

MAYKON PASSOS CRISTIANO

**VARIABILIDADE GENÉTICA E FILOGEOGRAFIA DA ESPÉCIE AMEAÇADA
DE EXTINÇÃO *Melipona capixaba* Moure & Camargo (HYMENOPTERA:
APIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

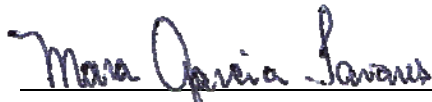
**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009**

MAYKON PASSOS CRISTIANO

**VARIABILIDADE GENÉTICA E FILOGEOGRAFIA DA ESPÉCIE AMEAÇADA
DE EXTINÇÃO *Melipona capixaba* Moure & Camargo (HYMENOPTERA:
APIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

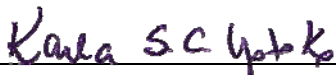
Aprovada: 17 de julho de 2009.



Prof.^a Mara Garcia Tavares



Prof. Jorge A. Dergam dos Santos



Prof.^a Karla S. Clemente Yokoto
(Co-orientadora)



Prof. Rodrigo A. Fernandes Redondo



Prof.^a Tânia Maria Fernandes Salomão
(Orientadora)

*Aos meus familiares, de modo muito especial
aos meus pais, Jairo e Fátima,
e a minha irmã Débora
(Dedico)*

“... Não proponho propostas de diluição
Não sou agente do vazio
nem de asas que o homem não tem

Se acreditais em sistemas de elocubração
Na gema brilhante do nada
Em recheio de palavras e sofisticados relatórios
Se acreditais em clara batida nas panelas obscuras da prepotência
Se quereis teorias de mim
Se me quereis longe da paixão: tirai o cavalo da chuva

Pois menor que meu sonho não posso ser.

Passa o tempo.
Como passa, passou o tempo.
oh! frase feita, inútil consolo e alívio.

Passo este tempo que me passa.
Passo pontos de interrogação, helespontos, helespantos.
Passo a ponte, o poente.
Deliberadamente passo
mas sem pressa, passo a passo.
Passo os fusos horários e passeio entre o sonho e as palavras.
Também entre as obscenas por decreto.

Pois menor que meu sonho não posso ser.

Atravesso compêndios, currículos, apostilas de silêncio
e minha sombra pisada por outra sombra
também feita de tudo e nada
Atravesso simulacros
e arranco o lacre da palavra.

Pois menor que meu sonho não posso ser”

(Lindolf Bell - O código das águas, 1984)

Agradecimentos

- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, que possibilitou minha estada em Viçosa;
- A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro do projeto “Subsídios biológicos e moleculares para a preservação de *Melipona capixaba* (Hymenoptera: Apidae)” (proc. CBB-1331/06);
- A Universidade Federal de Viçosa, por meio do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, bem com aos professores, secretárias e colegas por todo o conhecimento, apoio e atenção, agradeço.
- A Professora Tânia Maria Fernandes Salomão, pela orientação, dedicação, apoio, amizade e confiança;
- A professora Mara Garcia Tavares pela ajuda e colaboração no desenvolvimento deste trabalho;
- À Professora Karla Yotoko e ao Professor Lúcio Campos por toda ajuda e co-orientação e contribuírem com sugestões e críticas no decorrer do trabalho;
- A todas as pessoas que realizaram as coletas de *Melipona capixaba*, e principalmente aos inúmeros criadores desta abelha no estado do

Espírito Santo que disponibilizaram material para a realização deste estudo;

- Aos meus pais, minha irmã e familiares pelo incondicional apoio e por sempre estarem presentes em todos os momentos.
- Aos meus amigos, de modo especial ao Danon Cledes, Camila Arent e Melissa Raymundo pela amizade, ajuda e bom humor.
- Ao Prof. Elpídio e ao Diogo do departamento de solos pelo auxílio na elaboração dos mapas.
- A todo o pessoal do Laboratório de Biologia Molecular pela colaboração durante a condução deste trabalho e por todas as conversas e descontrações.
- A todos as pessoas que durante este tempo contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, meu muito obrigado!

Sumário

Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	x
Resumo	xi
Abstract	xii
1. Introdução	1
2. Objetivos	
2.1. Objetivo Geral	7
2.2. Objetivos Específicos.....	7
3. Material e Métodos	
3.1. Amostragem.....	8
3.2. Extração do DNA total	8
3.3. Amplificação e sequenciamento do gene COI	12
3.4. Análise dos dados.....	14
4. Resultados	
4.1. O gene COI de <i>M. capixaba</i>	17
4.2. Diversidade das sequências	17
4.3. Teste de Mantel	19
4.4. Análise filogenética	20
4.5. Estrutura populacional	20
5. Discussão	
5.1. Diversidade genética e estrutura populacional	25
5.2. Importância da genética na conservação de <i>M. capixaba</i>	31

6. Conclusões	34
7. Perspectivas	35
8. Referências Bibliográficas	36

Lista de Figuras

1. *Melipona capixaba* Camargo & Moure (1994) vista nas posições: Frontal (A), Lateral (B), Dorsal (C) e entrada de um ninho característico da espécie (D) 9
2. Mapa mostrando o local de coleta de *M. capixaba* no Estado do Espírito Santo 10
3. Correlação par a par entre a matriz de distância genética e matriz de distância geográfica estimados pelo teste de Mantel com 10 mil permutações para *M. capixaba*..... 19
4. Árvore consenso obtida por inferência filogenética bayesiana utilizando sequências de 850 pb de COI. Os indivíduos de *M. capixaba* estão identificados pelos nomes das localidades e haplótipos conforme a Tabela 1. *M. scutellaris* está identificada com o nome da espécie e a localidade de coleta. As probabilidades posteriores estão apresentadas a cada bifurcação. Grupos externos: *M. bicolor* e *M. quadrifasciata* 22
5. Rede de haplótipos *median-joining* com base em sequências COI de *M. capixaba*. Cada círculo representa um haplótipo e seu tamanho é correspondente à frequência de cada um deles. Círculos vermelhos indicam *median vectors*. As barras localizadas entre dois haplótipos indicam o número de mutações que separam os respectivos haplótipos. Cada cor representa um dos quatro grupos geograficamente próximos (ver tabela 1)..... 23
6. A: Distribuição espacial dos haplótipos. B: Rede de haplótipos (Figura 5)..... 24

7. Mapa de domínios naturais Pleistocênicos obtidos por sobreposição de modelos de refúgios paleoclimáticos, topográficos e geomorfológicos. Dados sobre solo e estruturas vegetacionais e de centros endêmicos de plantas, pássaros e borboletas. (Imagem compilada de Whitmore & Prance, 1987)	29
--	----

Lista de Tabelas

1. Local de amostragem de *M. capixaba* na região Serrana do Espírito Santo, coordenadas geográficas em graus decimais, número amostral (n), haplótipos mitocondriais e grupos definidos por unidades amostrais geograficamente mais próximas. Em localidades com mais de um ponto de coleta, as coordenadas geográficas estão indicadas apenas pelo primeiro ponto de amostragem para a localidade 11
2. *Primers* utilizados, posições iniciais e finais dos *primers* em relação ao genoma mitocondrial de *Melipona bicolor* e temperatura de pareamento 12
3. Locais de coleta de *M. scutellaris* no Estado da Bahia 14
4. Diversidade genética, testes de neutralidade e "tau" do gene mitocondrial COI. Note que o valor crítico equivalente a 0,05 para o teste FS de Fu é 0,02 18
5. Análise de Variância Molecular (AMOVA) de *M. capixaba* de acordo com colônias próximas geograficamente 21

Resumo

CRISTIANO, Maykon Passos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2009. **Variabilidade genética e filogeografia da espécie ameaçada de extinção *Melipona capixaba* Moure & Camargo (Hymenoptera: Apidae)**
Orientadora: Tânia Maria Fernandes Salomão. Co-Orientadores: Lúcio Antônio de Oliveira Campos e Karla Suemy Clemente Yotoko.

A abelha *Melipona capixaba* popularmente conhecida como “uruçu negra”, “pé de pau” ou “uruçu capixaba” foi descrita pela primeira vez em 1994 no município de Domingos Martins no estado do Espírito Santo. Esta espécie é endêmica de áreas de altitudes (700 a 1000 m) da região serrana do Espírito Santo e está relacionada com espécies de grupos amazônicos. Mesmo com sua recente descoberta, *M. capixaba* já se encontra na lista de espécies ameaçadas de extinção do IBAMA. Os principais fatores para esta condição seriam o desaparecimento e a fragmentação de seu habitat. Apesar da importância ecológica e do risco de extinção, poucos estudos com *M. capixaba* foram realizados. Assim, com o objetivo de obter dados que possam contribuir para o entendimento da estrutura genética de *M. capixaba*, nós conduzimos estudos filogeográficos e de variabilidade genética desta espécie, com base em análise do DNA mitocondrial. Foram analisadas sequências de 850 pb do gene COI de 61 indivíduos de *M. capixaba* amostrados no estado do Espírito Santo, em áreas de ocorrência desta abelha, 31 haplótipos foram identificados e foram estimados os índices de diversidade nucleotídica ($\pi = 0,00719$) e diversidade haplotípica ($Hd = 0,9235$). A árvore filogenética obtida por inferência bayesiana e a rede de haplótipos estabelecida pelo método *median-joining*, mostraram a formação de quatro grupos, porém, sem evidências de estruturação geográfica, uma vez que alguns indivíduos geograficamente distantes agruparam em um mesmo clado. Este padrão de distribuição geográfica encontrado na população de *M. capixaba* analisada pode decorrer da prática de translocações de colônias ou troca de discos de cria, o que é relativamente comum na região. A possível recente colonização de *M. capixaba* na região serrana do Espírito Santo pode estar, também, contribuindo para o padrão de distribuição geográfica observado.

Abstract

CRISTIANO, Maykon Passos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2009. **Genetic variability and phylogeography of the threatened bee *Melipona capixaba* Moure & Camargo (Hymenoptera: Apidae)**. Advisor: Tânia Maria Fernandes Salomão Co-Advisors: Lúcio Antônio de Oliveira Campos and Karla Suemy Clemente Yotoko

The bee *Melipona capixaba* commonly known as “uruçu negra”, “pé de pau” ou “uruçu capixaba” was first described in 1994 in the county of Domingos Martins in Espírito Santo State. This species is endemic to areas with altitudes of 700 to 1000m in the mountain region of the Espírito Santo, and it is related to species of Amazonian groups. In spite of its recent discovery, *M. capixaba* is already in the list of endangered species of IBAMA. This is mainly due to the disappearance and fragmentation of its habitat. Despite its ecological importance and the risk of its extinction, few studies on *M. capixaba* have been performed. Thus, in order to obtain data that can contribute to the understanding of the genetic structure of *M. capixaba*, we conducted phylogeographic studies and studies of the genetic variability of this species, based on mitochondrial DNA analysis. We analyzed sequences of 850 bp of COI gene of 61 individuals of *M. capixaba* sampled in the state of Espírito Santo, in areas of occurrence of this bee, 31 haplotypes were identified and were used to estimate rates of nucleotide diversity ($\pi = 0.00719$) and haplotype diversity ($Hd = 0.9235$). The phylogenetic tree obtained by Bayesian inference and the haplotypes network established by the median-joining method showed the formation of four groups. However, there was no evidence of geographic structure, since some individuals geographically dispersed clustered in a single clade. This geographic distribution pattern found in the analyzed population of *M. capixaba* may arise from the practice of translocation of colonies or exchanging of disks creates, which is relatively common in the region. The possible recent colonization of *M. capixaba* in the highlands region of Espírito Santo may be also contributing to the geographic distribution pattern observed.

1. Introdução

As abelhas são insetos amplamente distribuídos no mundo, e, por diversas razões, possuem grande interesse econômico e biológico. Esses insetos são os principais polinizadores de plantas com flores, contribuindo para a manutenção da diversidade nas espécies de Angiospermas. Além disso, são comumente integradas a atividades agrícolas para produção de mel e como agentes polinizadores nas culturas, aumentam a qualidade e quantidade da produção (Heard, 1999; Michener, 2000; Sarto *et al.*, 2005). As abelhas pertencem à Ordem Hymenoptera, à Subordem Apocrita, superfamília Apoidea e Família Apidae, que consiste em aproximadamente 15.000 espécies em todo o mundo, apresentando desde espécies solitárias a espécies extremamente sociais (Michener, 2000; Gillott, 2005).

No Brasil, o principal grupo de abelhas sociais nativas pertence à subfamília Meliponinae, conhecidas como “abelhas indígenas” ou “abelhas sem ferrão” (Kerr *et al.*, 1996; Velthuis, 1997). Embora as espécies de Meliponinae executem funções ecológicas importantes como a polinização de várias espécies, em muitos ecossistemas neotropicais, esta Subfamília é menos estudada quando comparado com Apinae (Arias *et al.*, 2006). Apesar da grande importância destas abelhas como agentes polinizadores, o número de colônias de meliponíneos vem diminuindo acentuadamente em consequência das alterações antrópicas em seus habitats, como desmatamentos, queimadas, o uso intensivo de agrotóxicos e ação predatória nas colônias (Kerr *et al.*, 1996, Aidar & Campos, 1998; Silveira *et al.*, 2002).

A tribo Meliponini apresenta 397 espécies distribuídas em 33 gêneros, dentre estes gêneros, encontra-se o gênero *Melipona* que é exclusivamente neotropical, com 4 subgêneros (*Eomelipona*, *Melikerria*, *Melipona* e *Michmelia*) e 69 espécies conhecidas (Moure *et al.*, 2009). Segundo Kerr *et al.* (1996), as espécies do gênero *Melipona* são muito frágeis às perturbações em seus habitats sendo um dos principais motivos a rainha fisogástrica não ter condições de voar após estabelecida a colônia.

