior porte (NOGUEIRA NETO, 1997).

Os meliponíneos são todos eussociais. Eles formam grandes colônias, compreendendo de 500 a 4.000 adultos no caso da *Melipona*, ou de 300 a 80.000 no caso da *Trigona* e gêneros relacionados (MICHENER, 1979). Estas abelhas encontram-se amplamente distribuídas pelas regiões tropicais do planeta (WILLIE, 1979). Ao sul, sua distribuição chega até 35°S na Austrália e América do Sul e até 28°S na África (MICHENER, 2000). Ao norte, o limite de sua distribuição alcança o trópico de Câncer. Cerca de 400 espécies, englobando aproximadamente 50 gêneros (VELTHUIS, 1997) foram descritas. No entanto, esse número pode estar sendo subestimado devido ao grande número de espécies crípticas (MICHENER, 2000). A maior abundância e diversidade dessas abelhas ocorre nos neotrópicos. Nessas áreas, a tribo Meliponini está representada por cerca de 30 gêneros e aproximadamente 300 espécies (WILLIE, 1979; CAMARGO e PEDRO, 1992).

O gênero *Melipona* é o maior em número de espécies, cerca de 70 (SILVEIRA *et al.*, 2002), apresenta uma distribuição geográfica exclusivamente neotropical, abrangendo desde a Argentina até o México (KERR, 1969; MICHENER, 1979, 1990). No Brasil, o limite ao sul está no estado do Rio Grande do Sul, nas proximidades da fronteira com o Uruguai (NOGUEIRA-NETO, 1997).

A espécie *Melipona capixaba* (Figura 1) foi descrita por Moure e Camargo (1995) no Estado do Espírito Santo. Apresenta operárias robustas, de tamanho relativamente grande, comprimento total aproximado de 10,8 mm, cabeça e tórax predominantemente castanho-escuros, mesonoto negro muito liso e brilhante e tergos negros e brilhantes. Localmente ela é conhecida como “pé-de-pau”, em referência ao fato de os ninhos serem muitas vezes construídos na base do tronco de árvores, ou também como “uruçu-negra”. As primeiras observações de campo sugeriram que as colônias seriam originárias da região amazônica e que teriam sido transportadas para o estado do Espírito Santo. Porém, em visitas a apicultores do Espírito Santo, ficou confirmada a existência de colônias nativas desta nova *Melipona* (MELO, 1996). Pela forma da genitália, especialmente pelas valvas curtas, *M. capixaba* nitidamente pertence ao grupo *fasciata*. Distingue-se facilmente das espécies deste grupo, exceto de *M. boliviana*, pelo tegumento do mesonoto muito liso e brilhante. De *M. scutellaris*, a espécie mais próxima geograficamente, separa-se não só pelo tegumento do mesonoto liso e brilhante (em *scutellaris* mate e micro-rugoso), mas também pela pilosidade fusca do mesonoto e pelas faixas pré-marginais dos tergos metassomáticos quase nulas; em *scutellaris*, a pilosidade do mesonoto é fulvo-arruivada, as faixas pré-marginais dos tergos são largas, brancas e contrastantes. Entretanto, a presença de desenhos amarelos no clípeo e paroculares inferiores em *M. scutellaris* e *M. capixaba* sugere uma relação de espécies irmãs, sendo, pela estrutura da genitália, praticamente idênticas. (MOURE & CAMARGO, 1994)

A descoberta recente dessa espécie de meliponíneo no sudeste brasileiro foi surpreendente pelo fato de ser uma região que tem sido estudada há bastante tempo e por se tratar de uma abelha relativamente grande. Na verdade, a distribuição muito limitada desta espécie parece ser a responsável pelo atraso em sua descoberta. Esta espécie parece ser restrita a formações

florestais, em áreas montanhosas, de regiões próximas ao município de Domingos Martins – ES (MELO, 1996), atualmente presente no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, do Ministério do Meio Ambiente (2008). A *Melipona capixaba* possui *status* de espécie ameaçada de extinção e está classificada na categoria “vulnerável”.

Um táxon está vulnerável quando a melhor das evidências disponíveis indica que ele se enquadra em qualquer um dos seguintes critérios (A a E), devendo, pois, ser considerado um táxon que enfrenta alto risco de extinção na natureza:

A. Redução no tamanho da população baseada em qualquer dos seguintes critérios:

1. Uma redução no tamanho da população observada, estimada, inferida ou suspeita de $\geq 50\%$ durante os últimos 10 anos ou três gerações, qualquer que seja o mais longo, onde as causas da redução sejam claramente reversíveis e entendidas e cessadas, baseada (e especificada) em: a) observação direta; b) um índice de abundância apropriado para o táxon; c) um declínio na área de ocupação, na extensão de ocorrência e/ou na qualidade do habitat; d) níveis reais ou potenciais de exploração; e) efeitos de táxons introduzidos, hibridação, patógenos, competidores ou parasitas.

2. Uma redução no tamanho da população observada, estimada, inferida ou suspeita de $\geq 30\%$ durante os próximos 10 anos ou três gerações, qualquer que seja o mais longo, onde as causas da redução podem não ter cessado ou podem não ser entendidas ou podem não ser reversíveis, baseada (e especificada) em qualquer um itens (a) a (e) de A1 acima.

3. Uma redução no tamanho da população de $\geq 30\%$, projetada ou suspeita para os próximos 10 anos ou três gerações, qualquer que seja o mais longo, baseada (e especificada) em qualquer um itens (b) a (e) de 1ª (acima).

4. Uma redução no tamanho da população observada, inferida, estimada ou suspeita de $\geq 30\%$ durante 10 anos ou três gerações, qualquer que seja o mais longo (até um máximo de 100 anos no futuro), onde o período de tempo deve incluir tanto o passado como o futuro, e onde a redução ou suas causas podem não ter cessado ou podem não ser entendidas ou podem não ser reversíveis, baseada (e especificada) em qualquer dos itens (a) a (e) de A1 acima.

B. Distribuição geográfica na forma de B1 (extensão de ocorrência) ou B2 (área de ocupação) ou ambas:

1. Extensão de ocorrência estimada em menos de 20.000 km² e estimativas indicando, pelo menos, dois itens de a-c:

a) Severamente fragmentada ou conhecida em não mais que dez localidades;
b) Declínio contínuo observado, inferido ou projetado em: i) extensão de ocorrência; ii) área de ocupação; iii) área, extensão e/ou qualidade do habitat; iv) número de localidades ou subpopulações; v) número de indivíduos maduros; c) Flutuações extremas em: extensão de ocorrência; área de ocupação; número de localidades ou subpopulações e número de indivíduos maduros;

2. Área de ocupação estimada em menos de 2.000 km², e estimativas que indiquem, pelo menos, dois itens de a-c:

a) Severamente fragmentada ou conhecido em não mais que dez localidades.
b) Declínio contínuo observado, inferido ou projetado em: i) extensão de ocorrência; ii) área de ocupação; iii) área, extensão e/ou qualidade do habitat; iv) número de localidades ou subpopulações; v) número de indivíduos maduros;
c) Flutuações extremas em extensão de ocorrência; área de ocupação; número de localidades ou subpopulações e número de indivíduos maduros.

C. Tamanho da população estimado em menos de 10.000 indivíduos maduros e:

1. Um declínio contínuo estimado em pelo menos 10% no período de cinco anos ou de duas gerações, qualquer que seja o mais longo (até um máximo de 100 anos no futuro); ou

2. Um declínio contínuo observado, projetado ou inferido no número de indivíduos maduros e pelo menos um dos seguintes:

a) Estrutura da população numa das formas seguintes:

i) estima-se que nenhuma subpopulação contém mais de 1.000 indivíduos maduros; ou

ii) todos os indivíduos maduros estão em uma única subpopulação.

b) Flutuações extremas no número de indivíduos maduros.

D. População muito pequena ou restrita, numa das seguintes formas:

1. Estimada em menos de 1.000 indivíduos maduros.
2. População com área de ocupação (tipicamente menos de 20 km²) ou número de localidades (tipicamente cinco ou menos) de modo que ela esteja sujeita aos efeitos de atividade humana ou eventos estocásticos em período de tempo muito curto em futuro incerto e é portanto capaz de se tornar Criticamente em Perigo ou até Extinta em um período curto de tempo.

E. Análise quantitativa mostrando que a probabilidade de extinção na natureza é de, pelo menos, 10% em 100 anos.

A Melipona capixaba ou uruçú-negra, assim como as demais abelhas da subtribo Meliponini, é uma espécie social, cujas colônias são constituídas por duas castas femininas (a rainha e as operárias) e pelos machos (zangões). Suas colônias são permanentes, coletando alimento em excesso durante períodos de abundância, e armazenando-o, na forma de mel e saburá (pólen processado), para consumo em períodos de escassez. Os ninhos são construídos em ocos de árvore e são constituídos por potes (para armazenamento de alimento), favos de cria (onde os ovos são postos e as larvas se desenvolvem) e pelo invólucro, um conjunto de lâminas que provê isolamento térmico à cria em desenvolvimento. Todas essas estruturas são construídas com cerume, uma mistura de cera produzida pelas abelhas com resinas que coletam em plantas. O ninho é isolado do ambiente externo e de porções não utilizadas do oco onde foi construído pelo batume, que são paredes rígidas e porosas construídas com geoprópolis (resinas vegetais misturadas com barro). Diferentemente do que acontece na abelha melífera (*Apis mellifera*, também chamada abelha europa, do reino ou africanizada), a rainha da uruçú-negra e de outros meliponíneos, após iniciar seu trabalho de postura de ovos, nunca mais volta a voar e, por isto, suas colônias não podem abandonar os ninhos em caso de falta de alimento, ataque de inimigos naturais, incluindo predação pelo homem, ou devido a outras pressões ambientais. As colônias desta espécie são populosas, com alguns milhares de operárias. A espécie é criada em caixas rústicas por moradores locais, para extração de mel. Há informações de que cada colônia pode produzir mais de

10 litros de mel por ano (Melo, 1996). *Melipona capixaba* ocorre apenas na Mata Atlântica do Espírito Santo, sempre em altitudes elevadas (chegando a mais de 1.000 m de altitude). Ela é morfológicamente muito semelhante a *M. scutellaris*, uma espécie com distribuição na Mata Atlântica da região Nordeste, incluindo as florestas úmidas do interior da Bahia e de Pernambuco. É possível que elas sejam espécies-irmãs. Há evidências de hibridização quando colônias das duas espécies são mantidas juntas (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

O intenso desmatamento na região é a principal fonte de ameaça, impactando a espécie das seguintes formas: a) pela redução e fragmentação das florestas, com o isolamento de populações pequenas; b) pela eliminação dos substratos para nidificação, o que impede a reprodução das colônias em sua área de distribuição; e c) pela eliminação das fontes de alimento para a espécie, impedindo que colônias remanescentes sobrevivam. Além disto, como as demais espécies de seu gênero, a urucu-negra produz e armazena quantidades razoáveis de mel que é muito apreciado pelos habitantes locais. Isto a torna alvo da exploração predatória, quando seus ninhos são abertos e deixados, após a extração do mel, expostos à ação das intempéries e de inimigos naturais. Os ninhos são, também, transferidos para caixas que são levadas para meliponários, diminuindo as populações naturais nos remanescentes florestais. Cabe ressaltar que, além dos problemas normalmente associados à diminuição da variabilidade genética de pequenas populações isoladas de outros organismos, as abelhas parecem sofrer, ainda, de um problema especial. A redução da variabilidade genética de suas populações leva ao aumento da taxa de homozigose em locos gênicos responsáveis pela determinação do sexo dos indivíduos. Isto leva a que ovos diplóides, que normalmente originam fêmeas, produzam também machos. O nascimento de machos diplóides faz com que as operárias eliminem a rainha, o que pode levar ao enfraquecimento das colônias e, eventualmente, a sua morte.

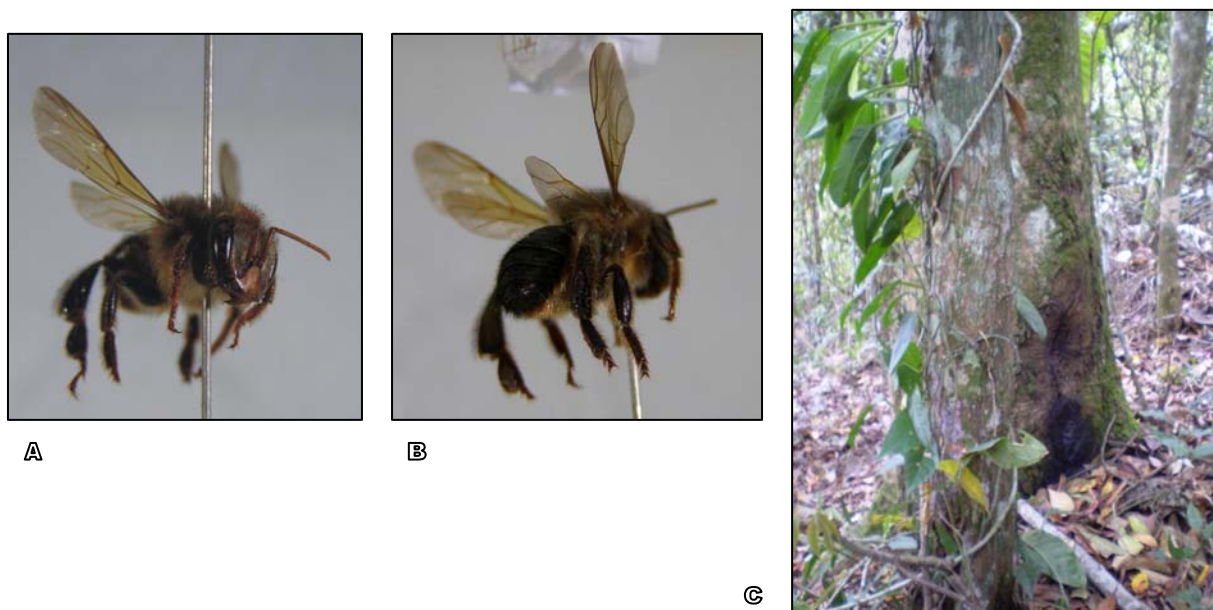


Figura 1 – A e B: *Melipona capixaba* (Moura & Camargo, 1994) e C: ninho de *Melipona capixaba* em um tronco de árvore. Fonte: Fotos de Helder Resende.

1.2. A importância das abelhas

As abelhas são importantíssimas para o homem e para o meio ambiente, tanto pelos produtos de valor comercial fornecidos (mel, própolis, cera e geléia real) quanto pelo aumento da produção de frutos e sementes de diversos vegetais de interesse agroflorestal pela polinização. Um terço da produção agrícola depende da polinização entomófila, sendo as abelhas responsáveis por 38% da polinização das plantas floríferas (KERR *et al.*, 2001).

Heard (1999) identificou aproximadamente 90 espécies de plantas cultivadas polinizadas pelas abelhas da tribo Meliponini. Além disso, nos ecossistemas naturais, estas abelhas desempenham papel importante na manutenção das comunidades de plantas e animais, por serem eficientes polinizadores de muitas espécies de angiospermas, que, por sua vez, são responsáveis pela produção de alimentos utilizados por aves e mamíferos (JANZEN, 1980; WIESE, 1985; FREE, 1993).

