

FÁBIA GUIMARÃES DIAS

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 - Brasil
2008

FÁBIA GUIMARÃES DIAS

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*.

APROVADA: 28 de Julho de 2008

Prof^ª. Dr^ª Ana Maria Waldschmidt
(co-orientadora)

Prof^ª. Dr^ª Mara Garcia Tavares
(co-orientadora)

Prof^º. Dr. Jorge A. Dergam dos Santos

Prof^ª. Dr^ª Tânia Maria Fernandes Salomão

Prof^º. Dr. Lucio Antonio de Oliveira Campos
(Orientador)

Aos meus amados pais Rodrigo Dias e Elpídia Guimarães Dias.

Aos meus queridos irmãos João Dias e Izabela Dias.

Ao meu companheiro de todas as horas, Cássio Freire.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

Ao Professor Lucio Antonio de Oliveira Campos, pela orientação, amizade, apoio e confiança, permitindo-me a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Gabriel Augusto Rodrigues de Melo da Universidade Federal do Paraná pela confirmação taxonômica dos espécimes.

À Professora Ana Maria Waldschmidt pelo incentivo e amizade.

À Professora Mara Tavares pelas boas idéias no trabalho.

À professora Tânia M.F. Salomão, pela amizade.

Aos meus pais, que deram todo apoio e dedicação por mais esta conquista.

À Cássio, pela colaboração, pelas incansáveis e pacientes horas de incentivo, pelo estímulo e pelo carinho.

As amigas Luiza e Antonia pela amizade e bom convívio.

Aos colegas do laboratório de biologia de abelhas da Universidade Federal de Viçosa pela convivência.

Aos funcionários do laboratório pelo auxílio e pela disponibilidade.

Aos funcionários Íris e Cabrito, pela ajuda nas coletas de campo.

BIOGRAFIA

Fábia Guimarães Dias, filha de Rodrigo Teixeira Dias e Elpídia Guimarães Dias, nasceu em 04 de agosto de 1981, em Jequié, Bahia.

Em Setembro de 2005, licenciou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), em Vitória da Conquista, Bahia.

No período de Setembro de 2002 à Agosto de 2005, foi voluntária no projeto de iniciação científica da UESB, sob orientação da Prof^ª. Raquel Pérez-Maluf, trabalhando na área de diversidade de Abelhas e Vespas.

Em Outubro de 2006, iniciou no Curso de Mestrado em Entomologia da UFV, submetendo-se à defesa de tese em 28 de Julho 2008.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
2.1. Material genético	6
2.2. Extração e amplificação do DNA.....	7
2.3. Análise dos dados	8
3. RESULTADOS	10
4. DISCUSSÃO.....	16
5. CONCLUSÕES.....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferenças morfológicas entre as operarias de <i>M. mondury</i> e <i>M. rufiventris</i> 2	
Tabela 2. Espécie, localidade/código, número de colônias e biomas referentes às espécies amostradas no estado de Minas Gerais.	7
Tabela 3. Código e seqüências dos <i>primers</i> ISSR utilizados, temperatura de pareamento empregada e número de bandas observadas nas populações analisadas.	8
Tabela 4. Matriz de dissimilaridade genética entre as populações analisadas. Códigos das localidades são os mesmos da Tabela 2.	11
Tabela 5. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para diferentes níveis hierárquicos e valores de estruturação genética (ϕ_{st}) estimados para as populações de uruçú amarela analisadas.	15

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Locais de coleta de <i>M. mondury</i> , <i>M. rufiventris</i> e <i>Melipona</i> sp.	6
Figura 2. Padrão de amplificação do DNA de <i>M. mondury</i> , <i>M. rufiventris</i> e <i>Melipona</i> sp. utilizando-se o <i>primer</i> 811.....	10
Figura 3. Dendrograma evidenciando a estruturação genética entre <i>M. mondury</i> ; <i>M. rufiventris</i> e <i>Melipona</i> sp.....	11
Figura 4. Dendrograma de dissimilaridade genética entre as localidades de coleta.	13

RESUMO

Dias, Fábila Guimarães. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2008. **Diferenciação genética entre *Melipona mondury*, Smith 1863, *Melipona rufiventris*, Lepeletier, 1836 e *Melipona* sp. (Hymenoptera, Apidae) em Minas Gerais, Brasil, utilizando marcadores ISSR.** Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Co-orientadores: Ana Maria Waldschmidt e Mara Garcia Tavares.