A espécie *Melipona capixaba* Moure & Camargo, também conhecida como “uruçu negra”, “pé de pau” ou “uruçu capixaba”, foi registrada pela primeira vez em 1994 no Município de Domingos Martins, no Estado do Espírito Santo (Moure e Camargo, 1994) e até hoje não foi encontrada (naturalmente) em nenhuma outra localidade fora da região serrana de Domingos Martins. Trata-se, portanto, de uma espécie endêmica de áreas de altitude entre 700 a 1.000 metros do estado do Espírito Santo (Nascimento, 1996; Melo, 1996; Nascimento *et al.*, 2000; Resende *et al.*, 2008).

M. capixaba possui operárias robustas com tamanho consideravelmente grande e seu comprimento aproximado é de 10,8 mm. Em geral, possuem coloração escura, sua cabeça e tórax são castanho-escuros com desenhos amarelos foscos, tergos negro-brilhantes com faixas brancas em suas margens do primeiro ao quinto tergo e pilosidade bastante desenvolvida na fronte (Moure & Camargo, 1994). Segundo estes mesmos autores, esta espécie está relacionada com espécies amazônicas do grupo *fasciata*, devido à morfologia de suas genitálias com valvas curvas. Inicialmente, quando descrita, acreditava-se que se tratava de uma espécie oriunda da região amazônica, e não do estado do Espírito Santo (Moure & Camargo, 1994).

A ausência de isolamento pré e pós zigóticos possibilitou o cruzamento entre *M. capixaba* e *M. scutellaris*, quando colônias de *M. capixaba* foram transportadas do Espírito Santo para o meliponário da Universidade Federal de Uberlândia (Nascimento *et al.*, 2000). A similaridade anatômica das genitálias já havia sido ressaltada para estas duas espécies (Moure & Camargo, 1994). Possivelmente, o principal impedimento para o cruzamento natural entre elas seja a distância geográfica, já que *M. capixaba* e *M. scutellaris* estão separadas por mais de 300 km.

Mesmo sendo descrita recentemente como nova espécie, *M. capixaba* se encontra desde 2003 na lista de espécies ameaçadas de extinção do IBAMA. Sua inclusão na lista da fauna ameaçada de extinção justifica-se primariamente devido à fragmentação e destruição de seu habitat.

Um dos principais fatores de extinção de espécies são o desaparecimento e fragmentação de habitats. Estes fatores acarretam redução das áreas ocupadas pela vegetação nativa e diminuição do número de espécies, podendo também afetar direta ou indiretamente o tamanho populacional pela redução da capacidade de suporte do fragmento (Rolstad,

1991). Isto se deve ao fato de que as abelhas da subfamília Meliponinae, sobretudo, nidificam em ocos de árvores (Roubik, 2006) e a ausência de recursos, tais como locais de nidificação, diminuiriam ou extinguiriam o poder dispersivo destas espécies, afetando as populações. Estes processos resultam na perda da biodiversidade e na exaustão dos recursos genéticos pela extinção de alelos, ou ainda, por processos endogâmicos (Myers *et al.*, 2000).

Deve-se ressaltar, ainda, que a baixa diversidade resultante de processos endogâmicos, afetam as abelhas mais drasticamente devido ao seu mecanismo de determinação sexual. Em Apidae, o sistema de determinação sexual é do tipo haplodiplóide, onde as fêmeas (2n) resultam de ovos fecundados e os machos (n) de ovos não fecundados (Kerr *et al.*, 1996). Além disso, rainhas de *Melipona* geralmente acasalam apenas uma vez, com um único macho (Imperatriz-Fonseca & Zucchi, 1995). O aumento de cruzamentos endogâmicos leva ao surgimento de machos diplóides (2n). Os machos diplóides resultantes destes cruzamentos, geralmente são cegos, estéreis ou com número limitado de espermatozóides e as operárias eliminam os machos 2n quando estes emergem dos favos e matam a rainha (Kerr *et al.*, 1996; Wenseleers *et al.*, 2004). A segregação de fêmeas e machos diplóides em uma colônia endogâmica será de 1:1 e devido ao comportamento das operárias, 50% da população (machos 2n) será eliminada, podendo levar ao desaparecimento da colônia.

Nascimento (1996), verificando o efeito da fragmentação do habitat sobre a população de *M. capixaba* na região de Domingos Martins, estimou o número de alelos sexuais da espécie em 24 e que para a manutenção deste número seriam necessárias mil colônias de *M. capixaba* na referida região. No entanto, para a manutenção destas mil colônias seriam necessários 28,26 km² de área. Contudo, os fragmentos existentes que oferecem condições da ocorrência da espécie possuem, em média, 12,56 km², envolvidos por extensas matrizes de campos e culturas. Os resultados obtidos neste estudo mostram a fragilidade das populações de *M. capixaba* frente à fragmentação e os processos endogâmicos que podem ocorrer levando a espécie à extinção.

Apesar da importância ecológica e da condição de ameaça de extinção de *M. capixaba*, poucos estudos com esta abelha foram reportados (Moure e Camargo, 1994; Nascimento, 1996; Nascimento, 2001; Resende *et al.*, 2008). Vale ressaltar que apesar dos esforços despendidos para localização de

colônias naturais, a real área de ocorrência de *M. capixaba* no estado do Espírito Santo, ainda não está elucidada. Assim, estudos visando ampliar os conhecimentos genéticos de *M. capixaba* tornam-se extremamente necessários e emergenciais.

Diversos marcadores moleculares têm sido utilizados para estudos com abelhas. Um desses marcadores é o DNA mitocondrial que tem mostrado ser muito útil em estudos filogenéticos, genética de populações e conservação, no qual a detecção de polimorfismo em populações naturais é necessária (Cho *et al.*, 2007). Seu uso como marcador molecular se deve, principalmente, a três características fundamentais: sua herança predominantemente maternal, alta taxa de substituições nucleotídicas e exclusivamente ausência de recombinação (Avisé *et al.*, 1987; Harrison, 1989).

A molécula de DNA mitocondrial animal é constituída de uma sequência nucleotídica circular de aproximadamente 16 kb que inclui regiões que codificam 13 proteínas (três subunidades de citocromo oxidase c, citocromo B, subunidade 6 e 8 ATP F0 sintase, e 7 subunidades de NADH desidrogenase), 22 RNAs transportadores, duas subunidades ribossomais (12S e 16S) e uma região rica em A+T, relacionada com a sua replicação. A proporção de bases nucleotídicas A+T no DNA mitocondrial de insetos é mais alta do que em outros táxons, provavelmente devido às altas taxas de transversões sobre transições (Crozier & Crozier, 1993).

O gene da citocromo oxidase c subunidade I (COI), um dos genes mitocondriais mais conservados é o mais utilizado para estudos com artrópodes (Simon *et al.*, 1994) e vem sendo aplicado com sucesso para investigação da estrutura de populações destes (Muraji *et al.*, 2000; Usener & Cognato, 2005; Oshaghi *et al.*, 2006). No entanto, dentro da ordem Hymenoptera, que inclui as vespas e abelhas, ainda são poucos os estudos utilizando o gene COI.

Machado *et al.* (2001), utilizando sequências nucleotídicas do gene mitocondrial COI, investigaram a relação filogenética de 15 gêneros de vespas polinizadoras de Famílias de figos. Além disso, usando registros fósseis, calibraram o relógio molecular e estimaram o tempo de divergência dos gêneros. Com os resultados, puderam concluir que o surgimento do mutualismo entre as vespas e o figo ocorreu há cerca de 90 milhões de anos atrás e que sua atual distribuição geográfica corresponde, em muitos aspectos,

com as alterações geológicas desde o período Cretáceo. Além disso, os dados corroboraram o monofiletismo do grupo de vespas polinizadoras de figo, e sugeriram que esta relação mutualística, entre polinizador e espécies de figos, ocorreu apenas uma vez.

Estudando abelhas do gênero *Apis*, Tanaka *et al.* (2001) avaliaram a posição filogenética de *Apis nuluensis* e a filogeografia de *Apis cerana* no nordeste de Borneo, utilizando RNA ribossomal 16S e citocromo oxidase 1 e 2 (COI e COII). Os resultados deste estudo mostraram que *Apis nuluensis* e *Apis cerana* são muito relacionadas, como proposto em estudos anteriores e que *A. nuluensis* e *A. cerana* parecem ter se separado na glaciação durante o Plio-Pleistoceno, resultante de populações que colonizaram Borneo.

Ao estudar a filogeografia do polimorfismo social da abelha *Halictus rubiduncus*, Soucy & Danforth (2002) utilizaram métodos filogenéticos com base em sequências do gene COI e mostraram que as populações apresentam uma estrutura genética concordante com a expressão do comportamento solitário e social nas populações da América do Norte.

Dick *et al.* (2004) realizaram um dos primeiros estudos filogeográficos comparativos, baseado em sequências nucleotídicas do gene COI, entre espécies de Euglossines das regiões andinas e amazônicas. Os resultados mostraram que a divergência de COI entre as 14 espécies estudadas foi relativamente baixa e sugerem uma recente especiação, originada de uma única grande população. Os resultados sugerem, também, pequena diferenciação filogeográfica, ou até mesmo ausência de diferenciação e altos níveis de fluxo gênico sobre as planícies andinas nas espécies de Euglossini analisadas.

Em Meliponíneos o único estudo com abordagem filogeográfica foi relatado para a espécie *Melipona quadrifasciata*. Batalha-Filho (2008) estudando a distribuição de duas subespécies de *M. quadrifasciata* com base em polimorfismo de sequências de 852 pb do gene COI, detectou 50 haplótipos mitocondriais. As análises destes haplótipos mostraram que esta abelha apresenta dois grupos distintos, denominados de clado norte e clado sul. O clado sul é composto pela subespécie *M. q. quadrifasciata*, para os quais foram identificados 10 haplótipos e não existência de uma subestruturação geográfica e o clado norte inclui *M. q. anthidioides* com 40 haplótipos. Ainda neste estudo,

foi possível inferir, também, que a falta de estruturação geográfica no clado sul pode ser resultado de um gargalo populacional, devido a condições climáticas.

Estudos com enfoque em genética de populações são muito importantes para a interpretação e o entendimento de populações naturais. Este conhecimento é indispensável para o planejamento de estratégias de manejo e conservação de populações em risco de extinção. A conservação com base em uma única espécie nem sempre é aplicável, e apenas em casos particulares deve ser utilizada (Lewinsohn *et al.*, 2005). Este é o caso da espécie *M. capixaba*, que se encontra nesta situação particular. Considerando que esta espécie não está apenas restrita ao Bioma Floresta Atlântica, mas também confinada a uma determinada região da floresta no estado do Espírito Santo, sua preservação está fundamentalmente condicionada à preservação de seu habitat. Além disso, a Floresta Atlântica vem sofrendo sérios problemas com o desmatamento. Originalmente este bioma ocupava uma área de aproximadamente 1.300.000km² ao longo de toda a costa brasileira. Hoje, encontra-se reduzido a apenas 7,6% de sua cobertura original (Morellato & Haddad, 2000). Mesmo com este intenso desmatamento e áreas muito fragmentadas, a Floresta Atlântica abriga um dos maiores números de espécies endêmicas do planeta (Carnaval *et al.*, 2009). Talvez o grande desafio para a preservação deste bioma seja a grande suscetibilidade e influência antrópica. Estima-se que grande parte da população brasileira, mais de 70%, reside em áreas do domínio da Floresta Atlântica (Brasil, 2005). Além disso, destaca-se que este bioma vem sofrendo altos níveis de desmatamento e destruição de habitats desde a colonização europeia, há mais de 500 anos atrás (Vieira, 2008).

Diante do exposto, estudos sobre a variabilidade genética e filogeografia de *M. capixaba* certamente fornecerão dados que poderão ser utilizados para o entendimento da estruturação genética desta espécie. Estes resultados poderão contribuir para o desenvolvimento de estratégias que visem à preservação e o manejo sustentável desta abelha.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Obter informações filogeográficas com base em dados moleculares, que possam ser utilizadas em futuros programas de manejo e conservação da espécie *Melipona capixaba*.

2.2. Objetivos Específicos

- Estimar e caracterizar a variabilidade genética de *M. capixaba*.
- Detectar e caracterizar a estrutura geográfica populacional de *M. capixaba*.
- Inferir sobre os processos demográficos históricos que influenciaram o padrão de distribuição geográfica desta espécie.
- Caracterizar filogeneticamente *M. capixaba* e *M. scutellaris*.

3. Material e Métodos

3.1. Amostragem

Operárias de *Melipona capixaba* (Figura 1) foram coletadas em meliponários ou condições naturais, em sete municípios no estado do Espírito Santo, localizados na região de ocorrência desta abelha (Figura 2). As áreas de amostragem e os pontos de coleta com as referidas coordenadas geográficas obtidos com o auxílio de um aparelho GPS (*Global Positioning System*) estão sumarizados na Tabela 1.

As amostras foram conservadas em frascos contendo etanol 99%, transportadas e armazenadas em ultrafreezer -80°C , no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, até o momento da extração do DNA.