Apesar da importância das abelhas em diferentes ecossistemas, as mudanças causadas por atividades antrópicas têm promovido alterações nas

condições do seu habitat, comprometendo a diversidade devido à destruição de locais usados para nidificação, redução na disponibilidade dos recursos tróficos e eliminação de colônias naturais (O'TOOLE, 1993; KERR *et al.*, 1996; MATHESON *et al.*, 1996).

Os meliponíneos são muito frágeis quando expostos à destruição de seus habitats, pelo fato de a maioria das espécies nidificar em ocos de árvores que vêm sendo intensamente derrubadas. Estes insetos também são muito suscetíveis à redução do tamanho populacional, no sentido de que processos endogâmicos podem levar a consequências danosas, como o aumento na produção de machos diplóides (KERR *et al.*, 1996).

De acordo com Brown & Albrecht (2001), os meliponíneos apresentam grande susceptibilidade aos desmatamentos. Estes autores investigaram a quantidade de espécies do gênero *Melipona* em áreas com variados graus de desmatamentos na Amazônia, sugerindo que estas abelhas podem ser utilizadas como bioindicadores. A alta sensibilidade destes insetos é devida, entre outros fatores, à presença de um abdômen desenvolvido nas rainhas fecundadas, impossibilitando-as de voar. Assim, as rainhas não conseguem fugir de áreas com alguma perturbação, como desmatamentos ou queimadas. Além disso, o uso excessivo de defensivos agrícolas também tem contribuído para a extinção de espécies em muitos locais, uma vez que estes produtos são letais para elas. Nas espécies que nidificam subterraneamente, soma-se a destruição do solo pela aragem à preparação para ocupação agrícola e atividade pecuária. Finalmente, as abelhas sofrem com a intensa extração do mel por melieiros (KERR *et al.*, 2001; CASTRO, 2005). Neste processo, os ninhos são abandonados depois de o mel ter sido colhido e acabam sofrendo ataques de formigas ou outros animais.

Segundo o Ipema – Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica, o Espírito Santo, estado de ocorrência da *M. capixaba*, é prioridade mundial na conservação da biodiversidade, pois registra um dos maiores índices de endemismo e de riqueza biológica do planeta. Algumas das plantas e animais mais raros do mundo encontram abrigo na pequena área que sobrou da Mata Atlântica (restam hoje apenas cerca de 7% da cobertura vegetal original). Um quinto das espécies de animais e plantas do Espírito Santo estão ameaçadas de extinção. A extinção das espécies reflete de forma irrefutável o estado

avançado de degradação ambiental no Espírito Santo e, conseqüentemente, a queda da qualidade e quantidade de recursos essenciais à sobrevivência das espécies.

1.3. Marcadores Moleculares

Os primeiros trabalhos realizados sobre genética de populações eram baseados em polimorfismos de caracteres morfológicos, com observação da segregação de fenótipos. Posteriormente, as técnicas envolvendo os marcadores moleculares ou marcadores de DNA foram tomando espaço nas publicações sobre genética populacional. Isto ocorreu porque o DNA pode ser extraído de qualquer organismo, mesmo preservado em condições precárias (DOWLING *et al.*, 1996; PARKER *et al.*, 1998).

Adicionalmente, com o desenvolvimento da reação em cadeia da enzima polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR), que permite a amplificação *in vitro* de ácidos nucléicos, foram resolvidos os problemas relacionados à quantidade de DNA a ser utilizada nas reações em laboratório, o que favoreceu a aplicação e disseminação das técnicas com marcadores moleculares baseadas em PCR.

Existe um grande número de técnicas para a detecção de marcadores moleculares, podendo ser empregadas em diversos estudos, tais como o melhoramento genético de plantas, estudos de variabilidade genética em populações controladas e naturais, análise filogenética, análise filogeográfica e teste de paternidade (NAGAOKA e OGIHARA, 1997; ARCADE *et al.*; 2000; BUTCHER *et al.*, 2000; KUMAR *et al.*, 2001; RIZZA *et al.*, 2007; LÓPEZ-URIBE *et al.*, 2007).

A metodologia dos marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) foi desenvolvida por Zietjiewicz *et al.* (1994). As amostras de DNA utilizadas neste estudo foram extraídas de células sanguíneas e de amostras de tecidos de mamíferos de diversas ordens (Primatas, Scadentia, Chiroptera, Insetívora, Lagomorpha), de Aves, Peixes e Répteis. As Plantas foram representadas por soja, arroz, tomate e *arabidopsis*. Também foi utilizado amostras de DNA bacteriano (*Escherichia. coli*). As amostras foram submetidas à amplificação

utilizando-se os primers (CA)₈RG, (CA)₈RY, (CA)₇RTCY, BDB(CA)₇C, DBDA(CA)₇, VHVG(TG)₇T (R representa uma purina, Y uma pirimidina, B para uma base não-A, D para não-C, H para não-G e V para não-T). A análise dos produtos das amplificações revelou a consistência na diferenciação do padrão de bandas apresentado por cada grupo amostrado, o que indicou sua aplicabilidade em análises genéticas.

A técnica utiliza sequências microssatélites ou SSRs, as chamadas *Simple Sequence Repeats* (sequências simples repetidas), como *primers* para amplificação das regiões entre as sequências microssatélites. Os microssatélites são sequências pequenas de nucleotídeos (1 a 6 bases) repetidas em tandem. Essas sequências simples são bastante frequentes e distribuídas ao acaso no genoma dos eucariotas.

A técnica de ISSR consiste na amplificação da região que flanqueia a regiões microssatélites. Os *primers* ISSR são sequências microssatélites que possuem geralmente de 16 a 25 pb de comprimento não ancorados (GUPTA *et al.*, 1994) ou ancorados na extremidade 5' ou 3' por dois ou três nucleotídeos (WOLFE, 2005). Por exemplo, os *primers* (CA)₈RY e (CA)₈RG, em que R é uma purina e Y uma pirimidina, têm como alvo o mesmo número de repetições (oito repetições CA). No entanto, diferem no final, com um dinucleotídeo parcialmente degenerado. Esses segmentos não repetidos no final do *primer* podem variar, possuindo diferentes alvos de repetições CA, com diferentes localizações no genoma (ZIETJIEWCZ *et al.*, 1994).

O produto da reação de PCR-ISSR são sequências de diferentes tamanhos localizadas entre duas regiões repetidas de microssatélite idênticas, orientadas em direções opostas. Assim, o marcador identificado pela técnica do ISSR é considerado um marcador semiarbitrário.

A análise de ISSR é tecnicamente simples em comparação com outros tipos de marcadores. Os marcadores ISSR, entretanto, são dominantes, fazendo com que ao se observar uma banda ISSR no gel, não seja possível distinguir se aquele segmento de DNA se originou a partir de uma ou de duas cópias da sequência amplificada. A metodologia de ISSR proporciona alta reprodutibilidade dos resultados e detecta abundante polimorfismo em muitos sistemas (LIU & WENDEL, 2001) e, apesar de sua dominância (ZIETJIEWICZ *et al.*, 1994), tem provado ser útil em estudos de genética de populações

(WOLFE & LISTON, 1998; KUMAR *et al.*, 2001; BORBA *et al.*, 2005; ACETO *et al.*, 2005; PAPLAUSKIENÉ *et al.*, 2006; SLOTTA & PORTER, 2006; SOUZA *et al.* 2008).

1.4. Marcadores moleculares e estudos populacionais de Hymenoptera

O estudo da variabilidade genética, essencial para o controle e preservação das populações de abelhas indígenas, pode ser realizado com a utilização de técnicas que proporcionem uma visão mais ampla de suas características genotípicas.

São muitos os estudos moleculares realizados com abelhas que garantem a viabilidade das pesquisas com diversos marcadores moleculares para o maior conhecimento da estrutura e condição das populações naturais (SEGURA, 2000; WALDSCHMIDT *et al.*, 2000; BERESOVSKAYA *et al.*, 2002; JENSEN *et al.*, 2005; LÓPEZ-URIBE & DEL LAMA, 2007; STUCHI *et al.*, 2008).

Abot *et al.* (2001) avaliaram a possibilidade de detecção de variação por meio dos marcadores ISSR em quatro espécies de invertebrados: *Acyrtosiphon pisum* e *Pemphigus obesinymphae* (duas espécies de afídios partenogênicos), *Aedes aegypti* (mosquito transmissor da dengue e da febre amarela urbana) e *Philodina* (um rotífero assexuado). Os primers utilizados apresentaram um número distinto de bandas e percentual de bandas polimórficas para cada espécie. Além disso, foi possível observar a subdivisão das populações. Estes resultados comprovam a eficácia de utilização da técnica de ISSR em estudos de espécies animais.

Borba *et al.* (2004) realizaram estudos no sentido de mensurar o nível de diferenciação genética de linhagens de *Trichogramma*, mediante o emprego da técnica de ISSR. Cinco linhagens foram estudadas: três da espécie *T. pretiosum*, uma da espécie *T. atopovirilia* e uma da espécie *T. bruni*. Os 11 primers utilizados geraram 172 bandas polimórficas. A similaridade genética variou de 19-96%, permitindo concluir que a técnica ISSR é eficiente na identificação de polimorfismo de DNA em *Trichogramma*.

Estudos utilizando ISSR em abelhas, entretanto, são raros. Beresovskaya *et al.* (2002) realizaram um estudo para avaliar a possibilidade do uso de ISSR na obtenção de marcadores espécie-específicos para o gênero *Bombus*. Cinco espécies (*B. sylvarum*, *B. pascuorum*, *B. lapidarius*, *B. terrestris* e *B. hortum*) foram analisadas e a variabilidade genética entre elas foi estimada. Para as variações intra-específicas, 73% a 100% das marcas foram invariáveis, sendo o nível de variação diferente entre as espécies. Marcadores espécie-específicos foram detectados quando foram utilizados os *primers* ISSR (GTG)₇A e (AGC)₆. Os resultados obtidos mostraram que os marcadores ISSR podem ser úteis para auxiliar na resolução de problemas relacionados à classificação taxonômica existente neste gênero.

O método de ISSR, utilizado por Paplauskienė *et al.* (2006) para investigar polimorfismo entre duas subespécies de *Apis mellifera*, também foi eficiente na detecção da diversidade genética entre *A. mellifera carnica* e *A. mellifera caucasica*. Os primers utilizados evidenciaram marcadores específicos para cada subespécie, revelando diversidade entre as mesmas.

Nascimento (2008) utilizou a técnica de ISSR para estimar a variabilidade genética entre amostras de *Melipona quadrifasciata* de faixas contínuas e interrompidas, de dez localidades do Estado de Minas Gerais. Os dados obtidos demonstraram uma alta estruturação populacional entre as amostras analisadas, sugerindo que a espécie não se distribui de forma contínua pela área analisada e que a ocorrência de fluxo gênico entre os indivíduos de diferentes localidades é baixa ou inexistente, isso devido à fragmentação das áreas de floresta e também pela distância entre as localidades amostradas superior ao raio de vôo dos meliponíneos.

Dias (2008) estudou as relações genéticas, utilizando a técnica de ISSR, entre amostras de *M. mondury*, *M. rufiventris*, ambas associadas à Mata Atlântica, e uma terceira espécie, no trabalho, denominada *Melipona sp.*, de Cerrado. *M. rufiventris* e *M. mondury* são espécies geneticamente similares e conhecidas popularmente como urucu amarela. Foram utilizadas 79 colônias, oriundas de 10 localidades do Estado de Minas Gerais. As análises revelaram a formação de três grupos distintos, relativos às espécies amostradas.

1.5. Conservação e manejo de populações naturais.

A conservação e o manejo de populações naturais implicam a participação humana nos processos de proteção e utilização responsável dos recursos naturais disponíveis nas áreas de abrangência das mesmas. A Mata Atlântica, habitat original da *Melipona capixaba*, abriga inúmeras espécies globalmente importantes, em virtude do grau de ameaça que sofrem suas populações e por serem endêmicas ao bioma. Como ocorre em outras partes do mundo, tais características conferem a essas espécies um papel fundamental na conservação dos ecossistemas a que pertencem (VALLADARES-PADUA *et al.*, 2003). Elas podem ser usadas como espécies indicadoras e símbolos de alerta para a necessidade de conservação regional e como ponto focal para programas de conscientização pública e de educação, permitindo um importante complemento nos esforços de conservação no País.

Melipona capixaba pode ser relacionada como uma das espécies bandeira (MITTERMEIER *et al.*, 1999), podendo ser utilizada como símbolo para a conservação de seu bioma de ocorrência, principalmente em nível regional. Atualmente, as espécies bandeira e as outras espécies ameaçadas de extinção são utilizadas como indicadores para o monitoramento do estado da biodiversidade e para a identificação de estratégias de conservação *in situ*.

Pinto *et al.* (2006) argumentam que qualquer iniciativa para definição de estratégias de manejo de espécies ameaçadas e endêmicas passa, necessariamente, pela avaliação da quantidade e qualidade da informação disponível sobre a espécie. Para algumas das espécies ameaçadas da Mata Atlântica, o conhecimento científico existente permite indicar medidas necessárias para maximizar as chances de persistência local e regional (exemplo: o mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*). No entanto, para uma série de outras espécies ameaçadas, embora tenham sido alvo de constantes e bem qualificadas pesquisas científicas, o conjunto de conhecimentos permanece disperso entre os diversos pesquisadores e instituições envolvidas. A sistematização e a disponibilização dessas informações podem auxiliar no desenho de planos de manejo adequados a cada situação, bem como indicar que tipo de informação ainda é necessário. O cruzamento dos dados de diferentes trabalhos em diversas linhas de pesquisa também serviria para

identificar as áreas “insubstituíveis”, isto é, áreas de grande importância para que metas de conservação sejam alcançadas.

Ressaltam ainda que, as estratégias orientadas para a conservação da biodiversidade em todo o mundo têm enfatizado a necessidade de criação de unidades de conservação como o principal mecanismo para preservar amostras significativas de espaços naturais. Embora a maioria das unidades de conservação contribua para a preservação de uma fração significativa da diversidade biológica de regiões como a Mata Atlântica, o conhecimento científico acumulado no ramo da biologia da conservação tem indicado que são necessárias ações para conservação em escalas espaciais ainda mais abrangentes para manutenção dos processos ecológicos e evolutivos (SOULÉ *et al.*, 1979; FORMAN, 1995; WEINZ, 1996; SANDERSON *et al.*, 2003; FONSECA *et al.*, 2004).

A partir da década de 1990, o reconhecimento da pressão crescente sobre os remanescentes nativos e a noção de que as unidades de conservação não irão desempenhar a contento o seu papel se terminarem isoladas em paisagens degradadas levaram à constatação da necessidade de uma nova estratégia para a conservação da biodiversidade no Brasil e em outras regiões em todo o mundo.

De maneira geral, a discussão sobre o efeito da fragmentação de habitats e a persistência de espécies ameaçadas é focada no paradigma das metapopulações: com a diminuição dos fragmentos e o aumento do seu isolamento, as chances de extinção local aumentam e as possibilidades de recolonização diminuem (HANSKI, 1997). Estudos com espécies ameaçadas da Mata Atlântica, como o mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*) e a preguiça-de-coleira (*Bradypus torquatus*), têm demonstrado a perda da variabilidade genética e a situação crítica de suas populações remanescentes (ver GRATIVOL, 2004; LARA-RUIZ, 2004). Portanto, estratégias que promovam o aumento da conectividade funcional podem ser fundamentais para: i) a manutenção do fluxo genético, recompondo a variabilidade genética erodida por endogamia e deriva genética (LACY, 1993; BALLOU, 1997), e ii) aumento do tamanho efetivo das populações naturais, mantendo populações mínimas viáveis na área e reduzindo as chances de extinções regionais (GILPIN & SOULÉ, 1986; SOULÉ, 1987; LACY, 2000).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral o estudo da variabilidade genética de *Melipona capixaba*, espécie endêmica da região central do Estado Espírito Santo.