Melipona rufiventris, Lepeletier, 1836 e *M. mondury*, Smith, 1863 (Hymenoptera, Apidae) são espécies geneticamente similares, popularmente conhecidas como uruçú amarela. Estudos recentes, utilizando marcadores moleculares mostraram que as populações de uruçú amarela em Minas Gerais formam grupos distintos, sendo *M. mondury* pertencente à região de Mata Atlântica, *M. rufiventris* e uma terceira espécie, ainda não identificada aqui denominada de *Melipona* sp., pertencentes à região do Cerrado. O objetivo deste trabalho foi estudar as relações genéticas entre as populações de uruçú amarela no Estado de Minas Gerais, utilizando-se marcadores moleculares ISSR. Foram utilizadas 79 colônias oriundas de 10 localidades diferentes. Para cada colônia, extraiu-se DNA de um indivíduo e utilizou-se nove *primers* ISSR na amplificação. Para a estimativa da diferenciação genética foram realizadas as seguintes análises: (i) Percentual de locos polimórficos (P) e a estimativa da diversidade genética (H_e); (ii) Dissimilaridade genética utilizando-se o índice de Dice e o método UPGMA; (iii) Análise de variância molecular e ϕ_{st} . Os resultados obtidos mostraram um elevado polimorfismo em nível molecular entre as colônias estudadas. A análise de agrupamento resultou na formação de três grupos distintos representados pelas populações de *M. mondury*, *M. rufiventris* e *Melipona* sp.. No grupo formado pelas populações de *Melipona* sp. destacam-se as colônias oriundas de Urucuaia - MG por apresentarem maior divergência genética em relação às demais localidades.

ABSTRACT

Dias, Fábila Guimarães. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, July de 2008. **Genetic differentiation among *Melipona mondury*, Smith 1863, *Melipona rufiventris*, Lepeletier, 1836 and *Melipona* sp. (Hymenoptera, Apidae) in Minas Gerais, Brazil, using markers ISSR.** Adviser: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Co-Adviser: Ana Maria Waldschmidt and Mara Garcia Tavares.

Melipona rufiventris, Lepeletier, 1836 and *M. mondury*, Smith, 1863 (Hymenoptera, Apidae) are species genetically close popularly known as "uruçu amarela". Recent studies, using molecular markers showed that the population of "uruçu amarela" in Minas Gerais form distinct groups. *M. mondury* comes from the Atlantic Forest region, whereas *M. rufiventris* and a third species, known as *Melipona* sp. but not yet identified comes from the biome "Cerrado". The goal of this work was to study the genetic relationships between the population of "uruçu amarela" in the State of Minas Gerais using the ISSR molecular markers. 79 colonies from 10 different locations were used. The extracted DNA was amplified using nine ISSR *primers* and for the analysis one individual per colony was used. For the estimation of genetic differentiation the following analysis were done: (i) Percentage of polymorphic loci (P) and genetic diversity (ii) Genetic dissimilarity using the index of Dice and the method UPGMA (iii) Analysis of molecular variance (AMOVA) and ϕ_{st} . The findings showed a high polymorphism in molecular level among the colonies studied. In the grouping analysis the formation of three distinct groups, composed by *M. mondury*, *M. rufiventris*, *Melipona* sp.. We observed *Melipona* sp. the population of Urucuia showed significant genetic divergence in relation to the other samples.

1. INTRODUÇÃO

As populações de *Melipona rufiventris* presentes no sudeste brasileiro eram consideradas uma única espécie (Schwarz, 1932; Moure e Kerr, 1950, Moure, 1975; Pedro e Camargo, 1999). Entretanto, Moure e Kerr (1950) e Moure (1975) observaram que os espécimes provenientes de São Paulo apresentavam coloração preta nos pêlos corbiculares marginais, enquanto que os espécimes oriundos do Rio de Janeiro apresentavam coloração pálida. Com base nas características morfológicas encontradas em diferentes populações do grupo *rufiventris*, Moure (1992) sugeriu que estas poderiam representar espécies diferentes. Vale salientar que o reconhecimento de espécie do grupo *rufiventris* através de características morfológicas é muito difícil.

Como as populações dessas abelhas no Estado de Minas Gerais foram consideradas ameaçadas de extinção (Campos, 1998), vários estudos utilizando marcadores moleculares foram realizados com o objetivo de analisar a variabilidade genética e avaliar o “status” taxonômico das mesmas (Busse et al., 2003; Lopes, 2004; Costa, 2005; Schetino, 2005; Tavares et al., 2007).