3.2. Extração do DNA total

O DNA genômico total de *M. capixaba* foi obtido utilizando a metodologia de extração adaptada de Fernandes-Salomão *et al.* (2005). Individualmente os tórax foram colocados em microtubo e, com auxílio de um pistilo de vidro devidamente desinfetado e esterilizado em chama, foram macerados com nitrogênio líquido. Depois de macerado, foram adicionados 900 μL de tampão de extração (2% CTAB; 100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1.4 M NaCl; 20 mM EDTA) contendo 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de protease. O macerado foi incubado a 65°C por 30 minutos e homogeneizado cuidadosamente a intervalos de 10 minutos. Para a desproteíntização, adicionou-se ao macerado uma mistura de fenol/clorofórmio 1:1 (uma vez) e clorofórmio (uma vez). Após cada adição, a mistura foi homogeneizada cuidadosamente por 10 minutos e mantida em banho de gelo para evitar aquecimento das amostras. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 15.700 g por 10 minutos em microcentrifuga.

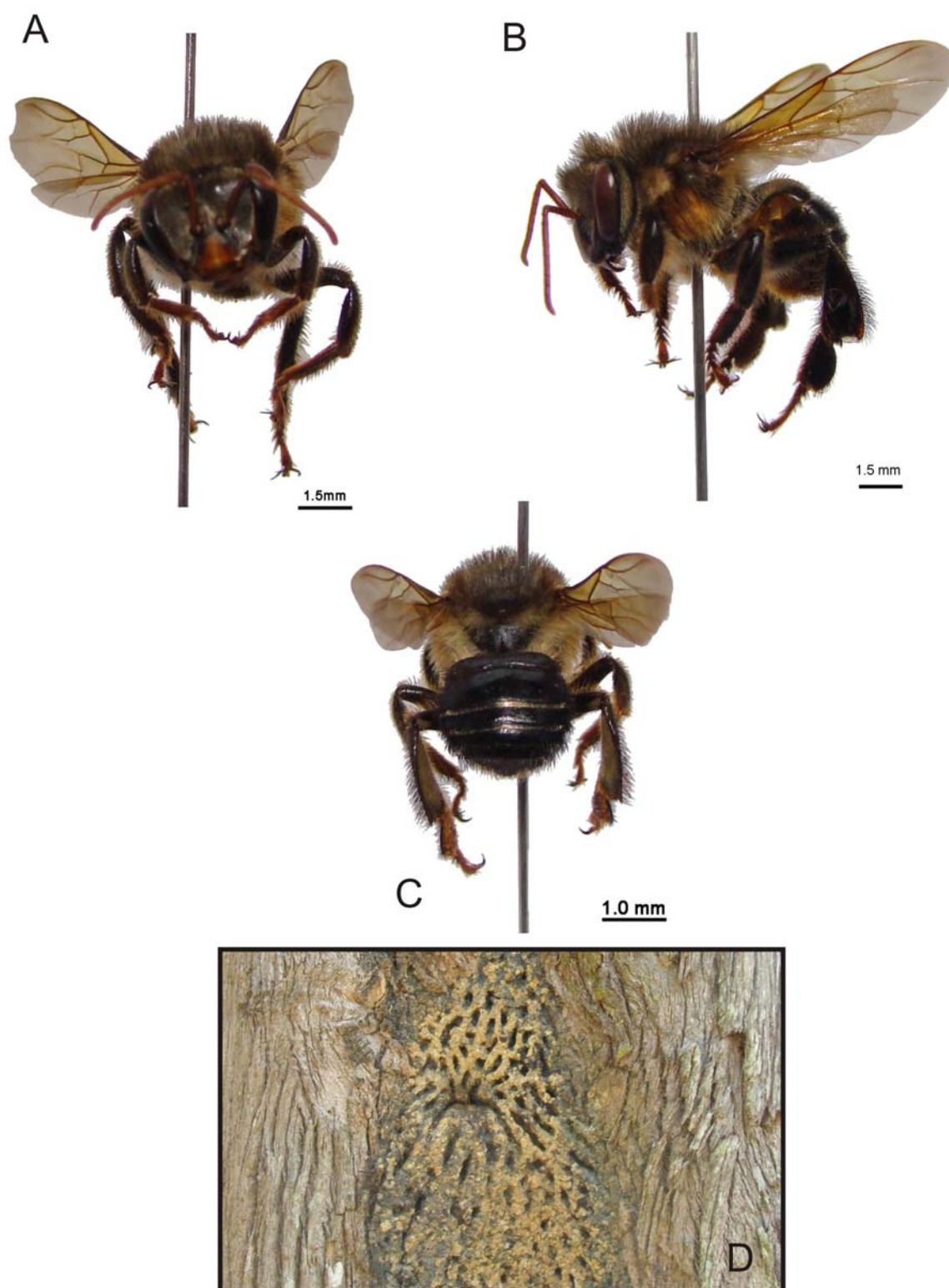


Figura 1 – *Melipona capixaba* Moure & Camargo (1994) vista nas posições: Frontal (A), Lateral (B), Dorsal (C) e entrada de um ninho característico da espécie (D).

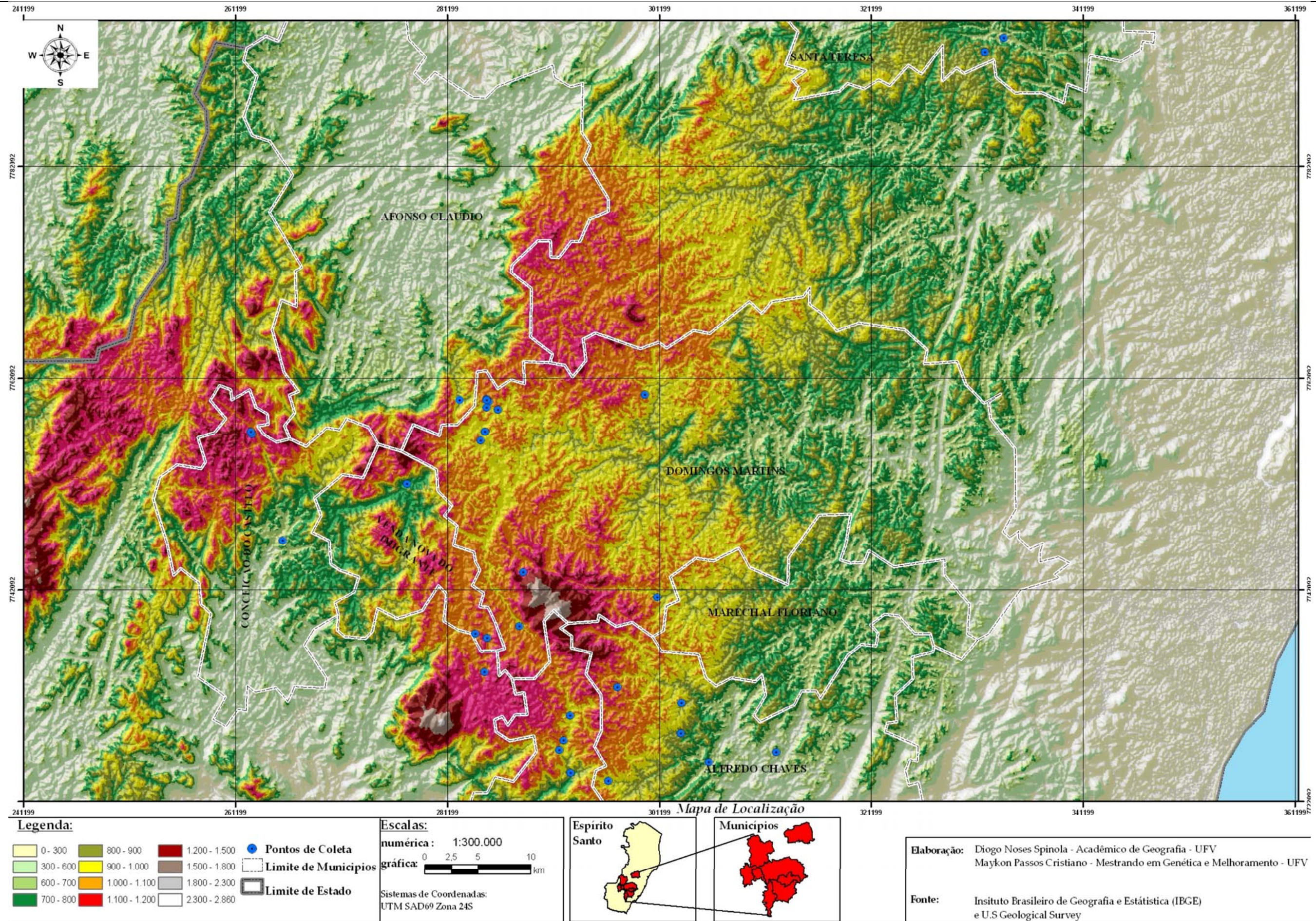


Figura 2 – Mapa mostrando o local de coleta de *M. capixaba* no Estado do Espírito Santo.

Tabela 1 – Local de amostragem de *M. capixaba* na região Serrana do Espírito Santo, coordenadas geográficas em graus decimais, número amostral (n), haplótipos mitocondriais e grupos definidos por unidades amostrais geograficamente mais próximas. Em localidades com mais de um ponto de coleta, as coordenadas geográficas estão indicadas apenas pelo primeiro ponto de amostragem para a localidade.

Município	Localidade	Latitude (S)	Longitude (W)	n	Haplótipos	Grupos
Alfredo Chaves	Matilde	-20.549	-40.801	3	H7, H18	IV
	São Roque de Maravilha	-20.532	-40.887	3	H7	IV
	São Bento de Urânia	-20.506	-40.886	5	H7, H9, H23, H24	IV
Vargem Alta	Castelinho	-20.517	-40.985	3	H27, H26, H25	IV
	Vila Maria	-20.545	-40.997	6	H7, H28, H29	IV
	Taquaruçu	-20.565	-40.987	2	H7, H30	IV
	São Brás de Maravilha	20.572	-40.953	1	H31	IV
Venda Nova do Imigrante	Alto Caxixe	-20.453	-41.058	4	H5, H9, H10	III
	Venda Nova do Imigrante	-20.316	-41.132	3	H2, H7	II
Domingos Martins	Braço do Sul	-20.478	-41.064	2	H2	III
	Pedra Azul	-20.414	-41.039	1	H9	III
	Portal Pedra Azul	-20.393	-41.028	1	H10	III
	São Paulo do Aracê	-20.433	-41.034	3	H3, H4, H9	III
	Alto Juçu	-20.310	-41.030	1	H7	I
	Lajinha	-20.273	-41.061	11	H22, H5, H1, H2, H9, H11, H12, H13	I
	Tujuco Preto	-20.243	-40.916	3	H15, H16, H17	I
Alfonso Cláudio	Alto Guandu	-20.245	-41.059	1	H5	I
Santa Tereza	São Pedro	-19.953	-40.606	1	H14	I
	Santa Tereza	-19.941	-40.589	1	H2	I
Conceição do Castelo	Ribeirão do Meio	-20.272	-41.271	3	H6, H8	II
	Conceição do Castelo	-20.363	-41.245	3	H19, H20, H21	II
Total				61	31	

O sobrenadante foi recolhido em um microtubo e a este foi adicionado 1 μL RNase a 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para cada 100 μL da mistura. Em seguida o sobrenadante foi incubado em banho-maria a temperatura de 37°C, durante 30 minutos. O DNA foi precipitado com a adição de isopropanol gelado (1 volume), seguido de incubação *overnight* a -20°C. Após a incubação, a amostra foi centrifugada por 16.000 g em centrifuga refrigerada por 30 minutos. O precipitado foi lavado três vezes com etanol 70% gelado, seco, e ressuspenso com 50 μL de Tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0). A quantificação e a qualidade do DNA extraído foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) contendo brometo de etídio (0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e visualização com luz UV.

3.3. Amplificação e sequenciamento do gene COI

O gene da citocromo oxidase c subunidade I (COI) de 61 indivíduos de *M. capixaba* foi amplificado utilizando os pares de *primers* COX1/COX3 e COX2/COX4 (Tabela 2). Os *primers* foram os mesmos utilizados por Batalha-Filho (2008) para a espécie *Melipona quadrifasciata*, o qual foram desenhados a partir da sequência COI de *Melipona bicolor* (Silvestre *et al.*, 2008) depositadas no Genbank, acesso AF466146.1 (Batalha-Filho, 2008). As sequências COI obtidas com cada um dos pares de *primers* foram concatenadas manualmente no programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007), obtendo-se as sequências completas para o gene COI.

Tabela 2 – *Primers* utilizados, posições iniciais e finais dos *primers* em relação ao genoma mitocondrial de *Melipona bicolor* e temperatura de pareamento

<i>Primer</i>	Sequência	Posição do <i>primer</i> no genoma (pb)		Temperatura pareamento
		Início	Final	
COX1	5'-AAGTTAAATAAACTATTAATCTTC-3'	1388	1411	47°C
COX3	5'-TAATCCTACTGTAAATATATGATGGG-3'	2434	2455	
COX2	5'-CAATACTATATTATTATTTGATCG-3'	2178	2202	52°C
COX4	5'-CTTGAAATGAAATTATATTTTCATGTTG-3'	3202	3228	

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Mastercycler® gradient 5331 marca Eppendorf. Quando se utilizou os *primers* COX1 e COX3 à mistura da reação continha 0,6 µM de cada um dos *primers*, tampão flexi GoTaq® 1X (Promega); MgCl₂ 1.0 mM; 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato; 1,25 U de DNA polimerase GoTaq® (Promega), aproximadamente 50 ng de DNA genômico total, em um volume final de 50 µL. A mistura de reação utilizando os *primers* COX2 e COX4 constituiu de 0,4 µM de cada um dos *primers*, tampão flexi GoTaq® 1X (Promega); MgCl₂ 1.0 mM; 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato; 1,25 U de DNA polimerase GoTaq® (Promega), aproximadamente 50 ng de DNA genômico total, em um volume final de 50 µL. As condições de amplificação foram de 94 °C por 5 minutos, para uma desnaturação inicial, seguidas de 35 ciclos a 94 °C por 1 minuto, a temperatura de pareamento específica para cada par de *primer* (Tabela 2) por 1 minuto e 20 segundos, 64 °C por 2 minutos e uma extensão final de 64 °C por 10 minutos.