2.2. Objetivos específicos

- Estimar o nível de variabilidade genética de *Melipona capixaba* entre e dentro das localidades amostradas;
- Verificar se as populações estão geneticamente estruturadas;
- Analisar a influência da distribuição geográfica restrita sobre a variação genética em *M. capixaba*; e
- Propor metodologias para a preservação desta espécie.

Tabela 1 – Município, localidade, coordenadas geográficas e números de colônias de *M. capixaba* amostradas

Município (código)	Localidade (código)	Coordenadas geográficas		Nº de amostras
		Latitude (S)	Longitude (W)	
Alfredo Chaves (AL)	Matilde (MTD)	-20° 32' 56,4"	-40° 48' 03,6"	3
	São Roque de Maravilha (SRM)	-20° 33' 25,2"	-40° 51' 43,2"	1
	São Bento de Urânia (SBU)	-20° 30' 21,6"	-40° 53' 09,6"	9
Vargem Alta (VA)	Castelinho (CST)	-20° 30' 57,6"	-40° 59' 13,2"	4
	Vila Maria (VLM)	-20° 32' 13,2"	-40° 59' 34,8"	6
	Taquaruçu (TGU)	-20° 33' 54,0"	-40° 59' 13,2"	3
	São Brás de Maravilha (SBM)	-20° 34' 19,2"	-40° 57' 10,8"	1
	Ardisson (ARD)	-20° 33' 57,6"	-41° 00' 36,0"	1
Venda Nova do Imigrante (VN)	Alto Caxixe (ALC)	-20° 26' 42,0"	-41° 04' 19,2"	11
	Venda Nova do Imigrante (VNI)	-20° 18' 57,6"	-41° 07' 55,2"	4
Domingos Martins (DM)	Braço do Sul (BRS)	-20° 28' 40,8"	-41° 03' 50,4"	4
	Pedra Azul (PDA)	-20° 24' 50,4"	-41° 02' 20,4"	4
	Portal Pedra Azul (PPA)	-20° 23' 34,8"	-41° 01' 40,8"	2
	São Paulo do Aracê (SPA)	-20° 26' 13,2"	-41° 01' 22,8"	5
	Alto Jucu (AJC)	-20° 18' 36,0"	-41° 01' 48,0"	3
	Laginha (LGA)	-20° 15' 07,2"	-41° 03' 32,4"	13
	Tujuco Preto (TJP)	-20° 14' 34,8"	-40° 54' 57,6"	4
Afonso Cláudio (AF)	Alto Guandu (AGU)	-20° 14' 45,6"	-41° 04' 48,0"	3
Marechal Floriano (MF)	Victor Hugo (VTH)	-20° 24' 57,6"	-40° 54' 25,2"	3
Santa Teresa (ST)	São Pedro (SPD)	-19° 57' 10,8"	-40° 36' 21,6"	2
	Santa Teresa (STR)	-19° 56' 27,6"	-40° 35' 20,4"	1
Conceição do Castelo (CC)	Ribeirão do Meio (RBM)	-20° 16' 19,2"	-41° 16' 15,6"	5
	Conceição do Castelo (COC)	-20° 21' 46,8"	-41° 14' 42,0"	3

3.2. Características ambientais da região de estudo

A região de ocorrência da *Melipona capixaba* estudada (266.100 ha) é acidentada e chuvosa, (Figura 3), com temperatura média dos meses mais frios variando entre 7,3 a 9,4 °C e as médias dos meses mais quentes variando entre 25,3° e 27,8° C. Nesta região predominam os Latossolos - solos profundos e bem drenados. Está situada entre altitudes superiores a 800 metros, com atividades agrícolas a uma altitude inferior a 1.200 metros.

A cobertura vegetal original dos municípios observados apresentava, em sua maioria, formações florestais. Os municípios de Afonso Cláudio, Conceição do Castelo e Venda Nova do Imigrante eram totalmente cobertos por Floresta

Ombrófila Densa. Os municípios de Alfredo Chaves, Domingos Martins, Marechal Floriano e Santa Teresa apresentavam cobertura vegetal que alternava áreas de Floresta Ombrófila Densa com áreas de Floresta Ombrófila Aberta, enquanto os municípios de Castelo e Vargem Alta apresentavam áreas de Floresta Ombrófila Densa e áreas de Floresta Estacional Semidecidual. Desta forma, observa-se a presença de grandes formações vegetais originais comuns a áreas bastante úmidas e submetidas a regimes homogêneos quanto à distribuição de chuvas.

Atualmente, estima-se que nos municípios observados preservou-se aproximadamente 38% da cobertura vegetal original. Em termos absolutos, Domingos Martins apresenta a maior superfície de remanescentes florestais: 53.018 ha. É seguido por Alfredo Chaves (25.193 ha), Vargem Alta (17.558 ha), Afonso Cláudio (17.219 ha), Marechal Floriano (15.195 ha), Conceição do Castelo (10.654 ha), Santa Teresa (23.743 ha) e Venda Nova do Imigrante (6.272 ha) (EMCAPA/NEPUT, 1999).

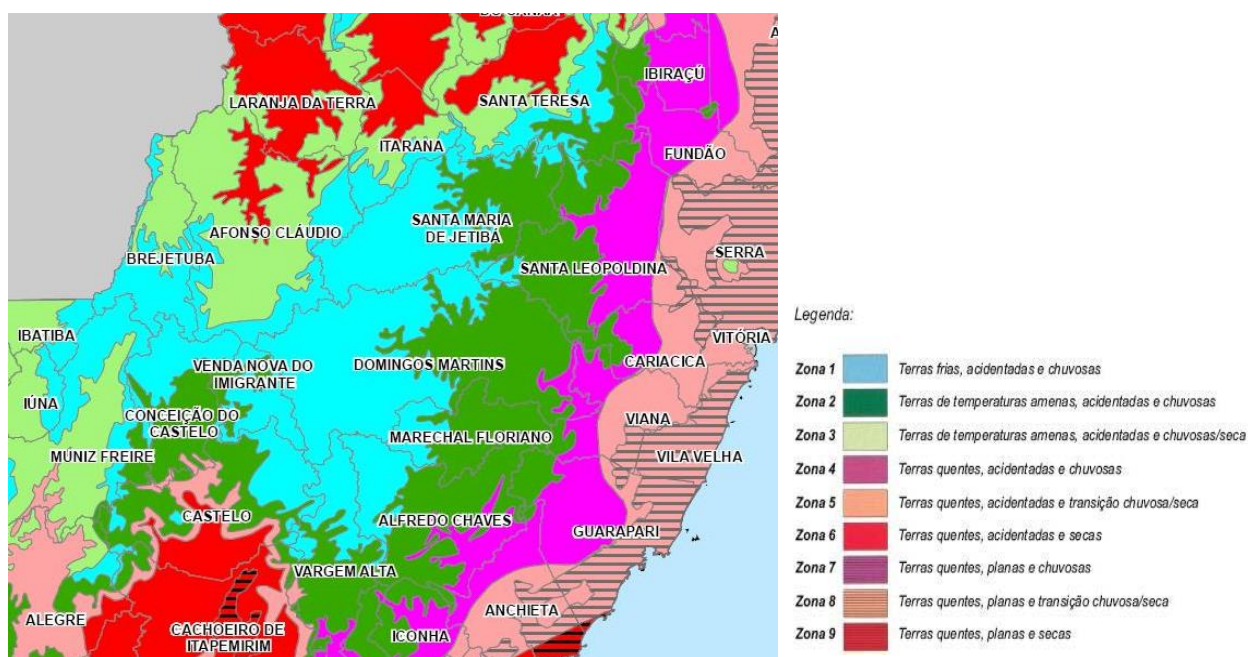


Figura 3 – Zonas Naturais do Estado do Espírito Santo. (Fonte: <http://www.ijsn.es.gov.br> acessado em 23/02/2009)

3.3. Extração de DNA genômico

A extração do DNA total das operárias *M. capixaba* foi realizada de acordo com o protocolo recomendado por Waldschmidt *et al.* (1997), com modificações propostas por Fernandes-Salomão *et al.* (2005). Para este trabalho, foi utilizado o DNA extraído de uma operária de cada uma das 95 colônias amostradas.

A cabeça e o mesossoma de cada indivíduo foram macerados com nitrogênio líquido em microtubo contendo 900 μ l de tampão de extração gelado constituído de: CTAB a 5% (Hexadecil Trimetil Brometo de Amônio); EDTA (Ácido Tetraacético Diamina Etileno) a 20 mM (pH 8,0); NaCl a 1,4 M; Tris-HCl a 100 mM (pH 8,0); e 100 μ g/ml de protease. O macerado foi incubado a 65 °C por 30 min. A primeira desproteínização foi feita com 1 volume de fenol-clorofórmio. A segunda foi feita utilizando-se uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1). Após cada desproteínização, o sobrenadante foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 min em microcentrífuga (Eppendorf Centrifuge 5415C). Em seguida, procedeu-se à adição de RNase, tendo sido utilizado 1 μ l da solução a 20 mg/ml para cada 100 μ l da mistura. A precipitação do ácido nucléico foi feita com 1 volume de isopropanol seguida de incubação a -20°C por 12 a 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 50 μ l 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 μ g/ml de brometo de etídio, para quantificar e verificar a integridade e pureza do DNA extraído.

Para as reações de amplificação do DNA, foram feitas diluições padronizadas em todas as amostras, ajustando-se a concentração final de DNA das amostras em 10 ng/ μ l.

3.4. Reações de PCR e Eletroforese

O conjunto dos *primers* utilizados foi obtido na Wmed Representações Ltda. Um total de 96 *primers* ISSR foi testado para a amplificação de fragmentos de DNA de *M. capixaba*. Com base no padrão de amplificação obtido, 15 *primers* foram selecionados para otimização das reações de PCR. Após a padronização e, considerando-se o número e resolução das bandas identificadas, 10 *primers* foram selecionados para as análises (Tabela 2).

As condições de amplificação foram ajustadas a partir da metodologia usada por Nascimento (2008), em seu estudo da variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata*. Cada reação consistiu de um volume total de 25 µL, contendo: 10 ng de DNA genômico, 5 µL do tampão 5X (Promega), 1,5 µL de MgCl₂ a 25 mM, 1 µL de cada *primer* a 5 µM, 2,0 µL da mistura de dNTPs a 100 mM, 0,25 µL de formamida e 1,0 U de GoTaq® DNA polimerase (Promega). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador *Mastercycler Gradient (Eppendorf®)*.

O programa de amplificação consistiu de um passo de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificação: 92°C por 1 min., 2 min à temperatura de pareamento do *primer* (que varia de acordo com o *primer* utilizado) e 2 min a 72 °C. Após os ciclos, o processo foi finalizado a 72°C, por 7 minutos e, em seguida, as amostras foram mantidas a 4°C. As reações foram acompanhadas por controle negativo contendo todos os componentes, exceto o DNA genômico.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese, em cuba horizontal, em gel de agarose 1,5% (p/v), contendo brometo de etídeo (0,2 µg/ml), mergulhado em tampão TBE 1X (Tris-Borato/EDTA), a uma voltagem de 100V, por quatro horas. Utilizou-se marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen). Decorrido o tempo de corrida de eletroforese, os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta, e a imagem foi capturada por um sistema de fotodocumentação (AlphaDigidoc 1201).

3.5. Análise estatística dos dados

Os indivíduos foram genotipados quanto à presença (1) e à ausência (0) de fragmentos, gerando uma matriz binária. Para tanto, foram considerados apenas os fragmentos inequívocos, sendo descartados aqueles com fraca intensidade ou baixa definição.

A partir da matriz binária de presença/ausência, foram estimados os seguintes parâmetros de diversidade: porcentagem de locos polimórficos (P), índice de diversidade de Shannon (I) (SHANNON, 1949) e a diversidade gênica de Nei (H_E) (NEI, 1973), assumindo-se que as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W). Contudo, nos organismos e/ou situações em que a proporção de heterozigotos não pode ser definida conforme as suposições de equilíbrio, a medida não deve ser chamada de heterozigosidade, devendo ser compreendida apenas como uma medida de variabilidade genética e chamada de índice de heterogeneidade ou índice de diversidade genética (TORGGLER *et al.*, 1995).

A variabilidade dentro e entre os municípios e localidades foi estimada a partir do cálculo da matriz de dissimilaridade a partir do complemento ($1-c$) do coeficiente de Jaccard (1908).

O índice Jaccard é definido como $S_j = a/(a+b+c)$. Nesse método, a matriz é formada pela comparação de cada par de genótipos de duas populações, o que possibilita a construção de uma tabela 2 x 2 com formato de contingência, utilizando-se das frequências das bandas observadas no gel. A Tabela 2, de contingência, apresenta as quatro combinações possíveis dos tipos de concordâncias.

Tabela 2 – Tabela de contingência com as quatro combinações de concordâncias e discordâncias possíveis para a estimativa do índice de Jaccard

		População <i>j</i>		Total
		Presença (1)	Ausência (0)	
População <i>i</i>	Presença (1)	a	b	a + b
	Ausência (0)	c	d	c + d
Total		a + c	b + d	n

$$n = a + b + c + d.$$

Na Tabela 2, as letras a, b, c e d assumem as seguintes representações:

a = presença de bandas em ambas as populações (1;1);

b = presença de banda na população *i* e ausência na *j* (1; 0);

c = ausência de banda em *i* e presença em *j* (0; 1); e

d = ausência de bandas em ambas as populações (0;0).

Com base na matriz de distância foi realizada uma análise de agrupamento pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages*). Nesse método, o critério utilizado para a formação dos grupos é a média da distância entre todos os pares de genótipos que formam cada grupo. A distância intergrupo é a média das distâncias pareadas dos membros dos dois grupos. Algebricamente, a distância entre os itens *i* e *j*, para $i \neq j$ é dada por:

$$d_{(ij)} = \text{mín} (d_{ij})$$

A distância do item *k* em relação ao primeiro grupo formado por *i* e *j*, com $k \neq i, j$, fica definida por

$$d_{(kij)} = 1/2 (d_{ik} + d_{jk})$$

e a distância entre os dois grupos (*ij*) e (*kl*), com $i, j \neq k, l$, é dada por

$$d_{(ij)(kl)} = 1/4 (d_{ik} + d_{il} + d_{jk} + d_{jl}).$$

Adicionalmente, foi calculado o respectivo coeficiente de correlação cofenética (CCC), que mede o grau de ajuste entre a matriz de dissimilaridade original e a matriz resultante da simplificação proporcionada pelo método de agrupamento (ROHLF e SOKAL, 1981).