Os fragmentos COI amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose (1,5% p/v) e purificados com kit de purificação PuriLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida foram ligados ao plasmídeo pGEM-T Easy Vector System (Promega, EUA), inseridos em *Escherichia coli* DH5α ultracompetente (Inoue *et al.*, 1990), e posteriormente plaqueadas em meio LB com ampicilina (50 mg.mL⁻¹) e X-gal (20 mg.mL⁻¹) com incubação a 37°C *overnight*. Os plasmídeos recombinantes foram extraídos com kit de extração Miniprep Kit S.N.A.P. (Invitrogen, EUA), conforme as recomendações do fabricante. Após extração, o DNA plasmidial foi quantificado por eletroforese em gel de agarose (1,0% p/v) e diluído em água ultrapura para a concentração de 100 ng.µL⁻¹.

O sequenciamento dos fragmentos COI amplificados foi realizado em ambas as direções utilizando os *primers* pUC/M13 *Forward* e *Reverse* e o kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare, Freiburg, Germany), e as leituras realizadas em sequenciador automático MegaBACE™500 (GE Healthcare).

Adicionalmente, foram sequenciados fragmentos COI de nove indivíduos de *Melipona scutellaris*, coletados no Estado da Bahia (Tabela 3), utilizando os mesmos procedimentos descritos para *M. capixaba*. Esta espécie foi utilizada

no trabalho, no intuito de verificar a relação filogenética de *M. capixaba* e *M. scutellaris*, uma vez que, existe uma relação morfológica muito semelhante entre estas espécies

Tabela 3 – Locais de coleta de *M. scutellaris* no Estado da Bahia.

Município	Latitude (S)	Longitude (W)	n
Cruz das Almas	-12.678056	-39.040278	2
Amargosa	-13.084444	-39.649444	2
Andaraí	-12.798056	-41.328333	2
Utinga	-12.0775	-41.098889	1
Rui Barbosa	-12.288889	-40.495278	1
Jequitiba	12.050556	-40.495278	1

n = Número de amostras

3.4. Análise dos dados

As sequências COI de *M. capixaba* e *M. scutellaris* foram importadas dos cromatogramas com o auxílio do pacote computacional *Phred*, *Phrap* e *Consed* (Ewing *et al.*, 1998; Ewing & Green, 1998; Gordon *et al.*, 1998). A qualidade das sequências foi inspecionada e as mesmas editadas manualmente, quando necessário. As sequências foram analisadas com o intuito de avaliar a existência de porções ambíguas e de baixa qualidade *Phred*.

Para conferir a identidade das sequências de DNA obtidas, as mesmas foram comparadas utilizando a ferramenta *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) segundo Altschul *et al.* (1990), com base em sequências do gene mitocondrial COI depositadas no Genbank. O alinhamento das sequências foi realizado empregando o algoritmo *Clustal W* (Higgins *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 1997) implementado no programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). Para garantir a homologia dos sítios, as sequências foram primeiramente traduzidas para sequências de aminoácidos, utilizando-se como referências sequências

do gene mitocondrial COI de um indivíduo de *M. bicolor* (Acesso AF466146.1), um de *M. quadrifasciata* (Batalha-Filho, 2008) e nove de *M. scutellaris*. O alinhamento obtido foi analisado e editado manualmente quando necessário.

As sequências de DNA foram analisadas com o emprego do programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). Os índices de diversidade nucleotídica (π , número médio de diferenças nucleotídicas por sítio entre duas sequências; Nei, 1987) e de diversidade haplotípica (Hd, probabilidade de que dois haplótipos escolhidos aleatoriamente sejam diferentes entre si na amostra; Nei, 1987) foram estimados pelo programa DNASP 4.0 (Rozas *et al.*, 2003).

Para verificar a existência de uma possível correlação espacial linear entre a distância genética e a distância geográfica, utilizou-se o teste de Mantel, implementado pelo programa AIS (*Alleles in Space*, Miller, 2005). O teste de Mantel realiza comparações aleatórias entre a matriz de distância geográfica, calculada pela comparação par a par da localização espacial da colônia, obtida com o GPS e a matriz de distância genética obtida da comparação par a par das sequências nucleotídicas dos indivíduos analisados. Decorrente da atividade de meliponicultura, algumas colônias analisadas não se encontravam em sua localidade original. Por isto, informações obtidas junto aos proprietários sobre a origem destas colônias foram utilizadas para a realocação destas em suas localidades originais ou até mesmo a exclusão das mesmas, para realização do teste de Mantel.

Para verificar a possível ocorrência de expansão populacional foram realizados os testes de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1983) e Fs de Fu (Fu, 1997) utilizando o programa Arlequin versão 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Estes testes verificam desvios do conjunto de dados à teoria neutra da evolução molecular, estimados a partir dos haplótipos de DNA mitocondrial.

A data de expansão populacional foi estimada com o parâmetro τ (tau) gerado por *mismatch distribution* no programa Arlequin, por meio da fórmula $\tau=2\mu t$, onde “ μ ” é a taxa de mutação e “t” o tempo, em gerações, desde a expansão. A taxa de mutação empregada para gerar o tempo desde a expansão foi de 1,2 a 1,5% por milhão de anos. Esta taxa foi calibrada em estudos com o gene COI para insetos da ordem Coleoptera e Lepidoptera (Caccone & Sbordoni, 2001; Farrel, 2001; Lohman *et al.*, 2008). A mesma taxa

foi empregada em estudos com abelhas Euglossinae (Dick *et al.*; 2004), e recentemente com *M. quadrifasciata* (Batalha, 2008).

A verificação da existência de estruturação populacional da espécie *M. capixaba* foi avaliada por Análise de Variância Molecular (AMOVA), com auxílio do programa Arlequin versão 3.1. (Excoffier *et al.*, 2005). O cálculo foi determinado para dois níveis hierárquicos e, foram consideradas como populações oriundas de uma mesma localidade geográfica, estabelecendo quatro grupos geograficamente próximos. Do mesmo modo que para o teste de Mantel, as colônias que não se encontravam em seu local de origem, foram realocadas em seus grupos originais ou excluídas da AMOVA.

Análise filogenética Bayesiana foi realizada empregando o programa MrBayes 3.1 (Huelsenbech & Ronquist, 2001). O programa MrModelTest (Nylander *et al.*, 2004) foi utilizado para selecionar o modelo de substituição nucleotídica para inferência Bayesiana. Para a análise foram utilizados 10 milhões de gerações para cadeia de Markov e Monte Carlo (MCMC) e *burn-in* de 5 milhões. Foram utilizados como grupos externos *M. bicolor* e *M. quadrifasciata*. Todas as árvores foram visualizadas utilizando o programa TreeView 1.6.6 (Page, 2001). Utilizou-se também se o PAUP* (Swofford, 1998) para verificar o excesso de homoplasia na parte inicial e final do gene.

O programa NETWORK versão 4.5.10 (Fluxus Technology Ltd) foi utilizado para inferir a genealogia do gene COI empregando o método *median-joining* (Bandelt *et al.* 1999). Este programa permite que relações entre as sequências possam ser traçadas, interconectando os dados ao ancestral comum e construindo uma rede da genealogia do gene.

4. Resultados

4.1. O gene COI de *M. capixaba*

A região correspondente ao gene COI de *M. capixaba* foi amplificada e os fragmentos obtidos, sequenciados. O *Blast* das sequências de *M. capixaba* confirmou que os fragmentos amplificados realmente eram sequências do gene COI. O tamanho das sequências foi de 1843 pb incluindo o tRNA^{Tyr} com 67pb, e o tRNA^{Leu} com 65 pb, que iniciam no sítio 59 e 1749 do alinhamento, respectivamente.

Ao analisar as sequências COI de *M. capixaba*, observou-se que a parte inicial do gene (850 pb) apresenta na sua sequência um índice de homoplasia menor do que a parte final (716 pb). Diante desta observação, análises filogenéticas preliminares utilizando separadamente as sequências correspondentes as partes inicial e final, ou a sequência completa do gene foram realizadas com o objetivo de testar se a sequência completa, ou apenas parte dela, era informativa. Os resultados dessa análise sugeriram que apenas a parte inicial do gene era informativa, considerando os objetivos propostos neste trabalho. Assim, as análises posteriores foram realizadas utilizando apenas as sequências COI correspondentes a esta região do gene.

4.2. Diversidade das sequências

O alinhamento de 850 pb obtidos para as sequências de *M. capixaba* resultou em 810 sítios conservados, 40 sítios variáveis, 25 sítios informativos para a parcimônia e 15 *singletons*. As proporções das bases foram de T: 42.40%, C: 11.20%, A: 35.60% e G: 10.80%.

Os dados de diversidade genética e os resultados dos testes de neutralidade e valores de *p* estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Diversidade genética, testes de neutralidade e “tau” do gene mitocondrial COI. Note que o valor crítico equivalente a 0,05 para o teste FS de Fu é 0,02.

Índices	<i>M. capixaba</i>
n	61
h	31
Hd (\pm SD)	0,9235 (\pm 0,023)
π (\pm SD)	0,00719 (\pm 0,0004)
FS de Fu	-13,64816*
D de Tajima	-0,94397 ^{ns}
Tau (τ)	6,674

n: tamanho amostral; h: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica; \pm SD: desvio padrão; ^{ns}: não significativo; *: significativo ($p < 0,02$);

Os testes de neutralidade sugerem ocorrência de eventos de expansão populacional histórico para *M. capixaba*, por indicarem inconsistência com o modelo de tamanho populacional constante sob neutralidade, embora o teste D de Tajima não mostre valor significativo. Os valores negativos de D de Tajima são concordantes com o teste Fs de Fu, o qual possui poder estatístico superior (Ramos-Onsins e Julio Rozas, 2002).

A datação de uma possível expansão populacional foi inferida pelo valor “tau” estimado em 6,674. Para o cálculo, levou-se em consideração a taxa de evolução do gene COI (1,2 a 1,5%, para insetos, *ver metodologia*) e tempo de geração de *M. capixaba* de um ano, que significa o tempo de divisão da colônia mãe e colônia filha. O tempo desde a expansão populacional de *M. capixaba* foi de 264.526 a 330.657 anos A.P. (Antes do Presente), para o valor de taxa de mutação máximo e mínimo, respectivamente.

4.3. Teste de Mantel

O resultado do teste de Mantel, com a exclusão das colônias translocadas decorrentes da atividade de meliponicultores, mostrou uma correlação $r = 0,2861$ ($P < 0,001$) entre a matriz de distância genética e a matriz de distância geográfica (Figura 3). Praticamente nenhuma diferença no valor de correlação ($r = 0,2654$ e $p < 0,001$) foi observado quando as 61 amostras foram utilizadas, ou seja, não levando em consideração a atividade humana. Assim, apesar da correlação ser significativo, a magnitude desta é muito baixo. Deste modo, a variação genética encontrada não é devido ao isolamento geográfico dos indivíduos de *M. capixaba*.

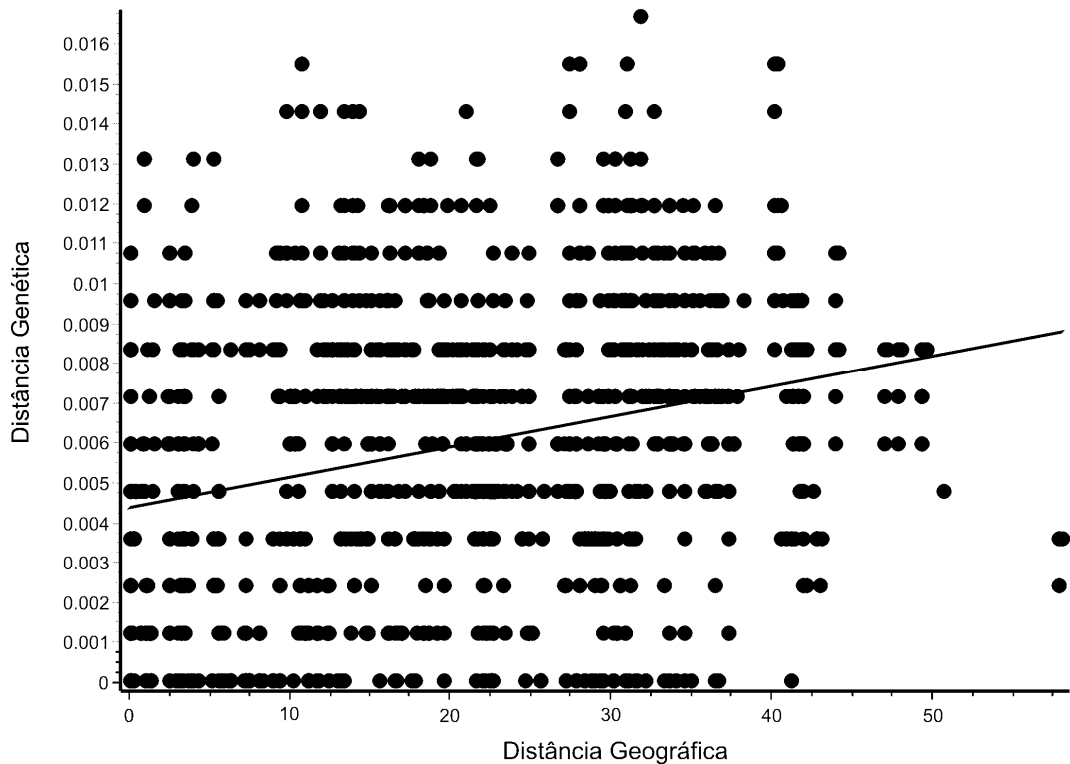


Figura 3 – Correlação par a par entre a matriz de distância genética e matriz de distância geográfica estimados pelo teste de Mantel com 10 mil permutações para *M. capixaba*.

4.4. Análise filogenética

Dentre os modelos obtidos pelo MrModeltest, o modelo HKY+I+ Γ , com proporção de sítios invariáveis de 0,8758, parâmetro de distribuição $\Gamma= 4,0403$, NST = 2 e *rates* = INVGAMMA, foram os mais adequados para o conjunto de dados, incluindo os grupos externos, para análise de inferência Bayesiana.

A árvore filogenética construída pelo método Bayesiano para o gene mitocondrial COI mostra a formação de quatro grupos (Figura 4), porém, alguns dos ramos são suportados por valores baixos de probabilidades posteriores. Os grupos formados não apresentam uma concordância total com a sua distribuição geográfica.

A espécie *M. capixaba* forma um grupo monofilético. Como esperado, *M. capixaba* e *M. scutellaris* são grupos irmãos, com alto valor de probabilidade posterior (1,00).

4.5. Estruturação populacional

A Figura 5 mostra a rede de haplótipos estabelecida a partir das sequências parciais do gene mitocondrial COI, utilizando o método *median-joining*. A rede apresenta três haplótipos mais frequentes (H7, H2, H9) de onde irradiam os demais haplótipos. Não existe uma estruturação populacional com base na localização geográfica das colônias, uma vez que, em alguns casos, o mesmo haplótipo é encontrado em colônias geograficamente distantes, como acontece com o haplótipo 2 (Figura 6).

A rede de haplótipos mostra também cinco haplótipos diferenciados distribuídos por toda a área de ocorrência da espécie (H1, H10, H12, H20, H24), e que apresentam um grande número de passos mutacionais compartilhados. Estes haplótipos diferenciados são ligados ao de maior frequência (H2), por meio do haplótipo 13. O haplótipo H30 também é outro haplótipo diferenciado com muitos passos mutacionais.

A análise de variância molecular foi realizada com dois níveis hierárquicos, permitindo assim uma partição da variação genética entre e dentro dos grupos. Quatro grupos foram previamente estabelecidos de acordo com a proximidade geográfica das colônias. Essa partição mostrou que a maior

parte da variação genética está contida dentro dos grupos (74.43%), e a variação restante (25.57%) está entre os grupos (Tabela 5). Estes valores foram significativos para as duas fontes de variação ($P < 0.001$), calculadas por 1000 permutações ao acaso. O índice de fixação Φ_{st} foi de 0.25574 ($P < 0.001$), realizados entre os pares de haplótipos dentro dos grupos.

Tabela 5 – Análise de Variância Molecular (AMOVA) de *M. capixaba* de acordo com colônias próximas geograficamente.

Fonte de Variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variação	Φ_{st}
Entre Grupos	3	44.043	0.83994	25.57	0.25574*
Dentro Grupos	57	139.334	2.44446	74.43	
Total	60	183.377	3.28440	100.00	

G.L. = graus de liberdade. * = Significante ($P < 0.001$) para 1000 permutações.

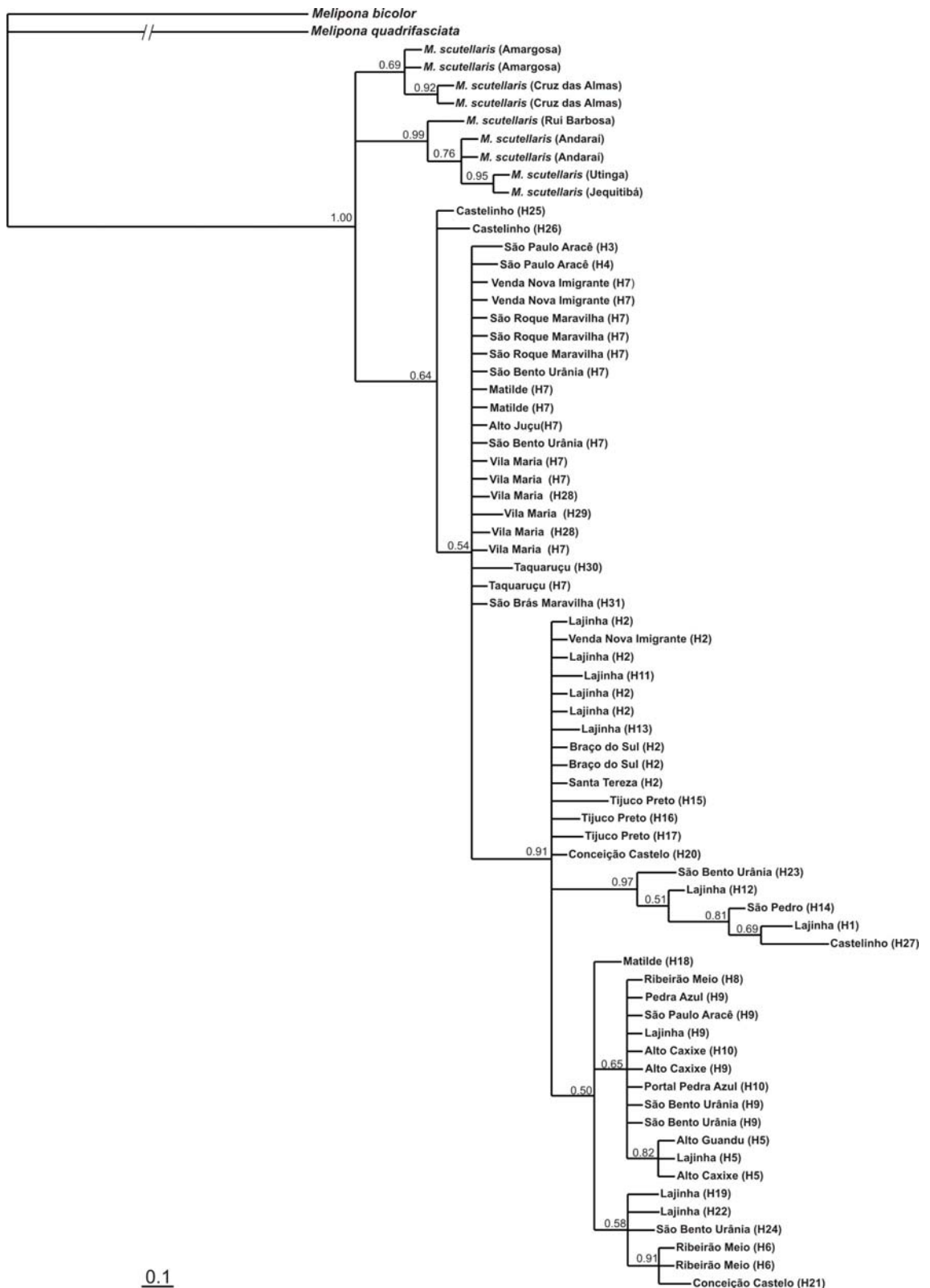


Figura 4 – Árvore consenso obtida por inferência filogenética bayesiana utilizando sequências de 850 pb de COI. Os indivíduos de *M. capixaba* estão identificados pelos nomes das localidades e haplótipos conforme a Tabela 1. *M. scutellaris* está identificada com o nome da espécie e a localidade de coleta. As probabilidades posteriores estão apresentadas a cada bifurcação. Grupos externos: *M. bicolor* e *M. quadrifasciata*.

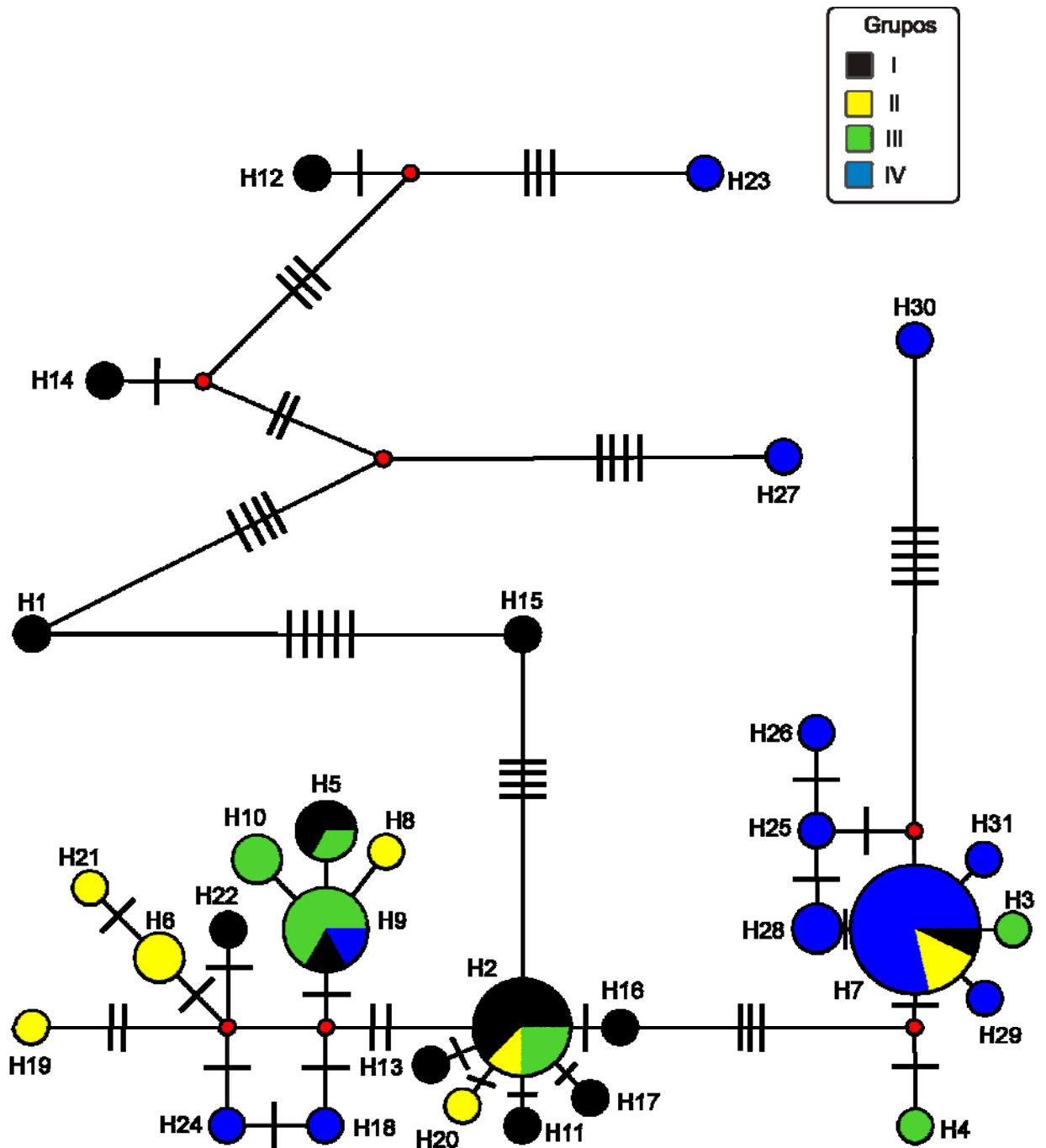


Figura 5 – Rede de haplótipos *median-joining* com base em sequências COI de *M. capixaba*. Cada círculo representa um haplótipo e seu tamanho é correspondente à frequência de cada um deles. Círculos vermelhos indicam *median vectors*. As barras localizadas entre dois haplótipos indicam o número de mutações que separam os respectivos haplótipos. Cada cor representa um dos quatro grupos geograficamente próximos (ver tabela 1).