Com base na matriz de dissimilaridade genética, gerada a partir dos dados binários, também foi realizado o agrupamento de Tocher (CRUZ & REGAZZI, 1997). Esse método de otimização requer a obtenção da matriz de dissimilaridades, sobre a qual será identificado o par de indivíduos mais similares. Estes indivíduos formarão o grupo inicial e a partir daí avalia-se a possibilidade de inclusão de novos indivíduos ao grupo, adotando o critério de

que a média das medidas de dissimilaridade dentro de cada grupo seja menor que as distâncias médias entre quaisquer grupos.

Foram realizadas projeções gráficas tridimensionais (3D), em que as medidas de dissimilaridade são convertidas em escores relativos a três variáveis (X, Y e Z) que, quando representadas em gráficos de dispersão, irão refletir, no espaço 3D, as distâncias originalmente obtidas a partir do espaço n-dimensional (n=número de caracteres utilizados para a obtenção das distâncias). Adicionalmente foram apresentados os percentuais de correlação, distorção e stresse originados da representação gráfica das distâncias genéticas.

A matriz binária também foi utilizada para a análise da partição da variância entre seus componentes dentro e entre os municípios e localidades, segundo a AMOVA – análise de variância molecular. Nesse método, a matriz de distância entre todos os pares de genótipos é utilizada em um esquema de análise de variância hierarquizada, produzindo estimativas de componentes de variância análogas às estatísticas F de Wright. A AMOVA foi usada para verificar a estruturação genética, considerando-se dois e três níveis hierárquicos, respectivamente. Esta análise foi realizada de acordo com Excoffier *et al.* (1992).

Para as análises citadas anteriormente foram empregados os programas POPGENE 1.31 (YEA *et al.*, 1999) e GENES (CRUZ, 2007), agrupando-se as amostras obtidas por localidade (23) e por município (8).

Foram realizadas ainda estimativas para a obtenção de um valor de K , representando o possível número de populações em que podem ser agrupadas as amostras com base em dados genéticos multilocos, por meio do software STRUCTURE 2.2 (FALUSH *et al.*, 2007). Este software requer que o usuário especifique o número de populações a serem detectadas entre as amostras. O algoritmo MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) foi utilizado para uma estimativa *a posteriori* da distribuição das origens dos indivíduos (PRITCHARD *et al.*, 2000; *et al.*, 2003).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização dos 10 *primers* seleccionados (Tabela 3) resultou em um total de 118 bandas, variando de 7 (primer 866) a 20 bandas (primer 890) por primer, com uma média aproximada de 12 bandas/primer.

Tabela 3 – Primers ISSR utilizados, suas respectivas sequências, número de fragmentos produzidos e temperaturas de pareamento empregadas

<i>Primers</i>	Sequência 5' – 3'*	Nº de bandas	Temperatura de anelamento (°C)
807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	14	54,8
808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	12	49,6
815	CRCTCTCTCTCTCTG	16	52,0
827	ACACACACACACACACG	11	54,8
836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	13	55,4
841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	9	50,7
866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	7	58,4
890	VHVGTTGTTGTTGTTGTTG	20	49,6
C	GTGGTGGTGGTGGTGRG	8	53,4
Terry	GTGGTGGTGGTGGTGRG	8	54,8
Total		118	

Y= C ou T; R= A ou G; V= A, C ou G

Dos 118 locos obtidos nas análises das 95 colônias, observamos que 72 foram polimórficos ($P = 61,02\%$). As análises realizadas considerando-se as 23 localidades amostradas mostraram que Laginha (DM) (38,14%), Alto Caxixe (VN) (36,44%) e São Bento de Urânia (AL) (33,05%) apresentaram os maiores percentuais de locos polimórficos. Quando as análises foram realizadas considerando-se apenas os oito municípios, Domingos Martins e Venda Nova do Imigrante apresentaram os maiores percentuais de polimorfismo, com 50,00% e 42,37% de locos polimórficos, respectivamente. Quando se consideram as médias percentuais de locos polimórficos dos 8 municípios e das 23 localidades analisadas (Tabela 4), os resultados (31,57% e 21,68%, respectivamente) podem ser considerados baixos.

Borba *et al.* (2005), por exemplo, trabalhando com linhagens de *Trichogramma* e utilizando 11 *primers* de ISSR, obtiveram uma média de 16 bandas por *primer* e polimorfismo bastante elevado, aproximadamente 96%. Este número foi superior ao encontrado por Paplauskienė *et al.* (2006) para duas subespécies de *Apis mellifera* (média de 6 bandas/*primer*), ao utilizar 11

primers ISSR. Dos 60 fragmentos obtidos, após amplificação do DNA de *Apis mellifera*, 66,7% foram polimórficos. Similarmente, Nascimento (2008), utilizando 11 *primers* ISSR para analisar colônias de *M. quadrifasciata*, obteve 147 bandas, das quais 59,18% eram polimórficas.

Os padrões de amplificação obtidos com dois dos *primers* utilizados no presente trabalho podem ser vistos na Figura 4.

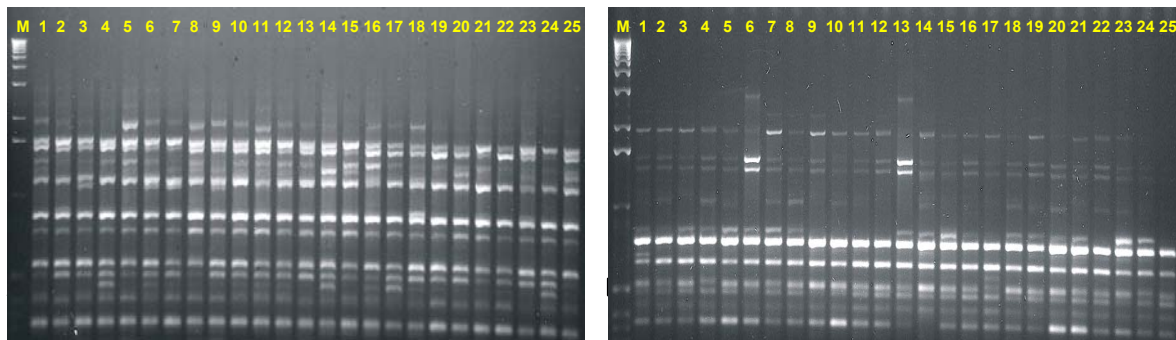


Figura 4 – Padrões eletroforéticos em gel de agarose a 1,5%, mostrando o perfil dos fragmentos produzidos pelos *primer* 807 (A) e 836 (B), em amostras de *Melipona capixaba*. M: Marcador de peso molecular:1Kb

A diversidade de Nei foi estimada em 0,19 o índice de Shannon foi de 0,29, quando analisadas em conjunto as 95 colônias representantes da espécie. Os valores médios de diversidade genética de Nei e do índice de Shannon para os oito municípios foram 0,12 e 0,17, respectivamente (Tabela 4). Estes valores diferem em muito, quando comparados com os obtidos por Souza *et al.* (2008) para *Zabrotes subfasciatus*, um inseto praga do feijão. Estes autores, utilizando 5 *primers* ISSR, encontraram uma proporção média de locos polimórficos de 83,82% e valores médios de diversidade de Nei e índice de Shannon de 0,29 e 0,41, respectivamente.

As hipóteses propostas para explicar o baixo nível de variabilidade genética verificada entre os himenópteros consideram como fatores importantes a haplodiploidia, a ocorrência de diferentes níveis de sociabilidade e a estabilidade ambiental dentro da colônia (GRAUR, 1985).

Tabela 4 – Estimativas de diversidade e estrutura genética de *M. capixaba* nos municípios e localidades analisadas

Municípios	N	H _e	I	P(%)
AL	13	0,14	0,20	39,83
VA	15	0,14	0,20	39,83
VN	15	0,15	0,22	42,37
DM	35	0,17	0,26	50,00
AF	3	0,05	0,07	11,86
MF	3	0,06	0,09	15,25
ST	3	0,07	0,10	16,95
CC	8	0,14	0,20	36,44
Média		0,12	0,17	31,57

*Localidades	N	H _e	I	P(%)
MTD	3	0,07	0,10	16,10
SBU	9	0,12	0,18	33,05
CST	4	0,07	0,10	17,80
VLM	6	0,12	0,18	31,36
TGU	3	0,04	0,06	11,86
ALC	11	0,13	0,19	36,44
VNI	3	0,10	0,15	25,42
BRS	4	0,08	0,11	20,34
PDA	4	0,10	0,15	26,27
PPA	2	0,03	0,05	8,47
SPA	5	0,09	0,13	26,27
AJC	3	0,07	0,10	17,80
LGA	13	0,14	0,21	38,14
TJP	4	0,07	0,10	19,49
AGU	3	0,05	0,07	11,86
VTH	3	0,06	0,09	15,25
SPD	2	0,04	0,06	9,32
RBM	5	0,11	0,16	28,81
COC	3	0,07	0,10	17,80
Média		0,08	0,12	21,68

N: nº de amostras; H_e: diversidade genética de Nei; I: índice de Shannon; P: porcentagem de locos polimórficos.

* Localidades representadas por uma colônia não estão relacionadas.

No sistema haplóide de diferenciação sexual, as fêmeas originam-se de ovos fecundados (diplóides) e os machos originam-se de ovos não fecundados (haplóides). Espera-se que os organismos haplodiplóides apresentem baixo polimorfismo porque todos os locos dos machos hemizigotos estão expostos à seleção. A haplodiploidia estaria, então, associada à redução do tamanho efetivo da população, aumento da taxa de fixação de alelos e prevenção da produção de polimorfismos estáveis. (PAMILO *et. al.* 1978). Porém, algumas espécies haplóides como os *sawflies* (Symphyta), apresentam níveis de

heterozigosidade similares àqueles de insetos diplóides, sugerindo que a haplodiploidia por si só não parece ser a responsável pelos baixos níveis de variabilidade genética em himenópteros (BORASCHI & DEL LAMA, 2004).

Além disso, o comportamento social reduz o tamanho efetivo da população, fazendo com que poucos indivíduos sejam responsáveis pela reprodução na colônia, elevando as taxas de endogamia (LESTER & SELANDER, 1979; BERKELHAMER, 1983).

Outro fator que pode ser relacionado é a estabilidade ambiental da colônia, proporcionado pela criação de um microhabitat parcialmente tamponado. Segundo a hipótese da variação-nicho descrita por Van Valen (1965), há uma tendência de aumento da heterozigosidade frente às variações ambientais. Variações estas que, de um modo geral, não ocorrem no interior das colônias de abelhas.

No caso específico de *M. capixaba*, além da haplodiploidia, o pequeno tamanho populacional pode estar influenciando diretamente a variabilidade genética da espécie, pois, juntamente com o comportamento social, este fator reduz o tamanho efetivo da população, elevando as taxas de endogamia. Adicionalmente, populações endêmicas, como as de *M. capixaba*, estão mais sujeitas aos efeitos da deriva genética (WRIGHT, 1931), podendo tornar-se possuidora de poucos alelos diferentes, em comparação com populações maiores, o que pode ser muito prejudicial se as condições ambientais mudarem (NOGUEIRA-NETO, 2000).

As distâncias genéticas verificadas entre as amostras agrupadas por localidades (Tabela 5) evidenciaram que as amostras de São Brás de Maravilha e Taquaruçu, ambas do município de Vargem Alta, foram as que apresentaram menor distância genética entre si (0,095), enquanto a maior distância (0,247) foi verificada entre os grupos de Venda Nova do Imigrante (Venda Nova do Imigrante) e Pedra Azul (Domingos Martins).

Os baixos valores de distância genética revelaram uma alta similaridade genética entre as populações amostradas, sugerindo que elas compartilham de um mesmo “pool” gênico. O que reforça esse argumento é o fato de localidades muito distantes geograficamente, como Santa Teresa (Santa Teresa) e São Roque de Maravilha (Vargem Alta), apresentarem uma baixa distância genética (0,121).

Tabela 5 – Matriz das distâncias genéticas, construída com base no complemento de Jaccard, entre operárias de *Melipona capixaba* das 23 localidades amostradas.

Populações	MTD	SRM	SBU	CST	VLM	TGU	SBM	ARD	ALC	VNI	BRS	PDA	PPA	SPA	AJC	LGA	TJP	AGU	VTH	SPD	STR	
MTD	***																					
SRM	0,120	***																				
SBU	0,157	0,157	***																			
CST	0,164	0,160	0,138	***																		
VLM	0,184	0,178	0,180	0,152	***																	
TGU	0,177	0,197	0,167	0,145	0,147	***																
SBM	0,161	0,159	0,152	0,144	0,162	0,095	***															
ARD	0,155	0,191	0,17	0,167	0,171	0,132	0,098	***														
ALC	0,186	0,186	0,188	0,178	0,179	0,132	0,138	0,160	***													
VNI	0,193	0,175	0,190	0,183	0,213	0,192	0,173	0,197	0,209	***												
BRS	0,179	0,176	0,194	0,172	0,190	0,146	0,147	0,165	0,159	0,220	***											
PDA	0,172	0,204	0,197	0,194	0,208	0,165	0,159	0,173	0,186	0,247	0,170	***										
PPA	0,182	0,156	0,175	0,162	0,198	0,191	0,171	0,189	0,199	0,199	0,205	0,203	***									
SPA	0,188	0,175	0,180	0,169	0,179	0,169	0,186	0,218	0,200	0,215	0,199	0,192	0,180									
AJC	0,192	0,175	0,164	0,164	0,180	0,170	0,162	0,197	0,194	0,198	0,192	0,187	0,187	0,153	***							
LGA	0,188	0,184	0,181	0,170	0,184	0,178	0,171	0,172	0,194	0,208	0,199	0,199	0,177	0,181	0,164	***						
TJP	0,155	0,154	0,187	0,167	0,203	0,189	0,194	0,194	0,195	0,185	0,184	0,196	0,179	0,198	0,202	0,194	***					
AGU	0,213	0,217	0,191	0,188	0,200	0,195	0,191	0,213	0,214	0,221	0,215	0,216	0,181	0,185	0,154	0,165	0,230	***				
VTH	0,149	0,157	0,132	0,104	0,153	0,132	0,144	0,167	0,168	0,162	0,175	0,174	0,163	0,161	0,145	0,162	0,152	0,182	***			
SPD	0,147	0,167	0,168	0,131	0,176	0,163	0,184	0,166	0,190	0,199	0,181	0,186	0,204	0,194	0,194	0,187	0,152	0,237	0,125	***		
STR	0,155	0,120	0,156	0,140	0,178	0,162	0,158	0,211	0,191	0,160	0,187	0,198	0,155	0,173	0,177	0,183	0,151	0,209	0,109	0,152	***	
RBM	0,190	0,190	0,171	0,167	0,200	0,184	0,160	0,180	0,205	0,195	0,196	0,204	0,194	0,192	0,171	0,184	0,206	0,199	0,158	0,187	0,173	
COG	0,154	0,162	0,164	0,149	0,183	0,170	0,165	0,182	0,199	0,170	0,188	0,190	0,174	0,184	0,168	0,181	0,180	0,188	0,137	0,181	0,158	

Os códigos das localidades são os mesmos da Tabela 1.

As análises de agrupamento realizadas, considerando-se oito municípios revelaram a formação de quatro grupos: Grupo 1: Afonso Cláudio; Grupo 2: Venda Nova do Imigrante, Domingos Martins e Conceição do Castelo; Grupo 3: Vargem Alta e Alfredo Chaves; Grupo 4: Santa Teresa e Marechal Floriano (Figura 5). A análise das 23 localidades também evidenciou uma estruturação genética, apesar de em todos os grupos observar-se a presença de localidades de municípios diferentes (Figura 6).