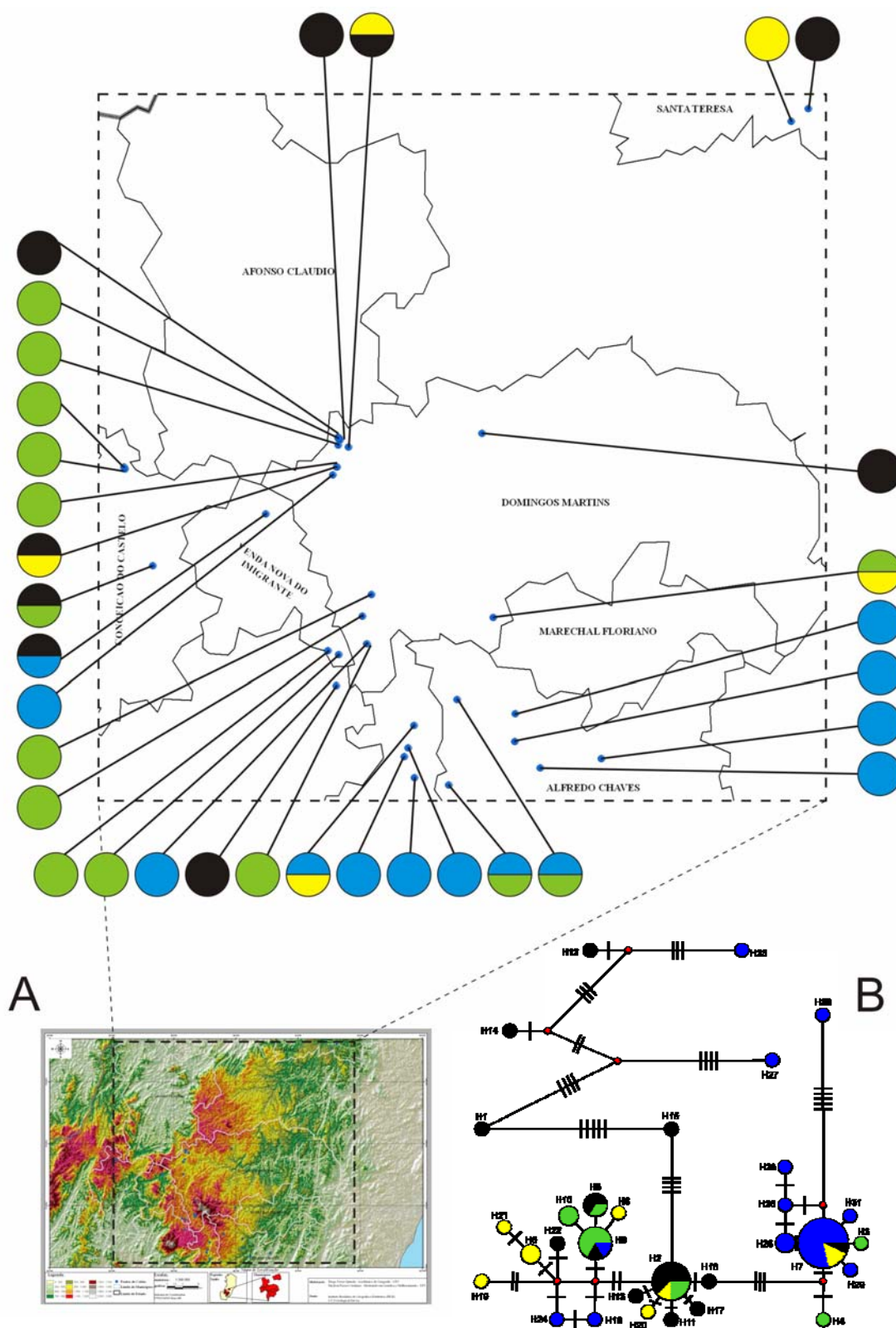


Figura 6 – A: Distribuição espacial dos haplótipos. B: Rede de haplótipos (Figura 5).

5. Discussão

5.1. Diversidade genética e estrutura populacional

A composição de bases da sequência parcial do gene COI para a espécie *M. capixaba* é rica em A+T (78.0%), como é esperado para o DNA mitocondrial de insetos (Crozier & Crozier, 1993, Simon *et al.*, 1994, Dick *et al.*, 2004, Shih *et al.*, 2006, Nakamine & Takeda, 2008, Silvestre *et al.*, 2008). Resultados semelhantes foram também obtidos para sequências parciais do gene COI de *M. quadrifasciata* (Batalha-Filho, 2008) e citocromo B de *M. mondury* e *M. rufiventris* (Lopes, 2008).

Os valores dos índices de diversidade nucleotídica ($\pi = 0,00719$) e haplotípica ($Hd = 0,9235$) estimadas para *M. capixaba* foram semelhantes aos encontrados por Batalha-Filho (2008) para *M. quadrifasciata* ($\pi = 0,00547$ e $h = 0,957$). Estes valores indicam que a população de *M. capixaba* descendeu de uma população ancestral de tamanho efetivo pequeno, seguido de uma expansão populacional.

Segundo Avise (2000), a comparação dos valores de diversidade nucleotídica e diversidade haplotípica fornecem informações sobre a história demográfica da população. Isto foi demonstrado empiricamente por Grant & Bowen (1998) comparando os índices h e π de várias espécies de peixes marinhos. Grant & Bowen (1998) ainda sugerem quatro classes de combinações entre valores altos e baixos desses índices, sendo que valores baixos de diversidade nucleotídica acompanhados de uma diversidade haplotípica alta, sugerem que a população mantinha um pequeno tamanho populacional efetivo antes de uma expansão populacional.

Os resultados obtidos com os testes de neutralidade F_s de F_u e D de Tajima também sugerem uma expansão populacional para *M. capixaba*. Estes testes estatísticos indicam se há desvios na condição de equilíbrio neutro nas mutações das sequências de *M. capixaba*. Deste modo, a estatística F_s de F_u negativa e significativa (-13,64), e valor da estatística D de Tajima negativo (-

0,94) indicam desvio da evolução neutra e reafirmam a expansão demográfica recente da população de *M. capixaba*.

Os resultados obtidos pela AMOVA indicam que existe estruturação na população de *M. capixaba*, porém, a maior parte da variação genética observada se encontra dentro das populações (delineadas em função de distanciamento geográfico e altitudes de ocorrência) de *M. capixaba* (74,43%), do que entre populações.

A rede de haplótipos de *M. capixaba* não mostra estruturação geográfica bem definida ao longo da restrita área de ocorrência desta espécie, muitos indivíduos amostrados em áreas geograficamente distantes agrupam em um mesmo clado na rede de haplótipos (Figura 6). Existe de fato uma tendência para os indivíduos próximos estarem incluídos no mesmo grupo, porém, como já mencionado, observa-se nestes grupos a presença de indivíduos geograficamente mais distantes. Apesar da rede de haplótipos não mostrar de maneira clara uma separação geográfica, os indivíduos geograficamente próximos podem ser considerados geneticamente relacionados. É possível, também, verificar na rede de haplótipos a existência de haplótipos únicos diferenciados, com muitos passos mutacionais compartilhados entre eles (H15, H1, H27, H14, H12, H23, Figura 5).

O padrão de distribuição genética da população de *M. capixaba* pode ser explicado por meio de duas hipóteses possíveis não inteiramente exclusivas, translocação de colônias ou colonização recente.

A existência de translocação de colônias em regiões diferentes impossibilitaria a distinção de subpopulações devido vários haplótipos diferentes em uma mesma região. Sabe-se que a atividade de meliponicultura é bastante intensa na região onde a espécie *M. capixaba* tem sido amplamente criada em meliponários. Assim, as atividades de permuta de discos (células de crias), transporte e comercialização das colônias entre as diferentes localidades podem ter contribuído para a estruturação observada. A translocação de colônias de *M. capixaba* é uma ação deliberada e conhecida. As colônias de Santa Tereza (Haplótipo H2) e de Venda Nova do Imigrante (Haplótipo H7) constituem exemplos dessa atividade de translocação. Este pode ter sido o fator fundamental para o padrão encontrado, uma vez que grande parte das amostras analisadas no presente estudo é proveniente de meliponicultores. A ocorrência de vários haplótipos de diferentes regiões em

uma mesma área pode ser ainda resultado da proximidade das áreas de ocorrência da espécie. A provável área de ocorrência de *M. capixaba* não excedeu grandes distâncias, de acordo com as coletas. Então, a distância máxima entre as colônias amostradas foi relativamente pequena (60 km), em comparação a uma espécie de ampla distribuição como, por exemplo, *M. quadrifasciata* que ocorre desde o Nordeste até o Sul do país, em uma extensão aproximada de 3.000 km. Uma parte considerável dos grupos formados é de indivíduos de uma mesma região. Assim, a hipótese de que poderia estar ocorrendo migração de uma localidade para outra localidade parece pouco provável.

O padrão de estruturação genética encontrado em *M. capixaba* também pode estar relacionado com a ocorrência de um possível evento de colonização em um passado recente, e hoje se encontra toda reunida em uma única região. Pedro *et al.* (2008) estudando a estruturação populacional da espécie de mosquito *Sabethes albiprivus* em uma pequena área amostral (70 x 35 km), verificaram que a estrutura da população encontrada hoje é consequência de evolução alopátrica das populações em épocas passadas. Segundo estes autores, esta hipótese é sustentada por um sinal genético de recente crescimento populacional. Deste modo, é esperado que o tamanho populacional deste mosquito, o qual habita obrigatoriamente o interior de florestas, aumente e diminua durante as expansões florestais e os períodos glaciais. É possível que este evento também tenha ocorrido com *M. capixaba* durante os muitos ciclos de restrição e reexpansão das florestas no passado. Este evento pode até mesmo ser o responsável pela origem desta espécie a partir de seu ancestral comum, congênere de *M. scutellaris*, encontrada na região nordeste do Brasil, da Bahia até o Rio Grande do Norte.

Moure e Camargo (1994) sugerem que *M. capixaba* e *M. scutellaris* sejam espécies irmãs por apresentarem presença de desenhos amarelos no clipeo e paroculares inferiores, além de mostrarem estrutura morfológica das genitálias praticamente idênticas. Rocha & Pompolo (1998) ao analisarem o cariótipo de espécies de *Melipona*, determinaram dois grupos de acordo com o conteúdo heterocromático, sendo *M. capixaba* e *M. scutellaris* incluídas no mesmo grupo, o de alto conteúdo heterocromático. Fernandes-Salomão *et al.* (2002), estudando espécies de *Melipona*, não encontraram nenhuma diferença nos perfis gerados a partir de PCR-RFLP do DNA mitocondrial (COI/COII) e

nuclear (ITS1 – espaçador intergênico ribossomal) de *M. capixaba* e *M. scutellaris*, sugerindo a estreita relação genética entre essas duas espécies. Outra evidência de que estas duas espécies possuem uma história evolutiva muito próxima, foi a observação de hibridação espontânea em condições não naturais (Nascimento *et al.*, 2000). A ocorrência do cruzamento em meliponário e a formação do híbrido fértil, mostram que não há mecanismos pré e pós zigóticos impedindo o cruzamento de *M. capixaba* e *M. scutellaris* em ambientes naturais.

A distribuição geográfica e a biodiversidade atual das espécies são fortemente relacionadas a fatores ecológicos e geográficos históricos. O Quaternário foi um período marcado por profundas modificações climáticas durante os últimos três milhões de anos, em todas as partes do planeta (Hewitt, 2000). Considera-se que os eventos de glaciação e interglaciação, que ocorreram neste período, são indicados como as principais causas das alterações na composição e distribuição das florestas atuais. Assim, “ilhas” vegetacionais eram mantidas sob condições ambientais que preservavam as espécies durante estes eventos. Esta proposta é conhecida como a Teoria de Refúgios Florestais (Figura 7), a qual é amplamente discutida e defendida por alguns autores (Haffer, 1969; Ab’Sáber, 1992; Vialatte *et al.*, 2008; Carnaval *et al.*, 2008). Além disso, segundo esta teoria, regiões inseridas dentro da atual distribuição das Florestas Tropicais e Subtropicais conservam alta biodiversidade porque se mantiveram ecologicamente estáveis durante os períodos de alterações climáticas do Quaternário (Pedro *et al.*, 2008; Carnaval *et al.*, 2009).

O alto grau de endemismo também é apontado como uma das atuais consequências da existência dos refúgios florestais. Atualmente a Floresta Atlântica é considerada um *hotspot* devido ao alto grau de endemismo; infelizmente associado à elevada ameaça de extinção deste ecossistema (Myers *et al.*, 2000). Provavelmente a separação geográfica de *M. capixaba* e *M. scutellaris* é uma consequência da formação de tais refúgios. Populações das duas espécies foram provavelmente isoladas dentro de diferentes fragmentos florestais formados durante as épocas do Quaternário. O total isolamento entre