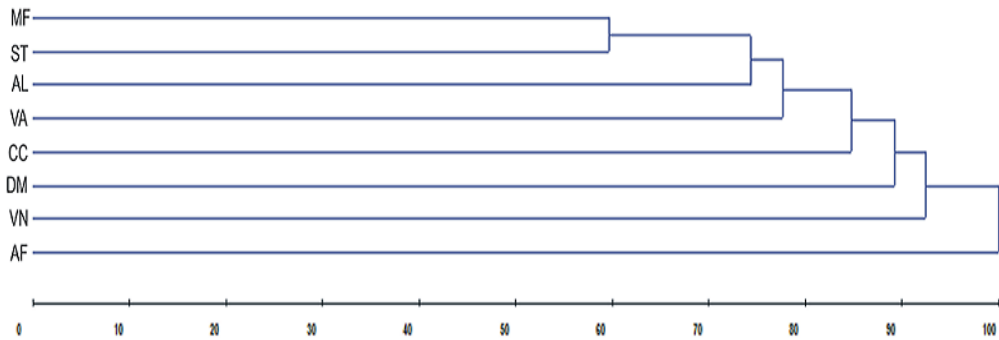


Figura 5 – Dendrograma de similaridade genética, obtido pelo método UPGMA, entre as amostras de *M. capixaba* agrupadas pelo município de coleta. Os códigos são os mesmos da Tabela 1. Correlação cofenética (CCC): 0,85.

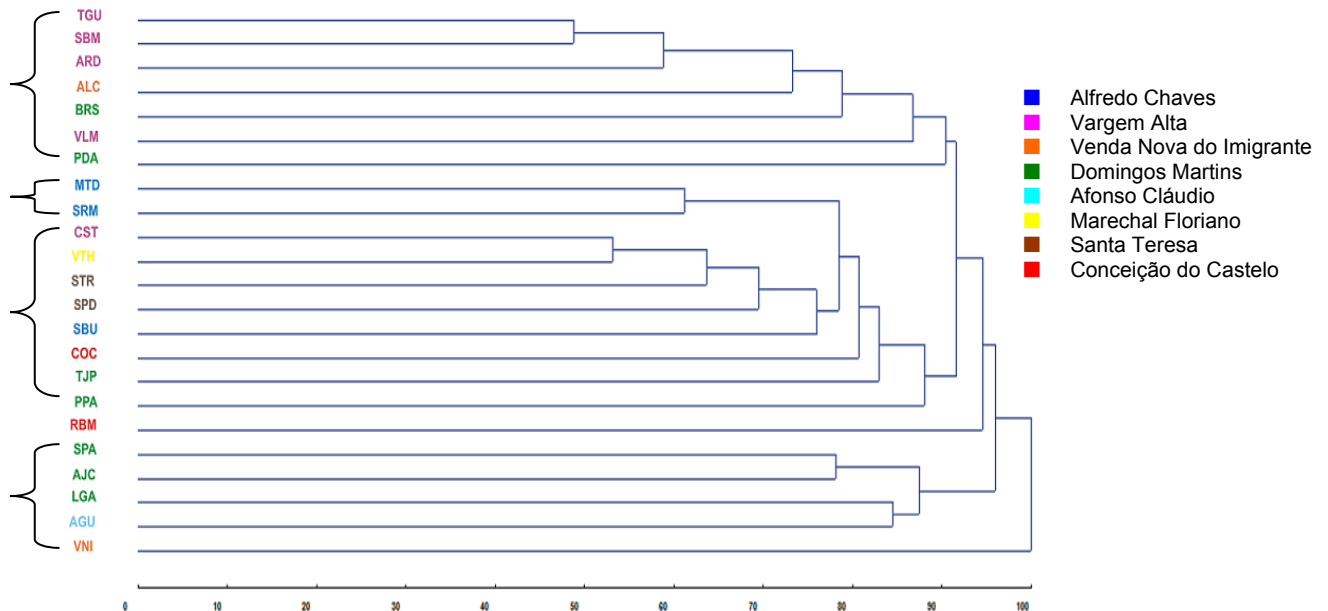


Figura 6 – Dendrograma de similaridade genética, obtido pelo método UPGMA, entre as amostras de *M. capixaba* agrupadas pela localidade de coleta. Os códigos são os mesmos da Tabela 1. Correlação cofenética (CCC): 0,72.

Os coeficientes de correlação cofenética obtidos nos dois dendrogramas (CCC= 0,85 e 0,72 , respectivamente) mostraram um bom ajuste entre a representação gráfica das distâncias e a sua matriz original (ROHLF, 2000), o que de imediato evidencia boa confiabilidade na realização de inferências por meio da avaliação visual.

A projeção das distâncias genéticas, entre os municípios analisados, no espaço tridimensional (Figura 7) demonstra, mais uma vez, a formação de grupos. Nota-se um grupo central formado pelas amostras dos municípios de Venda Nova do Imigrante, Alfredo Chaves, Marechal Floriano e Vargem Alta e Domingos Martins. A projeção das distâncias genéticas entre as 23 localidades analisadas também evidenciou a formação de grupos com localidades de municípios diferentes. Novamente, os coeficientes de correlação entre as distâncias originais e as estimadas (0,82 e 0,70), obtidos para as duas análises, demonstram um bom ajuste entre a distância genética e as distâncias representadas graficamente.

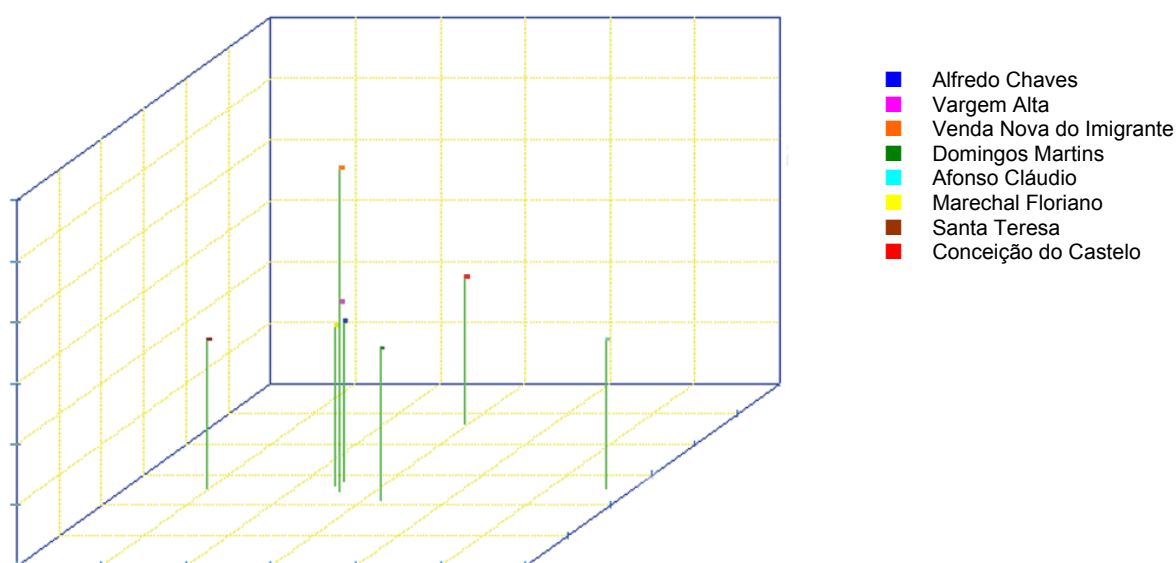


Figura 7 – Projeção tridimensional, no plano, das distâncias genéticas entre as oito populações de *M. capixaba*. Correlação: 0,82. Distorção: 20,45%. Estresse: 29,74%.

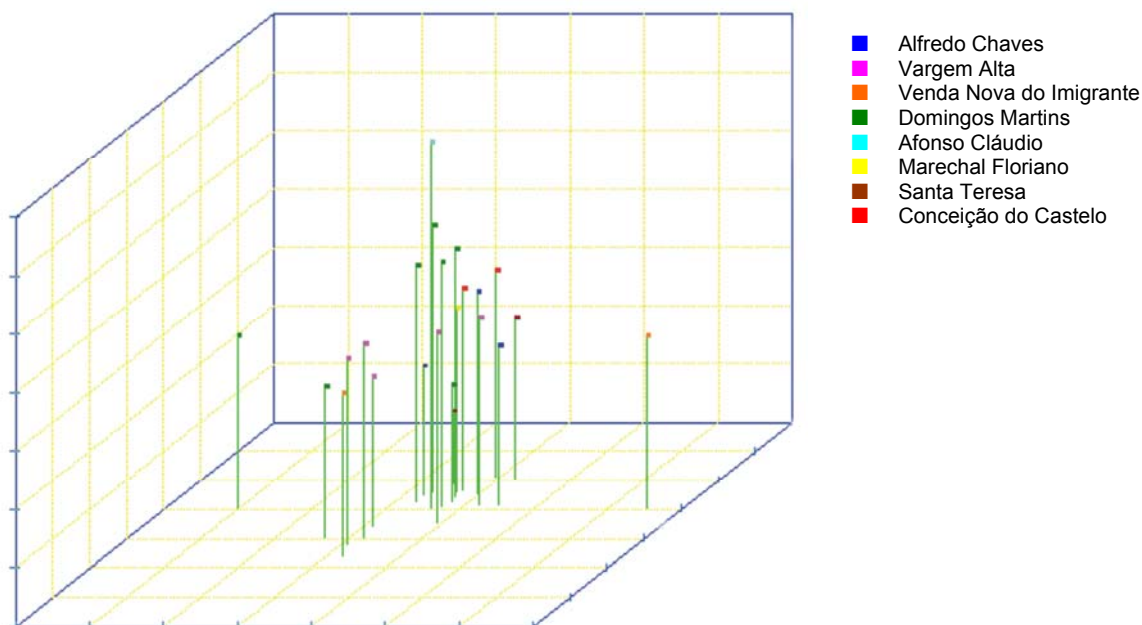


Figura 8 – Projeção tridimensional, no plano, das distâncias genéticas entre as 23 populações de *M. capixaba*. Correlação: 0,70. Distorção: 31,91%. Estresse: 38,51%.

As análises de agrupamento de otimização de Tocher, considerando os oito municípios, revelaram a formação de um grupo predominante, porém com uma baixa distância entre grupos (Tabela 6). Quando foram consideradas as 23 localidades, este procedimento destacou a formação de um grupo maior, no qual predominaram as amostras da região de Vargem Alta e Alfredo Chaves. As amostras de Domingos Martins se encontram distribuídas em 4 dos 6 grupos formados (Tabela 7). Não foi verificada, portanto, a formação de grupos correspondentes às regiões estudadas (Figura 6).

Tabela 6 – Agrupamento otimizado de Tocher considerando-se as oito populações de *M. capixaba* amostradas. Os códigos são os mesmos da Tabela 1

Grupos	Municípios
1	MF, ST, AL, VA, CC, DM
2	VN
3	AF

Maior distância intergrupo: 0,18

Tabela 7 – Agrupamento otimizado de Tocher considerando-se as 23 populações de *M. capixaba* amostradas. Os códigos são os mesmos da Tabela 1.

Grupos	Populações
1	TGU (VA), SBM (VA), ARD (VA), CST (VA), SBU (AL), MTD (AL), SRM (AL), STR (ST), SPD (ST), ALC (VN), VTH (MF)
2	SPA (DM), AJC (DM), LGA (DM), AGU (AF)
3	VNI (VN), COC (CC), TJP (DM)
4	BRS (DM), PDA (DM)
5	PPA (DM), RBM (CC)
6	VLM (VA)

Maior distância intergrupo = 0,19

O resultado da AMOVA confirmou o baixo grau de subdivisão das populações de *M. capixaba* analisadas (Tabela 8). Quando foram considerados apenas dois níveis hierárquicos (diferenças dentro e entre diferentes municípios) verificou-se que apenas 5% da variação genética total é devida às diferenças entre as amostras obtidas em municípios distintos. Quando se considerou a estruturação genética dentro e entre municípios e localidades (AMOVA com três níveis hierárquicos), observou-se que 27,20% da variação genética total se devem à diversidade genética existente entre as populações de diferentes localidades, enquanto 79,08% é devida às variações existentes dentro das próprias localidades.

Os valores de Φ_{st} para as análises em dois níveis (0,05) e três níveis hierárquicos (0,209) acusam que existe estruturação genética entre as amostras de *Melipona capixaba*, no entanto, esta não tem relação com a divisão geográfica das amostras.

Nascimento (2008), analisando populações de *M. quadrifasciata*, verificou que a análise de variância molecular com dois níveis hierárquicos (entre localidades e dentro das localidades), mostrou um percentual de variação maior entre as localidades do que dentro de localidades e o Φ_{st} nestas condições foi de 0,53. Na análise realizada com três níveis hierárquicos

Tabela 8 – Análise de Variância Molecular para as 95 colônias de *Melipona capixaba* analisadas, considerando-se dois e três níveis hierárquicos, respectivamente. GL: grau de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; Estimativa: estimativa dos componentes de variância.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	Estimativa	%
Entre os Municípios	7	1693,870	241,981	8,158	5,00
Dentro dos Municípios	87	13485,730	155,008	155,008	95,00
Total	94	15179,600	161,485	163,166	100,00
Índice de fixação: Φ_{st}: 0,05					
Fontes de variação	GL	SQ	QM	Estimativa	%
Municípios	7	1693,870	241,981	-10,768	-6,28
Entre as Localidades	15	3721,643	248,100	46,650	27,20
Dentro das Localidades	72	9764,087	135,612	135,612	79,08
Total	94	15179,600	161,485	171,494	100,00
Índices de fixação: Φ_{sg}: 0,256 Φ_{gt}: -0,0628 Φ_{st}: 0,2092					

(entre grupos, entre localidades dentro dos grupos e dentro de localidades) considerando tanto o agrupamento obtido pelo método UPGMA quanto o formado pelo padrão de faixas terçais, o percentual de variação entre os grupos foi menor do que entre localidades dentro dos grupos. Para os grupos formados pelo UPGMA, o Φ_{st} foi 0,54 e para os grupos formados com base nas faixas terçais foi de 0,56.

No estudo da variabilidade genética *Melipona mondury*, *Melipona rufiventris*, *Melipona* sp, a análise de variância molecular (AMOVA), realizada com dois níveis hierárquicos (considerando-se cada espécie em separado e a diferenciação dentro e entre localidades) demonstrou um maior percentual de variação entre do que dentro das localidades para *M. mondury* e *Melipona* sp. O índice de estruturação genética (Φ_{st}) para cada espécie demonstrou que todas estão estruturadas. *M. mondury* e *Melipona* sp. apresentaram maiores valores de ϕ_{st} (0,72 e 0,88 respectivamente) do que *M. rufiventris* (ϕ_{st} = 0,20). Considerando-se três níveis hierárquicos (entre espécie, entre localidades e dentro de localidades) e os três grupos obtidos nas análises de agrupamento, observou-se um percentual de variação entre espécie menor (28,18 %) do que

entre localidades (48,77 %). Esta estruturação genética pode ser confirmada pelo valor do Φ_{st} (0,77) entre os grupos formados (DIAS, 2008).