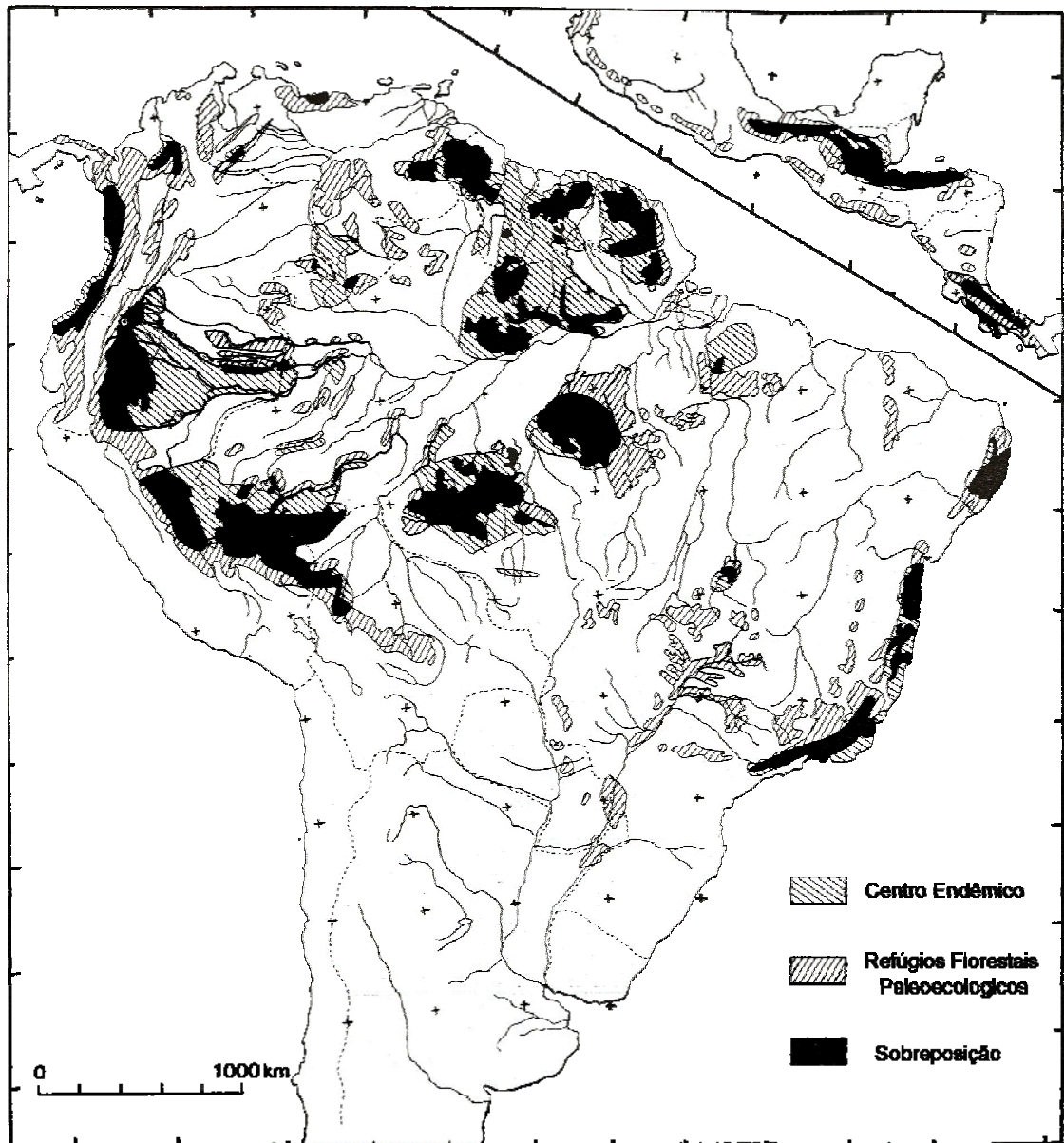


Figura 7 – Mapa de domínios naturais Pleistocênicos obtidos por sobreposição de modelos de refúgios paleoclimáticos, topográficos e geomorfológicos. Dados sobre solo e estruturas vegetacionais e de centros endêmicos de plantas, pássaros e borboletas (Imagem compilada de Whitmore & Prance, 1987).

as populações levou à especiação alopátrica. Deste modo, mutações e adaptações a diferentes condições ecológicas dentro dos fragmentos devem ter ocorrido com o passar do tempo. Eventos de vicariância foram reportados por Batalha-Filho (2008) para a espécie *M. quadrifasciata*. Este autor mostrou que as subespécies *M. q. quadrifasciata* e *M. q. anthidioides* estão separadas em dois clados, um no Sul e outro no Norte do Brasil, decorrentes possivelmente da formação de isolamento e barreiras geográficas no período Quaternário. Além disso, outros estudos têm demonstrado que os eventos paleoclimáticos e paleoecológicos, deste período foram as principais forças na estruturação e distribuição de espécies de diferentes taxa (Grazziotin *et al.*, 2006; Pedro *et al.*, 2008; Carnaval *et al.*, 2009).

De modo particular, o corredor central da mata atlântica, que compreende os estados do Espírito Santo e Bahia, tem sido apontado como um centro de endemismo. Isto porque, provavelmente persistiu durante o Último Máximo Glacial como um grande refúgio de alta estabilidade (Carnaval *et al.*, 2008; Carnaval *et al.* 2009). Apoiados em dados moleculares de espécies de anfíbios, registros palinológicos e inferências sobre modelos paleoclimáticos, esses autores atribuem à este refúgio a responsabilidade pela manutenção da biodiversidade e centro de dispersão para áreas não estáveis durante as oscilações no Plio-Pleistoceno (épocas do Quaternário). Outros dois refúgios de considerável tamanho e importância foram também indicados, um no sudeste (São Paulo) e outro no nordeste (região do estado do Pernambuco).

Os dados obtidos com os testes de neutralidade, discutidos anteriormente, sugerem que a espécie *M. capixaba* passou por eventos de expansão populacional. Provavelmente a espécie se manteve em refúgios florestais históricos nos períodos onde as florestas reduziram seu tamanho, e posteriormente com a expansão dos refúgios, os animais que permaneciam dentro deles, expandiam também. Assim, foi estimada uma datação para uma possível expansão populacional de *M. capixaba*. O tempo encontrado, considerando a taxa de mutação para o gene COI de 1,5 e 1,2%, foi de 264.000 e 330.000 anos A.P., respectivamente. Como esperado, a data de expansão estimada está situada dentro do Quaternário, mais precisamente no Pleistoceno, entre 1.600.000 a 10.000 anos A.P. Durante período de aridez, as espécies foram forçadas a reduzir suas populações e se mantiveram dentro de refúgios e durante os períodos de umidade, a fusão das machas e aumento

das áreas levava a expansão das espécies, o que também pode ter acontecido com *M. capixaba*.

O resultado do teste de Mantel mostra que a variação genética encontrada não é devido ao isolamento geográfico. Desta forma, mesmo sendo significativa a correlação, a magnitude da mesma foi baixa, e a distancia não seria, portanto, o principal fator determinante na variação genética encontrada em *M. capixaba*.

De modo similar, a rede de haplótipos e a árvore filogenética obtida pela inferência bayesiana mostraram que a estruturação de *M. capixaba* não está totalmente de acordo com a distribuição geográfica dos indivíduos. Os grupos formados na rede de haplótipos são muito parecidos com os apresentados na árvore filogenética e, do mesmo modo, as duas hipóteses discutidas anteriormente para a estruturação apresentada na rede de haplótipos é aplicável à topologia da árvore filogenética obtida para o gene COI de *M. capixaba*.

5.2. Importância da genética na conservação de *M. capixaba*

Uma grande parte da biodiversidade do planeta está sendo dizimada pela ação humana. Assim, o conhecimento sobre a genética e ecologia das espécies, por exemplo, são de fundamental importância para melhor preservá-las do risco de extinção.

O conhecimento genético é muito importante por que se uma espécie encontra-se ameaçada e as análises genéticas mostrarem que existe uma estruturação populacional, mesmo que esta estrutura não siga um padrão geográfico, a estratégia para tentar preservar esta espécie seria a de preservar todas as populações existentes. Caso contrário, se a população está homogênea ao longo de toda a sua área de ocorrência, a estratégia de conservação pode ser a de preservar apenas parte da população (Sole-Cava, 2004). Para o presente estudo, foi possível verificar que a espécie *M. capixaba* possui um padrão de estruturação genética, que não é totalmente coincidente com a distribuição geográfica das colônias amostradas. Assim, a prioridade na conservação deste meliponino é manter o maior número possível de colônias existentes, pois já podem existir adaptações regionais importantes para a espécie.

A distribuição de *M. capixaba*, atualmente, está restrita a uma pequena área de altitude no estado do Espírito Santo. Além disso, o número de colônias de *M. capixaba* é pequeno. Segundo Shaffer (1981) dados genéticos, juntamente com o tamanho populacional, são considerados fatores importantes para a sobrevivência de determinada espécie. Caso haja mudanças ambientais, a população deve estar preparada para esta nova condição.

Provavelmente a mais importante atividade das abelhas é o seu papel de agente polinizador das espécies vegetais (Michener, 2000). A extinção de *M. capixaba* causaria uma série de consequências ecológicas, uma vez que as abelhas nativas são responsáveis pela maior parte da polinização da flora existente na Floresta Atlântica (Kerr *et al.*, 1996). Poucas informações existem sobre sua ação como agente polinizador da flora no estado do Espírito Santo. Resende *et al.* (2008) verificou a presença de algumas operárias de *M. capixaba* carregando polínias de orquídeas da tribo *Maxillaria*. Estes autores sugerem que *M. capixaba* é um polinizador efetivo de orquídeas em sua área de ocorrência. Este fato só aumenta a importância da preservação deste meliponíneo.

Os resultados deste estudo reforçam a grande relação histórica e genética entre *M. capixaba* e *M. scutellaris*. Entretanto, uma estratégia importante para a conservação de *M. capixaba* na sua restrita área de ocorrência, seria o desestímulo, ou total proibição da criação de *M. scutellaris* na região, e até mesmo no estado do Espírito Santo (Silveira *et al.*, 2008). A introdução de *M. scutellaris* na região de ocorrência de *M. capixaba* poderia acarretar a extinção de *M. capixaba*, já extremamente ameaçada. Segundo Haig (1998), a hibridação introgressiva entre táxons proximamente relacionados pode levar a sérias implicações de conservação. Muitos exemplos podem ser encontrados na literatura sobre espécies naturais hibridando com espécies introduzidas pelo homem. *Canis simensis* é uma espécie de lobo restritamente encontrada em área de altitudes na Etiópia. A população destes lobos convive simpatricamente com cães domésticos (*C. familiaris*), os quais competem por comida e “compartilham” doenças. Gottelli *et al.* (1994), comprovaram por análise de loci microssatélites e do mtDNA a hibridação entre fêmeas de *C. simensis* com machos de *C. familiaris*. Estes autores recomendaram a imediata reprodução em cativeiro desta espécie de lobo

ameaçadíssima, no intuito de preservar a pouca variabilidade genética que ainda restava na pequena população (<500 indivíduos).

Uma estratégia para aumentar a população de *M. capixaba* na região seria realizar cursos para os criadores desta abelha, com a finalidade de ensinar as técnicas de divisão e transferência das colônias para caixas racionais. Tentativas de instruir as pessoas que criam esta abelha para as práticas de manejo apícola já foram realizadas no passado, porém, sem sucesso. A espécie *M. capixaba* depende destes criadores, uma vez que grande parte da população é encontrada em meliponários. Por outro lado, não faz nenhum sentido salvar qualquer espécie ameaçada de extinção se o seu habitat continuar destruído e, por isso, é de fundamental importância a preservação dos fragmentos florestais destas regiões. Além disso, ao se preservar os fragmentos florestais de um habitat que conhecidamente possui alto nível de endemismo, a preservação deste habitat não estará apenas beneficiando uma espécie em particular, mas todos os organismos que nele existem. Embora fragmentado ou alterado, estes habitats florestais são ambientes diferentes para diferentes formas de vida. Assim, centros de endemismos deverão ainda hoje manter elevados níveis de diversidade inter e intra-específica, sendo considerados prioridades em ações de conservação (Pedro *et al.*, 2008).

6. Conclusões

1. Apesar de sua restrita distribuição geográfica *M. capixaba* apresenta ainda alguma variabilidade genética na sua população.
2. Não há evidências de que a espécie esteja estruturada geograficamente. É mostrado na rede de haplótipos que *M. capixaba* possui haplótipos de várias regiões em uma mesma área.
3. Processos demográficos históricos provavelmente influenciaram o padrão de distribuição geográfico de *M. capixaba*. Possivelmente a espécie passou por eventos de gargalos populacionais e expansões.
4. A árvore estimada por inferência bayesina mostra que *M. capixaba* e *M. scutellaris* são muito próximas filogeneticamente. No entanto, é necessário aumentar o número amostral de sequências de *M. scutellaris* analisadas para averiguar se está proximidade filogenética se confirma.
5. É necessário aumentar esforços para localização de *M. capixaba* em locais ainda não visitados e que possuem as mesmas características de ocorrência desta abelha.

7. Perspectivas

1. Visando a conservação de *M. capixaba*, os resultados deste estudo apontam para a necessidade de implementação de ações rápidas e efetivas de manejo para aumentar o número de colônias, bem como ampliar a área de abrangência da espécie por reintrodução da mesma em áreas reconhecidas como área onde esta abelha foi extinta.
2. Recomenda-se a não criação de *M. scutellaris* na área de ocorrência de *M. capixaba* devido à estreita relação filogenética entre elas.
3. Estudos visando verificar a dispersão dos machos por meio de marcadores moleculares codominantes, como por microssatélites ou sequenciamento de genes nucleares são necessários para ampliar os conhecimentos a cerca da estrutura populacional de *M. capixaba*.

8. Referências Bibliográficas

1. Ab'Sáber, AN (1992). **A teoria dos refúgios: Origem e significado.** Anais do 2º Congresso Nacional sobre Essências Nativas, edição especial, Instituto Florestal. 4, 29-34.
2. Aidar, DS & Campos, LAO (1998). **A influência de fatores climáticos na atividade externa de *Tetragonisca angustula* (Apidae, Meliponinae).** Anais da Sociedade de Entomologia do Brasil. 27 (1): 157-159.
3. Altschul, SF; Gish, W; Miller, W; Myers, EW & Lipman, DJ (1990). **Basic local alignment search tool.** Journal Molecular Biology. 215, 403-410.
4. Arias, MC; Brito, RM; Francisco, FO; Moretto, G; Oliveira, FF; Silvestre, D & Sheppard, WS (2006). **Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees.** Apidologie. 37, 259–274.
5. Avise, JC; Arnold, J; Ball, RM; Bermingham, E; Lamb, T; Neigel, JE; Reeb, CA & Saunders, NC (1987). **Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics.** Annual Review of Ecology and Systematics. 18, 489-522.
6. Avise, JC (2000) **Phylogeography: the history and formation of species.** Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press, 447p.
7. Bandelt, HJ; Forster, P & Röhl, A (1999). **Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies.** Molecular Biology and Evolution. 16, 37-48.