Um dos fatores que determinam a distribuição da diversidade genética entre e dentro das populações é o fluxo gênico. A maior concentração da variabilidade genética dentro das localidades está possivelmente relacionada com um fluxo gênico restrito ou ausente entre indivíduos das diferentes localidades, podendo acarretar um alto índice de endogamia dentro das localidades.

Fatores não evolutivos também podem estar influenciando a estruturação genética de *M. capixaba*. A degradação dos habitats e a fragmentação das coberturas vegetais na área de endemismo podem contribuir para o isolamento das populações e afetar a estrutura genética da espécie.

De acordo com Templeton & Georgiadis (1996), a baixa diferenciação genética entre populações pode ser explicada por outros dois mecanismos: 1) inicialmente haveria uma grande população ocupando uma área de distribuição geográfica, um grupo panmítico com fluxo gênico homogeneizante entre as populações de localidades diferentes. Neste caso, a fragmentação dos habitats devido à atividade humana isolaria as populações em pequenas subpopulações, impedindo o fluxo gênico entre elas e, 2) a distribuição da variação genética poderia ser o reflexo de um alta taxa de migração entre as populações, mas não a ponto de garantir uma completa mistura genética entre as populações, o que resultaria em uma total homogeneidade genética entre elas. Esta possibilidade pode ser embasada pela correlações entre as distâncias genéticas e geográficas. Estes dois mecanismos de diferenciação genética poderiam ser utilizados alternativas para explicar a dinâmica populacional da *M. capixaba* ao longo dos anos de fragmentação ambiental da sua área de distribuição. Tomando como base a hipótese de que a espécie se apresentava como uma grande população panmítica, a fragmentação do ambiente teria separado esse grupo em populações que ainda apresentaram fluxo gênico suficiente para impedir uma alta diversidade entre os grupos.

Foram realizadas ainda análises com o objetivo de identificar grupos com base nas informações genéticas, alocando os indivíduos (probabilisticamente) em um dos K grupos (de 2 a 6, no presente estudo), previamente determinados. Rosenberg *et al.* (2002) utilizaram esta mesma metodologia, utilizando 377 locos autossômicos microsatélites para analisar 1056 indivíduos de 52 populações de diversas partes do mundo. Eles identificaram seis grupos genéticos, cinco dos quais correspondentes às maiores regiões geográficas e subgrupos dentro destas regiões.

Assim, no presente trabalho, as 95 colônias de *M. capixaba*, identificadas pelo município e localidade de coleta, foram utilizadas para se estimar o melhor número de possíveis populações (k) ao qual se ajustariam as amostras. A estimativa do K , entretanto, é computacionalmente difícil de ser feita e, este método fornece apenas uma aproximação *ad hoc* e a interpretação biológica pode não ser fácil. Desta forma, por inferência Bayesiana, os indivíduos foram agrupados (probabilisticamente) a uma ou mais populações. Para estimar a estruturação foram utilizados os métodos de cadeia de Markov e Monte Carlo, de maneira que foi calculada, para cada indivíduo, a probabilidade de um dado genótipo (X) fazer parte de uma dada população K : $\ln \Pr(X/K)$. Foram estimadas as probabilidades para valores de K que variaram de um até 6. Para testar a regularidade dos resultados, cada valor de K foi estimado duas vezes independentemente a partir de 100.000 iterações.

O resultado que apresentou o melhor ajuste ocorreu quando proposto $K = 4$, sugerindo a formação de quatro grupos mais distintos (as quatro cores, que representam os grupos, mais bem separados na Figura 9). A estimativa de $K = 4$ é suportada pela melhor separação dos grupos e apresentou um valor estimado para o F_{ST} (0,179). Para os indivíduos representados por mais de uma cor, assume-se uma delas, a de maior predominância. Um quinto grupo foi formado pelas amostras cuja a associação a um grupo foi mais dificultada.

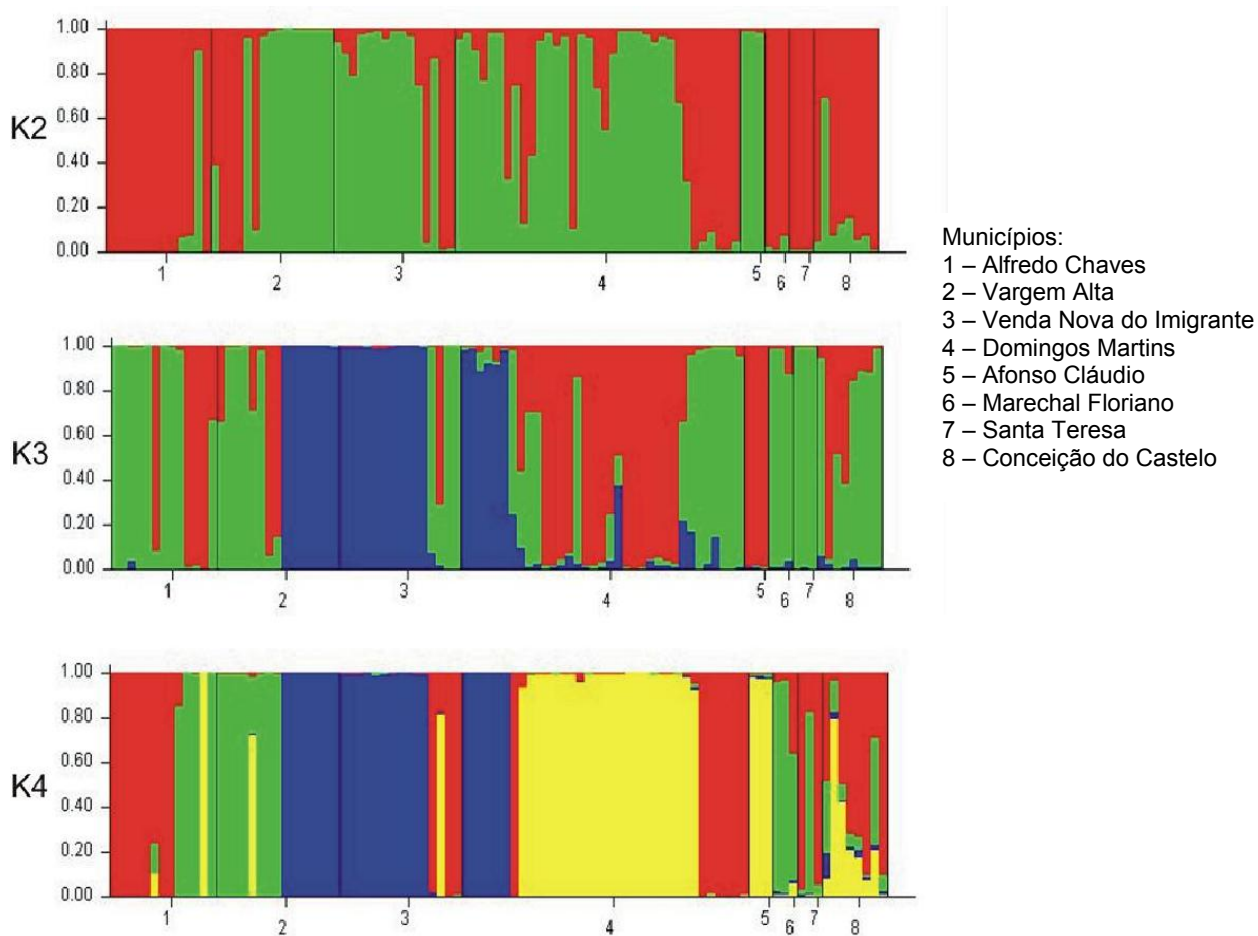


Figura 9 – Populações (K) estimadas para as amostras de *M. capixaba*. Os municípios estão divididos em segmentos separados por linhas pretas verticais e numerados de 1 a 8, conforme legenda. As cores representam as K populações propostas. A coluna numérica vertical representa a possibilidade *a posteriori* de a amostra pertencer a uma das K populações.

Nota-se que a divisão estimada em $K=4$ populações apresenta um grupo composto (em vermelho) pelas colônias provenientes de Matilde, São Roque Maravilha e quatro colônias de São Bento de Urânia, exatamente as colônias coletadas nas propriedades de Silvestre Casagrande e Pedro Cebin, todas provenientes do município de Alfredo Chaves. Este grupo contém ainda três das colônias provenientes de Venda Nova do Imigrante (município de Venda Nova do Imigrante), as colônias de Tijuco Preto e duas colônias amostradas da propriedade de Job Pereira Pinto, de Laginha (município de Domingos Martins) e ainda a maioria das colônias provenientes dos municípios de Santa Teresa e Conceição do Castelo.

Um segundo grupo (em verde) reuniu as outras quatro colônias de São Bento de Urânia, coletadas nas propriedades de Antonieta Lorenzoni (2) e Jandir Gratieri (2) (Alfredo Chaves), as colônias de Castelinho e três colônias de Vila Maria (Vargem Alta) e três colônias do município de Marechal Floriano.

As colônias coletadas nas localidades de Taquaruçu, São Brás de Maravilha e Ardisson (município de Vargem Alta) foram alocadas no terceiro grupo (azul), bem como todas as colônias de Alto Caxixe (Venda Nova do Imigrante), todas as colônias de Braço do Sul e duas das colônias de Pedra Azul, exatamente as duas da propriedade de Cirilo Girardi (Domingos Martins).

As colônias provenientes das localidades de Portal Pedra Azul, São Paulo do Aracê e Alto Jucu, do município de Domingos Martins, foram reunidas no quarto grupo (em amarelo). Todas as amostras coletadas nas propriedades da Fazenda Roda D'agua, Reginaldo Pizol, Marco Antônio Reboli, Elenilson Reboli e José Dias de Castro (localidade de Laginha, município de Domingos Martins) também foram alocadas neste grupo, bem como todas as colônias provenientes de Afonso Cláudio.

Os resultados desse agrupamento podem ser visualizados na Figura 10.

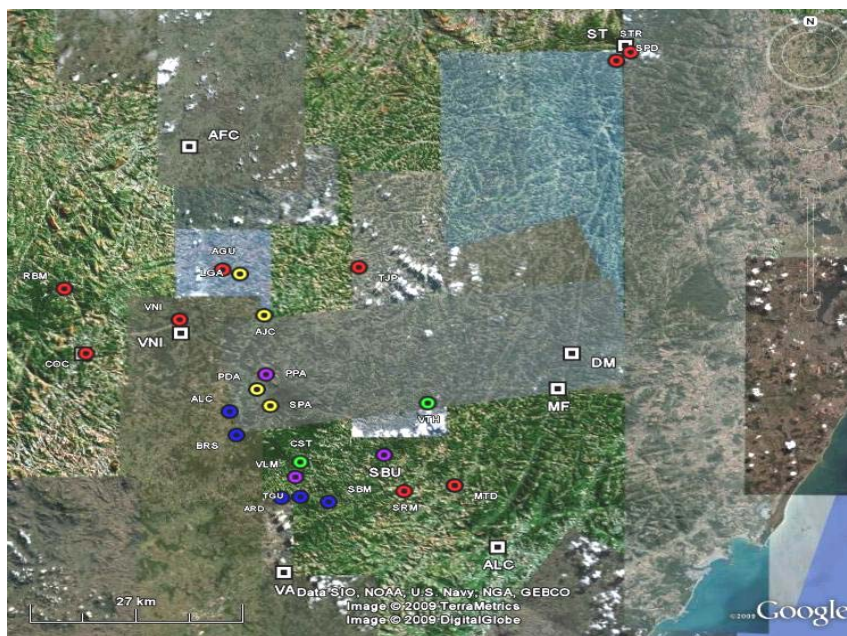


Figura 10 – Projeção da estrutura populacional estimada para as amostras de *M. capixaba* com base nos resultados do programa STRUCTURE. Os marcadores em branco indicam as sedes dos municípios. Em roxo, as localidades que tiveram colônias alocadas em mais de um dos quatro grupos. Os códigos são os mesmos da Tabela 1.

Com base nos resultados do STRUCTURE, foram realizadas novas análises de agrupamento com o objetivo de confirmar a formação das possíveis populações. Para tanto foram construídas novas matrizes de distância utilizando-se o índice de Jaccard (1908), bem como novas análises de agrupamento pelo método UPGMA entre os grupos e subgrupos.

Tabela 9 – Grupos, subgrupos e número de amostras de colônias de *Melipona capixaba*

Grupos	Subgrupos	Nº de amostras
GRUPO 1	Matilde (MTD)	3
	São Roque de Maravilha (SRM)	1
	São Bento de Urânia (SBU)	4
	Venda Nova do Imigrante (VNI)	3
	Laginha (LGA)	2
	Tujuco Preto (TJP)	4
GRUPO 2	São Bento de Urânia 2 (SBU 2)	4
	Castelinho (CST)	4
	Vila Maria (VLM)	3
	Victor Hugo (VTH)	3
GRUPO 3	Taquaruçu (TGU)	3
	São Brás de Maravilha (SBM)	1
	Ardisson (ARD)	1
	Alto Caxixe (ALC)	11
	Braço do Sul (BRS)	4
	Pedra Azul (PDA)	2
GRUPO 4	Portal Pedra Azul (PPA)	2
	São Paulo do Aracê (SPA)	5
	Alto Jucu (AJC)	3
	Laginha 2 (LGA2)	11
	Alto Guandu (AGU)	3
GRUPO 5	São Pedro (SPD)	2
	Santa Teresa (STR)	1
	Ribeirão do Meio (RBM)	3
	Conceição do Castelo (COC)	5

A partir das matrizes de distância oriundas da divisão de grupos foram construídos dendrogramas pelo método UPGMA (Figuras 11 e 12). Estas análises apresentaram uma separação mais bem definida de grupos quando comparado com os dendrogramas obtidos anteriormente (Figuras 5 e 6). A análise de agrupamento dos 25 subgrupos confirma, em grande parte, a divisão realizada pelas análises do programa STRUCTURE.

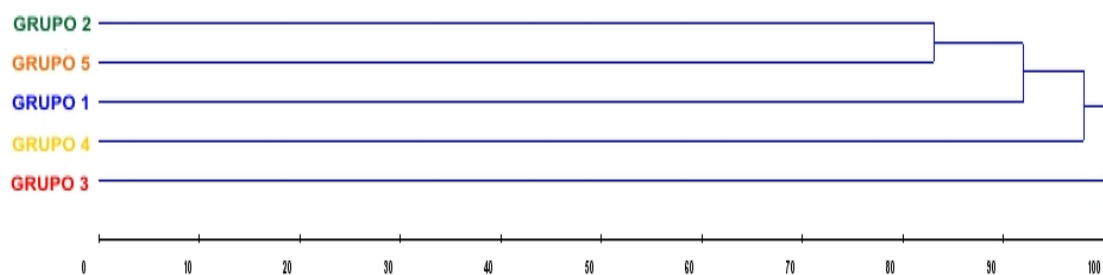


Figura 11 – Dendrograma de similaridade genética, obtido pelo método UPGMA, entre os grupos de amostras de *M. capixaba*. Correlação cofenética (CCC): 0,75.