8. Batalha-Filho, H (2008). **Distribuição geográfica, filogeografia e história evolutiva da abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae)**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 56p.
9. Brasil, Ministério do Meio Ambiente – MMA & Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (2003). **Lista das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção**. Instrução Normativa n° 3, 27 de maio de 2003.
10. Brasil, Ministério do Meio Ambiente - MMA (2005). **Plano de ação federal da zona costeira do Brasil**. p23.
11. Caccone, A & Sbordoni, V (2001). **Molecular biogeography, evolutionary rates, and morphological adaptations to cave life: a case study using Bathysciine beetles and sequence data from the mitochondria CO1 gene**. *Evolution*. 55, 122-130.
12. Carnaval, AC & Moritz, C (2008). **Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest**. *Journal of Biogeography*. 35, 1187-1201.
13. Carnaval, AC; Hickerson, MJ; Haddad, CFB; Rodrigues, MT & Moritz C (2009). **Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot**. *Science*. 323 (6): 785-789.
14. Cho, ES; Jung, CG; Sohn, SG; Kim, CW & Han, SJ (2007). **Population Genetic Structure of the Ark Shell *Scapharca broughtonii* Schrenck from Korea, China, and Russia Based on COI Gene Sequences**. *Marine Biotechnology*. 9, 203–216.
15. Crozier, RH & Crozier, YC (1993). **The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: Complete sequence and the genome organization**. *Genetics*. 133, 97-117.

16. Dick, CW; Roubik, DW; Gruber, KF & Bermingham, E (2004). **Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography.** *Molecular Ecology*. 13, 3775-3785.
17. Ewing, B & Green, P (1998). **Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities.** *Genome Research*. 8, 186-194.
18. Ewing, B; Hillier, L; Wendl, MC & Green, P (1998). **Base-calling of automated sequencer tracer using phred. I. Accuracy assessment.** *Genome Research*. 8, 175-185.
19. Excoffier, L; Laval, G & Schneider, S (2005) **Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis.** *Evolutionary Bioinformatics Online*. 1, 47-50.
20. Farrel, BD (2001). **Evolutionary assembly of the wilkweed fauna: cytochrome oxidase 1 and the age of *Tetraopes* beetles.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 18, 469-478.
21. Fernandes-Salomão, TM; Muro-Abad, JI; Campos, LAO & Araújo, EF (2002). **Mitochondrial and nuclear DNA characterization in the *Melipona* species (Hymenoptera, Meliponini) by RFLP analysis.** *Hereditas*. 137, 229-233.
22. Fernandes-Salomão, TM; Rocha, RB; Campos, LAO & Araújo, EE (2005). **The first internal transcribed spacer (ITS-1) from *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae, Meliponini): characterization and phylogenetic analysis.** *Insectes Sociaux*. 52, 11-18.
23. Fu, YX (1997). **Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection.** *Genetics*. 147, 915-925.

24. Gillott, C (2005). **Entomology**. 3ª edição. Springer. Netherlands. 831p.
25. Gordon, D; Abajian, C & Green, P (1998). **Consed: a graphical tool for sequence finishing**. Genome Research. 8, 195-202.
26. Gotelli, D; Sillero-Zubiri, C; Applebaum, GD; Roy, MS; Girman, DJ; Garcia-Moreno, J; Ostrander, EA & Wayne, RK (1994) **Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf (*Canis simensis*)**. Molecular Ecology. 3, 301–312.
27. Grant, WS & Bowen, BW (1998). **Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation**. The Journal of Heredity. 89, 415-426.
28. Graziotin FG, Monzel M, Echeverrigara S & Bonatto SL (2006). **Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest**. Molecular Ecology. 15, 3969-3982.
29. Haffer J (1969). **Speciation in Amazonian forest birds**. Science. 165, 131–137.
30. Haig, SM (1998). **Molecular contributions to conservation**. Ecology. 79 (2): 413–425.
31. Harrison, RG (1989). **Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology**. Trends Ecology and Evolution. 4, 6-11.
32. Heard, TA (1999). **The role of stingless bees in crop pollination**. Annual Review Entomology. 44, 183–206.

33. Hewitt, G (2000). **The genetic legacy of the Quaternary ice ages.** Nature. 22, 907-913.
34. Higgins, D; Thompson, J; Gibson, T; Thompson, JD; Higgins, DG & Gibson, TJ (1994). **CUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** Nucleic Acids Research. 22, 4673-4680.
35. Huelsenbecr, JP & Ronquist, F (2001). **MrBayes: Bayesian inference of phylogenetics tree.** Bioinformatics. 17, 754-755.
36. Imperatriz-Fonseca, VL & Zucchi, R (1995). **Virgin queens in stingless bee colonies: a review.** Apidologie. 26, 231-244.
37. Inoue, H; Nojima, J & Okayama, H (1990). **High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids.** Gene. 96, 23-28.
38. Kerr, WE; Carvalho, GA & Nascimento VA (1996). **Abelha urucu – biologia, manejo e conservação.** Belo Horizonte, Acangaú, 143p.
39. Lewinsohn TM; Freitas AVL & Prado PI (2005). **Conservação de invertebrados terrestres e seus habitats no Brasil.** Megadiversidade. 1, 62-69.
40. Lohman, DJ; Peggie, D; Pierce, NE & Meie, R (2008). **Phylogeography and genetic diversity of a widespread Old World butterfly, *Lampides boeticus* (Lepidoptera: Lycaenidae).** BMC Evolutionary Biology. 8, 301-315.
41. Lopes, DM (2008). **Análises moleculares em *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae).** Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 85p.

42. Machado, CA; Jousselin, E; Kjellberg, F; Compton, SG & Herre, EA (2001). **Phylogenetic relationships, historical biogeography and character evolution of pollinating wasps**. Proceedings of the National Academy of Sciences. 268, 685-694.
43. Melo, GAR (1996). **Notes on the nesting biology of *Melipona capixaba* (Hymenoptera, Apidae)**. Journal of Kansas Entomology Society. 69 (2): 207-210.
44. Michener, CD (2000). **The bees of the world**. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, 913p.
45. Miller, MP (2005). **Alleles in space (AIS): computer software for the joint analyses of interindividual spatial and genetic information**. Journal of Heredity. 96, 722-724.
46. Morellato, LPC & Haddad, CFB (2000). **Introduction: the Brazilian Atlantic forest**. Biotropica. 32 (4b): 786-792, 2000.
47. Moure, JS & Camargo, JMF (1994). ***Melipona (Michmelia) capixaba*, uma nova espécie de meliponinae (Hymenoptera, Apidae) do sudeste do Brasil**. Revista Brasileira de Zoologia. 11, 289-296.
48. Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version**. Disponível em <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acessado em 10/11/2009.
49. Muraji, M; Kawasaki, K & Shimizu, T (2000). **Nucleotide sequence variation and phylogenetic utility of the mitochondrial COI fragmente in anthocorid bugs**. Applied Entomology and Zoology. 35 (3): 301-307.

50. Myers, N; Mittermeier, RA; Mittermeier, CG; Fonseca, GAB & Kent, J (2000). **Biodiversity hotspots for conservation priorities**. Nature. 403, 853-858.
51. Nakamine, H & Takeda, M (2008). **Molecular phylogenetic relationships of flightless beetle sbelonging to the genus *Mesechthistatus* Breuning, (Coleoptera: Cerambycidae) inferred from mitochondrial COI gene sequences**. Journal of Insect Science. 8, 1-11.
52. Nascimento VA; Matusita, SH & Kerr, WE (2000). **Evidence of hybridization between two species of *Melipona* bees**. Genetics and Molecular Biology. 23 (1): 79-81.
53. Nascimento, VA (1996). **Aspectos biológicos, ecológicos e genéticos da *Melipona (Michmelia) capixaba* – Moure e Camargo, 1994 (Hymenoptera, Apidae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 80p.
54. Nascimento, VA (2001). **Estudo da variação genética mitocondrial e nuclear em populações de *Melipona capixaba* e *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponinae)**. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 75p.
55. Nei, M (1987). **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press, New York, USA.
56. Nylander, JAA; Ronquist, F; Huelsenbeck, JP & Nieves-Aldrey, JL (2004). **Bayesian phylogenetic analysis of combined data**. Systematic Biology. 53, 47-67.
57. Oshaghi, MA; Yaaghoobi, F & Abaie, MR (2006). **Pattern of mitochondrial DNA variation between and within *Anopheles***

- stephensi* (Diptera: Culicidae) biological forms suggests extensive gene flow.** Acta Tropica. 99 (2-3): 226-233.
58. Page, RDM (2001). **TreeView (Win32) 1.6.6.** Acessado em: <<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod.html>>.
59. Pedro, PM; Sallum, MA & Butlin, RK (2008). **Forest-obligate *Sabethes* mosquitoes suggest palaeoecological perturbations.** Heredity. 101, 186–195.
60. Ramos-Onsins, SE & Rozas, J (2002). **Statistical properties of new neutrality tests against population growth.** Molecular Biology Evolution. 19 (12):2092-2100.
61. Resende, HC; Barros, F; Campos, LAO & Fernandes-Salomão, TM (2008). **Visitação de orquídea por *Melipona capixaba* Moure & Camargo (Hymenoptera: Apidae), abelha ameaçada de extinção.** Neotropical Entomology. 37 (5): 609-611.
62. Rocha, MP & Pompolo, SG (1998). **Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)** Genetic and Molecular Biology. 21 (1): 41-45.
63. Rolstad, J (1991). **Consequences of forest fragmentation for the dynamics of bird populations: conceptual issues and the evidence.** In Gilpin, ME & Hanski, I. **Metapopulation dynamics: empirical and theoretical investigations.** Academic Press, London. 149-163p
64. Roubik, DW (2006). **Stingless bee nesting biology.** Apidologie. 37, 124–143.

65. Rozas, J; Sánchez-DelBarrio, JC; Messeguer, X & Rozas, R (2003). **DNASP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods.** *Bioinformatics*. 19, 2496-2497.
66. Sarto, MCL ; Peruquetti, RC & Campos, LAO (2005). **Evaluation of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) as pollinator of greenhouse tomatoes.** *Journal Economical Entomology*. 98 (2): 260-266.
67. Shaffer ML (1981). **Minimum population sizes for species conservation.** *Bioscience*. 31, 131–134.
68. Shih, HT; Hung, HC; Schubart, CD; Chen, CA & Chang, HW (2006). **Intraspecific genetic diversity of the endemic freshwater crab *Candidiopotamon rathbunae* (Decapoda, Brachyura, Potamidae) reflects five million years of the geological history of Taiwan.** *Journal of Biogeography*. 33, 980-989.
69. Silveira, FA; Melo, GAR & Campos, LAO (2008). ***Melipona capixaba* Moure & Camargo, 1995.** In: Machado, ABM; Drummond, GM; Paglia, AP. (Org.). **Livro Vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção.** Brasília, Ministério do Meio Ambiente/Biodiversitas. 1, 381-385p.
70. Silveira, FA; Melo, GAR & Almeida, EAB (2002). **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação.** Belo Horizonte, IDMAR, 253p.
71. Silvestre, D; Downton, M & Arias, MC (2008). **The mitochondrial genome of the stingless bee *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Sequence, gene organization and a unique tRNA translocation event conserved across the tribe Meliponini.** *Genetics and Molecular Biology*. 31 (2): 451-460.
72. Simon, C; Frati, F; Beckenbach, A; Crespi, B; Liu, H & Flook, P (1994). **Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene**

- sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers.** Annals of the Entomology Society of America. 87, 651–701.
73. Sole-Cava, AM (2004). **Biodiversidade molecular e genética da conservação.** In: Matioli, SR. **Biologia molecular e evolução.** Holos editora. Ribeirão Preto (SP), 202p.
74. Soucy, SL; & Danforth, BN (2002). **Phylogeography of the socially polymorphic sweat bee *Halictus rubicundus* (Hymenoptera: Halictidae).** Evolution. 56, 330-341.
75. Swofford DL (1998). **PAUP* - A computer program for phylogenetic inference using maximum parsimony and other methods.** Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
76. Tajima, F (1983). **Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations.** Genetics. 105, 437-460.
77. Tamura, K; Dudley, J, Nei, M & Kumar, S (2007). **MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0.** Molecular Biology and Evolution. 24, 1596-1599.
78. Tanaka, H; Roubik, DW; Kato, M & Gunsalam, G (2001). **Phylogenetic position of *Apis nuluensis* of northern Borneo and phylogeography of *A. cerana* as inferred from mitochondrial DNA sequences.** Insectes Souciaux. 48, 44-51.
79. Thompson, JD; Gibson, TJ; Plewniak, F; Jeanmougin, F & Higgins, DG (1997). **The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.** Nucleic Acids Research. 24, 4876-4882.

80. Usener, JI & Cognato, AI (2005). **Patterns of mitochondrial diversity among desert firefly populations (Lampyridae: *Microphotus octarthrus* fall)**. The Coleopterists Bulletin. 59 (3): 361–367.
81. Velthuis, HW (1997). **Biologia das abelhas sem ferrão**. Editora USP e Universiteit Utrecht. 33p.
82. Vialatte, A; Guiller, A; Bellido, A & Madec, L (2008). **Phylogeography and historical demography of the Lusitanian snail *Elona quimperiana* reveal survival in unexpected separate glacial refugia**. BMC Evolutionary Biology. 8, 339-352.
83. Vieira, L; Louzada, JNC & Spector, S (2008). **Effects of degradation and replacement of southern brazilian coastal sandy vegetation on dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae)**. Biotropica. 40 (6): 719-727.
84. Wenseleers, T; Hart, AG; Ratnieks, FLW & Quezada-Euan, JJG (2004). **Queen execution and caste conflict in the stingless bee *Melipona beecheii***. Ethology. 110 (9): 725-736.
85. Whitmore, T.C. & Prance, G.T. (1987). **Biogeography and Quaternary History in Tropical America**. Clarendon Press, Oxford, 217p.