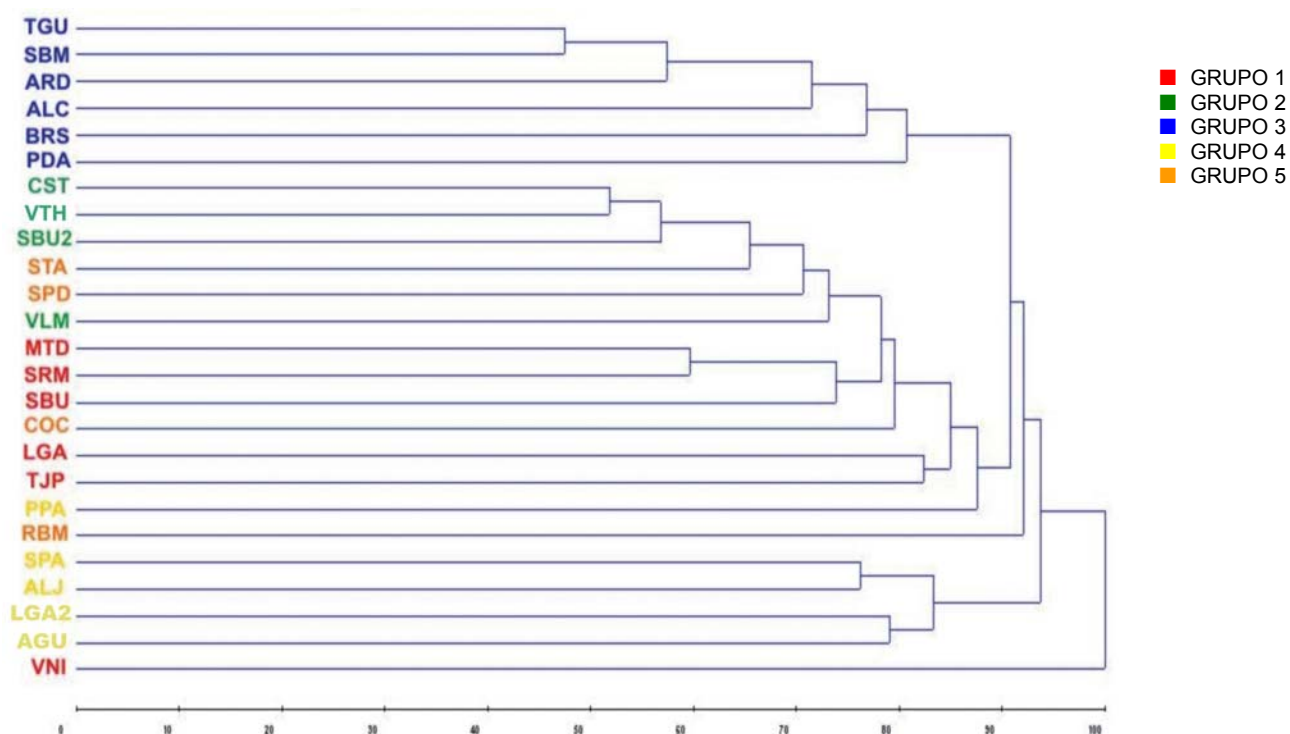


Figura 12 – Dendrograma de similaridade genética, obtido pelo método UPGMA, entre as amostras de *M. capixaba*. Os códigos são os mesmos da Tabela 9. Correlação cofenética (CCC): 0,70.

Uma nova Análise da Variância Molecular (Tabela 10), agora considerando a organização das colônias em grupos e subgrupos, reafirmou que a maior parte da variação está dentro dos subgrupos (71,64%). No entanto, nota-se um aumento da divisão entre os grupos (10%) e uma melhor estruturação das amostras (Φ_{st} : 0,284), quando comparados os valores obtidos anteriormente (Tabela 8).

Tabela 10 –Análise de Variância Molecular para os cinco grupos de amostras de *Melipona capixaba*, considerando-se dois e três níveis hierárquicos, respectivamente. GL: grau de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; Estimativa: estimativa dos componentes de variância.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	Estimativa	%
Entre os Grupos	4	1786,063	446,516	17,019	10,00
Dentro dos Grupos	83	12670,085	152,652	152,651	90,00
Total	87	14456,148	166,163	169,670	100,0
Índice de fixação: Φ_{st}: 0,100					
Fontes de variação	GL	SQ	QM	Estimativa	%
Grupos	4	1786,063	446,516	6,668	3,79
Entre os Subgrupos	20	4726,827	236,341	43,246	24,57
Dentro dos Subgrupos	63	7943,257	126,083	126,083	71,64
Total	87	14456,147	166,162	175,997	100,00
Índices de fixação: Φ_{sg}: 0,255 Φ_{gt}: 0,038 Φ_{st}: 0,284					

Os dados obtidos por estas análises reafirmaram a existência de estruturação genética em *M. capixaba*. Ressalta-se, entretanto, que esta estruturação não pode ser relacionada à distância geográfica das colônias. Esta ausência de relação com a distância geográfica pode ter sido favorecida pelo transporte e comércio de colônias, o que é comum na região (Helder Resende, comunicação pessoal). Adicionalmente, o apicultor Luiz Fabio Feitoza Caliman, da cidade de Venda Nova do Imigrante, em artigo da revista Mensagem Doce (nº 96 e maio de 2008) relata que na década de 90 iniciou-se a prática de multiplicação de enxame em caixas racionais por parte dos agricultores da região (as chamadas “caixas racionais” são caixas de madeira

que possuem um estrutura de organização que facilita a multiplicação dos ninhos e a colheita do mel). Houve então uma corrida em busca de colônias de *M. capixaba* nas matas. Verificou-se que mais de 90% das colônias passadas para as caixas racionais morreram. As que sobreviveram podem ter dado origem às populações remanescentes, ou pelo menos, à parte delas, o que reforça a falta de estruturação entre as amostras analisadas.

Para uma maior compreensão da situação ambiental da área de ocorrência de *M. capixaba*, deve-se também, considerar fatores históricos referentes à colonização do Estado. Na Região das Serras, área principal de endemismo da *M. capixaba*, o processo de degradação e fragmentação da cobertura vegetal iniciou-se em meados de 1874, com a intensificação da imigração italiana para o Estado do Espírito Santo (NAGAR, 1895). Assim, considerando-se as baixas distâncias genéticas encontradas no presente trabalho e a restrita área de ocorrência da espécie, pode-se levantar a hipótese de que todas as colônias amostradas sejam remanescentes de uma mesma população. A fragmentação da cobertura vegetal observada até o momento, entretanto, se mostrou insuficiente para promover uma grande diferenciação das populações por isolamento geográfico.

Diante disso, pode-se propor que cada uma das quatro populações definidas pelas análises da estrutura populacional das amostras de *M. capixaba* sejam consideradas para fins de conservação biológica, como Unidades de Manejo (UM) (*Management Units*). Este termo descreve populações ou conjunto delas que representam unidades demográficas localizadas (similar ao conceito de “estoque”, no contexto da pesca), não necessariamente apresentando significativa diferenciação genética em relação às unidades equivalentes (EIZIRIK, 1996). Moritz (1994) afirma que entre as Unidades de Manejo existiria uma separação demográfica suficiente para que as frequências alélicas diverjam, mas esta é recente ou incompleta, de modo a não ocasionar uma monofilia recíproca dos alelos, que só é atingida depois de muitas gerações após a interrupção do fluxo gênico.

Eizirik (1996) enfatiza que a importância demográfica dessa divisão reside no fato de que o baixo nível de contato atual das populações tornaria improvável a recolonização, em médio prazo, da área de uma delas no caso de sua extinção. Assim sendo, a extinção de uma UM não implicaria grande perda

da diversidade total da espécie, mas possivelmente significaria a eliminação de um elemento não recuperável para ecossistemas regionais, com efeitos deletérios, demográficos, ecológicos ou mesmo econômicos para as comunidades humanas locais. Além disso, perspectivas originadas da genética quantitativa indicam que cada população local poderia apresentar um conjunto específico de alelos coadaptados, resultantes de uma evolução recente em determinadas condições ecológicas (LYNCH, 1996). Esta variação seria um nível a mais a ser considerado em questões de conservação, fortalecendo a importância da preservação *in situ* das populações locais.

Somando-se a isso, há concordância por parte de biólogos evolutivos, geneticistas populacionais, ecólogos e biólogos da conservação que a preservação de espécies como uma unidade simples, manejada no campo ou em cativeiro como uma única população panmítica, em que se promova o fluxo gênico entre quaisquer indivíduos independentemente de sua origem geográfica, é inadequada. Esta preservação também seria prejudicial não só por obscurecer parte da história evolutiva recente das populações já diferenciadas, o que seria uma irresponsabilidade, como também por promover graves problemas ao misturar repositórios genéticos adaptados a diferentes condições ecológicas (TEMPLETON, 1986; LYNCH, 1996).

Segundo Peter (1995), todas as áreas de florestas originais remanescentes da região de estudo do presente trabalho podem ser consideradas o *habitat crítico* de *M. capixaba*. Este conceito é utilizado para definir regiões geográficas específicas que são essenciais para a conservação de uma ou mais espécies ameaçadas de extinção e que podem exigir uma especial atenção na gestão e proteção. *Critical habitats* podem incluir áreas que atualmente não são ocupadas pela(s) espécie(s), mas que serão necessárias para a sua recuperação. Com isso, é fato que, independente dos resultados obtidos pelos estudos genéticos, todas as iniciativas que visem à preservação da espécie, terão imprescindivelmente, que contemplar o manejo sustentável das áreas de mata atlântica ainda existentes na região.

Logicamente, deve ser levado em consideração que existe uma série de obstáculos para a identificação de unidades de conservação de uma espécie, tais como diferenças entre os marcadores, como pode ocorrer na comparação entre trabalhos com locos nucleares e mitocondriais. No caso específico da *M.*

capixaba, o endemismo e a restrita área de ocorrência da espécie podem representar obstáculos adicionais à determinação de unidades de conservação.

5. CONCLUSÕES

O estudo da variabilidade genética das colônias de *Melipona capixaba* por meio de marcadores ISSR possibilitou chegar às seguintes conclusões:

- As amostras de *M. capixaba* analisadas apresentaram uma alta similaridade genética e uma estruturação característica de uma espécie endêmica;
- A maior parte da variabilidade genética estimada para *M. capixaba* é devida às diferenças existentes dentro dos grupos analisados;
- Aparentemente, não há correlação entre a variabilidade genética e a distâncias geográficas das amostras;
- Não houve correlação entre a estruturação populacional e a divisão política da região;
- A divisão em grupos e subgrupos apresentou-se mais eficiente quanto à estruturação genética da espécie, e pode servir de ponto de partida para as estratégias de manejo e conservação;
- A determinação de Unidades de Manejo da espécie pode representar um proposta metodológica viável de preservação para a espécie; e
- Programas de manejo e conservação das áreas ainda não alteradas são de extrema importância para a preservação da *M. capixaba*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOT, P. (2001). Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-simple Sequence Repeats (ISSRs). 3 pp. *Journal of Insect Science* , 1: 8.

ACETO, S., SICA, M., GAMBA, G., MONTIERI, S., AND GÁUDIO, L. (2005) ISSR markers show differentiation among Italian populations of *Asparagus acutifolius* L. *BMC Genetics*, 6:17.

AIDAR, D.S. Meliponídeos e ecossistemas. (1997). In: Simpósio Paranaense de Apicultura, 12, 1997, Guarapuava. Anais... Guarapuava-PR: Unicentro, p.48-55.

ALONSO, W. J. (1998). Abelhas sem ferrão: centenas de espécies para polinização, produção de mel, lazer e educação. Artigos técnicos. *Animais de criação – Abelhas*, ano 101, n. 626.

ALONSO, W. J. (2001). As abelhas sem ferrão: centenas de espécies para a polinização, produção de mel, lazer e educação. *A Lavoura*, Rio de Janeiro, p. 30-33. Disponível em: <http://www.portaldoagrovit.com.br>. Acessado em 01/02/2009.

ARCADE, A., ANSELIN F., FAIVRE RAMPANT P., LESAGE M. C., PAQUES L. E., PRAT, D. (2000) Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. *Theor Appl Genet*, 100:299–307

BALLOU, J. D. (1997). Ancestral inbreeding only minimally affects inbreeding depression in mammalian populations. *Journal of Heredity* 88: 169-178.

BERKELHAMER, R.C. (1983). Intraspecific genetic variation and haplodiploidy, eusociality, and polygyny in the Hymenoptera. *Evolution* 37: 540-545.

BEREZOVSKAYA, O. P.; MOROZ, O. Y.; SIDORENKO, A. P. (2002). Intra- and interspecific differences in ISSR-PCR characteristics of *Bumble* bees (Hymenoptera: Bombinae). *Cytology and Genetics*, n. 36, v. 3, p. 28-35.

BORASCHI, D., DEL LAMA, M.A. (2004). Populational genetic structure and sociogenetic structure of cocoon masses of *Digelasinus diversipes* (Kirby, 1882) (Hymenoptera: Symphyta: Argidae). *Gen. Mol. Biol.* 27(3):385-390.

BORBA, R.S., GARCIA, M.S., KOVALESKI, A., OLIVEIRA, A.C., ZIMMER, P.D., CASTELO BRANCO, J.S. e MALONE, G. (2005). Dissimilaridade Genética de Linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Através de Marcadores Moleculares ISSR. *Neotropical Entomology* 34(4):565-569.

BORNET, B. & BRANCHARD, M. (2001). Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209–215.

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*, v. 28, p. 623-634.

BUTCHER, R.D.J., HUBBARD, S.F., WHITFIELD, W.G.F. (2000). Microsatellite frequency and size variation in the parthenogenetic parasitic wasp *Venturia canescens* (Gravenhorst) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Insect Molecular Biology* 9(4), 375–384.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. (1992). Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. *Apidologie*, v. 23, p. 509-522.

CASTRO, M.S. (2005). Meleiros e conservação das abelhas. *Mensagem Doce*, 80: 17-18

CRUZ, C.D. & REGAZZI, A.J. (1997). Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 2.ed. Viçosa: UFV, 390p.

CRUZ, C.D. (2006). Programa Genes: Análise multivariada e simulação. Editora UFV. Viçosa (MG). 175p.

DALLA RIZZA, M., REAL, D., REYNO, R., PORRO, V., BURGUEÑO, J., ERRICO, E. and QUESENBERRY, K.H. (2007). Genetic diversity and DNA content of three South American and three *Eurasian* *Trifolium* species. *Genetics and Molecular Biology*, 30, 4, 1118-1124.

DIAS, F.G. (2008). DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE *Melipona mondury*, Smith, 1863, *Melipona rufiventris*, Lepeletier, 1836 e *Melipona* sp. (HYMENOPTERA, APIDAE) NO ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL, UTILIZANDO MARCADORES ISSR. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*. Viçosa. Minas Gerais.

DOWLING, T.E.; MORITZ, C.; PALMER, J.D.; REISEBERG, L.H. (1996) Nucleic acids III: analysis of fragments and restriction sites. In: HILLIS, D.M.; MORITZ, C; MABLE, B.K. (ED). *Molecular Systematics*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, p. 249-320.

EIADTHONG, W., YONEMORI, K., SUGIURA, A., UTSUNOMIYA, N., SUBHADRABANDHU, S. (1999). Identification of mango cultivars of Thailand and evaluation of their genetic variation using the amplified fragments by simple sequence repeat-(SSR-) anchored primers. *Sci. Horticult.*, 82: 57-66.

EIZIRIK, E. Ecologia Molecular, genética da conservação e conceito de inidades evolutivamente significativas. (1996). *Revista Brasileira de Genética*, 19,4, Suplemento, 23-29.

EMCAPA/NETUP (1999). Unidades Naturais. Processada em GIS (FEITOSA, H.N., 1998) por SEPLAN/EMCAPER.

EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E., QUATTRO, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.

FALUSH D., STEPHENS M., PRITCHARD, J.K. (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567–1587.

FALUSH, D., STEPHENS, M., AND PRITCHARD, J. K. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*.

FANG, D. Q., AND M. L. ROOSE. (1997). Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor Appl Genet* 95:408-417.

FERNANDES-SALOMÃO, T.M.; ROCHA, R.B.; CAMPOS, L.A.O. & ARAÚJO, E.F. (2005). The first internal transcribed spacer (ITS-1) of *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): characterization and phylogenetic analysis. *Insectes Sociaux*. v. 52, p.11-18.

FONSECA, G. A. B., RYLANDS, A. B., PAGLIA, A. P. & MITTERMEIER, R. A. (2004). pp. 84-88. In Mittermeier, R. A., P. R. Gil, M. Hoffmann, J. Pilgrim, J. Brooks, C. G. Mittermeier, J. Lamourux & G. A. B. Fonsec (eds.). *Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions*. Cemex, Washington, DC.

FORMAN, R. T. T. (1995). *Land mosaics: the ecology of landscapes and regions*. Cambridge University Press, Cambridge.

FREE, J.B.(1993). Insect pollination of crops. London: Academic Press, 684p.

GILPIN, M. E. & SOULÉ, M. E. (1986). Minimum viable populations: processes of extinction. pp. 19-34. In Soulé, M. E. (ed.). Conservation biology: the science of scarcity and diversity. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

GRAUR, D. (1985). Gene diversity in Hymenoptera. *Evolution* 39:190-199.

GRATIVOI, A. D. (2004). Conservation genetics of the Golden Lion Tamarin. *Neotropical Primates* 12(1): 31-32.

GRISWOLD, T. *et al.* (1995). The bees (Apidae). In: HANSON, P. E.; GAULD, I. D. (Ed.). *The hymenoptera of Costa Rica*. Oxford University Press, p.650-691.

GUPTA, M., CHYI, Y-S., ROMERO-SEVERSON, J., OWEN, J.L. (1994). Amplification of DNA from evolutionarily diverse using single primers of simple-sequence repeats. *Teor. Appl. Gen.*, 89: 998-1006.

HANSKI, I. (1997). Metapopulation dynamics: from concepts and observations to predictive models. In Hanski, I. A & M. E. Gilpin (eds.). *Metapopulation biology: ecology, genetics, and evolution*. London Academic Press.

HARTL, D. L. (1971). Some aspects of natural selection in arrhenotokous populations. *Amer. Zool.*, v. 11, p. 305-325.

HARTL, D. L. (1972). A fundamental theorem of natural selection for sex linkage or arrhenotoky. *Amer. Nat.*, v. 106, p. 516-524.

HEARD, T.A. (1999). The role of stingless in crop pollination. *Ann. Rev. Entomol.*, v44, p. 183-206.

JANZEN, D.H. (1980). *Ecologia vegetal nos trópicos*. São Paulo: EDUSP, 79p (Coleção Temas de Biologia, 7).

JENSEN, A.B., PALMER, K.A., CHALINE, N., RAINE, N.E., TOFILSKI, A., MARTIN, S.J., PEDERSEN, B.V., BOOMSMA, J.J., RATNIEKS, F.L.W. (2005). Quantifying honey bee mating range and isolation in semi-isolated valleys by DNA microsatellite paternity analysis. *Conservation Genetics* 6:527–537.

KERR, W.E. (1969). Some aspects of the evolution of social bees. *Evol Biol* 3: 119–175.

KERR, W.E.; G.A. CARVALHO & V.A. NASCIMENTO. (1996). *Abelha urucu – biologia, manejo e conservação*. Belo Horizonte, Acangaú.

KERR, W.E.; CARVALHO, G.A.; COLETTI-SILVA, A. & ASSIS, M.G.P. (2001). Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica, p. 20-41. *In*: Ministério da Ciência e Tecnologia (Ed.). *Biodiversidade, Pesquisa e Desenvolvimento na Amazônia. Parcerias Estratégicas*. Brasília, vol. 12.

KUMAR, L.S., SAWANT, A.S., GUPTA, V.S. AND RANJEKAR, P.K. (2001). Comparative Analysis of Genetic Diversity Among Indian Populations of *Scirpophaga incertulas* by ISSR-PCR and RAPD-PCR. *Biochemical Genetics*, Vol. 39, Nos. 9/10.

KUMAR, L. S.; SAWANT, A. S.; GUPTA, V. S.; RANJEKAR, P. K. (2001). Comparative analysis of genetic diversity among Indian populations of *Scirpophaga incertulas* by ISSR-PCR. *Biochem. Genet.*, v 39, p. 9-10.

LA SALLE, J. & I.D. GAULD. (1993). Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms, p.1-26 *In*: *Hymenoptera and Biodiversity* (J. La Salle.& I.D. Gauld, eds). CAB International, Wallingford. 348p.

LACY, R. C. (1993). Impacts of inbreeding in natural and captive populations of vertebrates: Implications for conservation. *Perspectives in Biology and Medicine*

36: 480-496. Lacy, R. C. 2000. Considering threats to the viability of small populations using individual-based models. *Ecological Bulletins* 48: 39-51.

LARA-RUIZ, P. (2004). Tamanho corporal, dimorfismo sexual e diversidade genética da preguiça-de-coleira *Bradypus torquatus* Illiger, 1811 (Xenarthra, Bradypodidae). Tese de mestrado, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LESTER, L. J., & SELANDER, R.K. (1979). Population genetics of haplodiploid insects. *Genetics* 92:1329–1343

Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção / editores Angelo Barbosa Monteiro Machado, Gláucia Moreira Drummond, Adriano Pereira Paglia. - 1.ed. - Brasília, DF : MMA; Belo Horizonte, MG : Fundação Biodiversitas, 2008. 2v. (1420 p.).

LIU, B., WENDEL, J.F. (2001). Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology Notes*, v. 1, 2005-2008.

LÓPEZ-URIBE, M.M. & DEL LAMA, M.A. (2007). Molecular Identification of Species of the genus *Euglossa* Latreille (Hymenoptera: Apidea, Euglossini), Neotrop. *Entomol*;36(5):712-720.

LYNCH, M. (1996). A quantitative-genetic perspective on conservation issues. In: *Conservation Genetics: Case Histories from Nature* (Avise, J.C. and Hamrick, J.L.eds.) Chapman & Hall, New York, pp. 471-501.

MACHADO, M. F. P. S. (1982). Isoenzimas da desidrogenase málica em abelhas do gênero *Plebéia*: controle genético e dados populacionais. 198 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

MELO, G. (1996). Notes on the nesting biology of *Melipona capixaba* (Hymenoptera, Apidae), Journal of The Kansas Entomological Society, 69(2), pp. 207-210.

MICHENER, C.D. (1979). Biogeography of the bees. Ann.Mo. Bot. Gard. 66: 277-347.

MICHENER, C. D. (1990). Classification of the Apidae (Hymenoptera). Kans. Univ. Sci. Bull., Lawrence, 54(4):75-163.

MICHENER, C.D. (2000). The Bees of theWorld. Baltimore, Johns Hopkins University Press, 913p.

MITTERMEIER, R. A, FONSECA, C., RYLANDS, A. & MITTERMEIER, C. G. (1999). Atlantic Forest. pp. 136-147. In Mittermeier, R. A., N. Myres, P. R. Gil & C. G. Mittermeier (eds.). Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. Cemex. Washington, DC.

MORITZ, C. (1994). Defining "Evolutionarily Significant Units" for conservation. Trends Ecol. 9:373-375.

MOURE, J.S.; CAMARGO, J. M. F. (1994). *Melipona (Michmelia) capixaba*, uma nova espécie de meliponinae (Hymenoptera, Apidae) do sudeste do Brasil. Revista Brasileira de Zoologia. 11(2): 289-296.

NASCIMENTO, V.A., S.H. Matusita and W.E. Kerr. 2000. Evidence of hybridization between two species of *Melipona* bees. *Genetics and Molecular Biology*. 23(1):79-81.

NAGAOKA, T., & OGIHARA, Y. (1997). Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theor Appl Genet 94:597-602.

NAGAR,C. (1895). Relato do Cavalheiro Carlo Nagar Cônsul Real em Vitória – O Estado do Espírito Santo e a Imigração Italiana(Fevereiro de 1895). Coleção Canaã, Volume I, Arquivo Público Estadual.

NASCIMENTO, M.A. (2008). Variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata* (HYMENOPTERA: APIDAE) no Estado de Minas Gerais com marcadores ISSR. 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.

NEI, M. (1973). Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol. 70, No. 12, Part I, pp. 3321-3323.

NOGUEIRA-NETO, P. (1997). Vida e Criação de Abelhas indígenas sem Ferrão. São Paulo: Nogueirapis, 446p.

NOGUEIRA-NETO, P. (2000). Uma conversa sobre fragmentos florestais, pequenas populações e abelhas indígenas. *In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS*, 4., 2000, Ribeirão Preto. *Anais...* Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, p. 27-34

PAMILO P., VARVIO-AHO, S.L., PEKKARINEN A. (1978). Low enzyme gene variability in Hymenoptera as a consequence of haplodiploidy. *Hereditas* 88:93-99.

PAPLAUSKIENĖ, V., ČEKSTERYTĖ, V., PAŠAKINSKIENĖ, I., TAMAŠAUSKIENĖ, D., RAČYS, J. (2006). The use of ISSR method for the assessment of bee genetic diversity. *Biologija*. nr. 3. p. 16–20

PATZAK, J. (2001). Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica*, Wageningen, v.121, p. 9-18.

PARKER, P.G.; SNOW, A.A.; SCHUG, M.D.; BOOTON, G.C.; FUERST, P.A. (1998). What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, Durham, v.79, n.2, p.361-382.

PETER, A.B. (1995). Ecosystem and Habitat Conservation: more than just a problem of geography. *American Fisheries Society Symposium*, 17:329-333.

PINTO, L.P.S ; BEDÊ, L.C. ; PAESE, A. ; FONSECA, M. ; PAGLIA, A. P. ; LAMAS, I. (2006). Mata Atlântica Brasileira: Os Desafios para Conservação da Biodiversidade de um Hotspot Mundial. In: C.F.D. Rocha; H.G. Bergallo; M. Van Sluys; M.A.S. Alves. (Org.). *Biologia da Conservação: Essências*. (Obra com corpo de referees). São Carlos, SP: RIMA Editora, v. , p. 91-118.

PRITCHARD, J.K., STEPHENS, M., DONNELLY, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *genetics*, 155, 945–959.

ROHLF, F. J. (2000). NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, New York, 83p.

ROSENBERG, N.A., PRITCHARD, J.K., WEBER, J.L., CANN, H.M., KIDD, K.K., ZHIVOTOVSKY, L.A., FELDMAN, M.W. (2002). Genetic Structure of Human Populations. *Science*, vol. 298, p. 20.

SANDERSON, J., K. ALGER,. FONSECA, G. A. B., GALINDO-LEAL, V. H. INCHAUSTY & MORRISON, K. (2003). Biodiversity conservation corridors: planning, implementing, and monitoring sustainable landscapes. Conservation International, Washington, DC.

SEGURA, J.A. (2000). Highly polymorphic DNA markers in an Africanized honey bee population in Costa Rica. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 2, 317-322.

SHANNON, C.E, WEAVER, W. (1949). The mathematical theory of communication. Univ. Of Illinois Press, Urbana.

SILVERA, F.A.; MELO, G., ALMEIDA, E.A.B. (2002). Abelhas brasileiras: Sistemática e identificação. Belo Horizonte, F.A. Silveira, 253 p.

SLOTTA, T.A.B.; PORTER, D.M. (2006). Genetic variation within and between *Ilamna corei* and *I. remota* (Malvaceae): implications for species delimitation. Botanical Journal of the Linnean Society, v. 151, p. 345-354.

SOULÉ, M. E. (ed). 1987. Viable populations for conservation. Cambridge, Cambridge University Press.

SOUZA, G.A., CARVALHO, M.R.O., MARTINS, E.R., GUEDES, R.N.C., OLIVEIRA; L.O. (2008). Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. Pesquisa agropecuária. Brasília. v.43, n.7, p.843-849.

STUCHI, A.L.B., TAKASUSUKI, M.C.R., TOLEDO, V.A.A. (2008). Análise da genética de populações em abelhas jataí (*Tetragonisca angustula* LATREILLE) por meio de izoenzimas. Magistra, Cruz das Almas-BA, v. 20, n. 1, p. 68-77.

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

TEMPLETON, A.R. (1986). Coadaptation and outbreeding depression. In: Conservation Biology: the Science of Scarcity and Diversity (Soulé, M.E., ed.) Sinauer Associates Inc, Sunderland, USA, pp. 105-116.

TEMPLETON, A.R., GEOGRIADIS, N.J. (1996) A landscape approach to conservation genetics: Conserving evolutionary processes in the African Bovidae. In: Conservation Genetics – Case Histories From Nature. (Avice JC, Hamrick JL eds) Chapman & Hall, New York, pp. 398–430.

TORGGLER, M.G.F.; CONTEL, E.P.B.; TORGGLER, S.P. (1995). Isoenzimas: variabilidade genética em plantas. Ribeirão Preto. Sociedade Brasileira de Genética, 186p.

VALLADARES-PADUA, C. B., C. S. MARTINS & RUDRAN, R. (2003). Manejo integrado de espécies ameaçadas. pp. 647-664. In Cullen Jr., L., R. Rudran & C. Valladares-Padua (orgs.). Métodos de estudos em biología da conservação e manejo da vida silvestre. Ed. Da UFPR, Curitiba.

VELTHUIS, H.H.W. (1997) Biologia das abelhas sem ferrão. São Paulo: Edusp.

WALDSCHMIDT, A. M., MARCO-JUNIOR, P., BARROS, E. G. and CAMPOS, L. A. O. (2002). Genetic analysis of *Melipona quadrifasciata* LEP. (HYMENOPTERA: APIDAE, MELIPONINAE) with RAPD markers. *Braz. J. Biol.*, 62(4B): 923-928.

WEINZ, J. A. (1996). Wildlife in patchy environments: metapopulations, mosaics and management. pp. 53-84. In McCullugh, D. R. ed. Metapopulations and wildlife conservation. Island Press, Washington, D.C.

WIESE, H. (1985). Nova Apicultura. 6. ed. Porto Alegre: Agropecuária. 491p.

WILLE, A. (1979). Phylogeny and relationships among the genera and subgenera of the stingless bees (Meliponinae) of the world. *Rev. Biol. Trop.* 27: 241-278.

WOLFE, A. D. & LISTON, A. (1998). Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. *in*: Plant Molecular Systematics II D. E. Soltis, P. S. Soltis and J. J. Doyle. pp. 43-86. Boston, Kluwer.

WOLFE, A.D. (2005). ISSR techniques for evolutionary biology. *Meth. Enzimol.*, 395: 134-144.

WRIGHT, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, v. 16, p. 97-159.

YEH, F.C.; YANG, R.; BOYLE, T. (1999). Popgene Version 1.31: Microsoft Window based freeware for population genetic analysis: Quick user guide. [s.l.]: University of Albert, Centre for International Forestry Research.

ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A., LABUDA, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.