Em estudos realizados com isoenzimas em espécimes de *M. rufiventris* provenientes de vários municípios do estado de Minas Gerais, Costa (2003) observou que as colônias oriundas da região de Mata Atlântica apresentaram uma grande distância genética em relação às colônias oriundas do Cerrado, além de verificar um padrão enzimático diferente para a enzima *Est-4* nas colônias provenientes de Brasilândia de Minas (Cerrado).

Melo (2003), utilizando caracteres morfológicos, reconheceu as abelhas oriundas do bioma Mata Atlântica como *M. mondury*, Smith, 1863 e as abelhas oriundas do bioma Cerrado como *M. rufiventris*, Lepeletier, 1836. A espécie *M. mondury*, abrange

desde Santa Catarina até o estado da Bahia. *M. rufiventris*, por sua vez, se estende pelo Mato Grosso do Sul, noroeste de São Paulo, oeste de Minas Gerais e sul de Goiás. As principais diferenças morfológicas entre as operárias das duas espécies são mostradas na tabela 1.

Tabela 1. Diferenças morfológicas entre as operárias de *M. mondury* e *M. rufiventris*

<i>Melipona mondury</i>	<i>Melipona rufiventris</i>
Cerdas ao longo do bordo anterior e posterior da tíbia castanho-amareladas (um pouco avermelhada no bordo anterior).	Cerdas ao longo dos bordos anterior e posterior da tíbia castanho-escuro ou quase negras.
Cerdas nas laterais de T2 amarelas e longas (0,23-0,27 mm).	Cerdas nas laterais de T2 escuras e curtas (0,1-0,14 mm)
Cerdas eretas em T4-6 claramente mais longas (no disco de T5 com 0,5 mm e em T6 com 0,7-0,73 mm).	Cerdas eretas em T4-6 claramente mais curtas (no disco de T5 com 0,4 mm e em T6 com 0,6-0,65 mm)
Pilosidade escura decumbente nos tergos mais juntos (diferença mais notável no disco T4).	Pilosidade clara decumbente nos tergos mais espalhado
Tamanho corporal maior (largura da cabeça, 4,1 mm e largura máxima de T2, 4,2 mm).	Tamanho corporal menor (largura da cabeça, 3,8 mm, largura máxima de T2, 3,8 mm)

* Fonte: Melo, 2003. (mensurações foram feitas em um espécime de *M. rufiventris* proveniente de Araxá, Minas Gerais e um de *M. mondury* coletado em Santa Teresa, Espírito Santo).

Estudos moleculares utilizando marcadores PCR-RAPD (Busse et al., 2003; Tavares et al., 2007), microssátelite (Lopes, 2004; Tavares et al., 2007), PCR-RFLP (Schetino, 2005; Barni et al., 2007) e isoenzimas (Tavares et al., 2007) confirmaram os resultados reportados por Melo (2003).

Busse et al. (2003), Lopes (2004), Schetino (2005) e Tavares et al. (2007) observaram também que as colônias oriundas de Dom Bosco - MG e de Brasilândia de Minas - MG apresentaram características moleculares distintas das demais populações de *M. mondury* e *M. rufiventris*, podendo representar outra espécie de *Melipona*, aqui denominada de *Melipona* sp.

A região proveniente de Dom Bosco, Brasilândia, Urucuia e Januária pertencem uma área de transição entre o bioma Cerrado e Caatinga, apresentando

características climáticas e composição do solo diferente da região do triângulo mineiro, que apresenta apenas o bioma Cerrado. É possível que *Melipona* sp. e *M. rufiventris* vivem em alopatria nesses dois biomas (Jorge Dergam, Informação pessoal).

Outros estudos demonstraram que as abelhas do noroeste de Minas Gerais (Dom Bosco, Brasilândia e Uruçuia) e as abelhas oriundas dos Estados do Maranhão e do Ceará formaram um único grupo (Schetino, 2005; Silva, 2007; Pires, 2007), o que reforça a hipótese de que *Melipona* sp. possa habitar vários Estados.

Para um melhor entendimento da variabilidade genética é necessário conhecer a constituição genética da população em estudo. Para isso, várias técnicas moleculares têm sido empregadas para caracterização genética de material biológico.

A técnica de ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) foi desenvolvida por Gupta et al. (1994) em estudos com plantas cultivadas. Essa técnica é baseada no método PCR, cujos produtos da reação são seqüências de diferentes tamanhos localizadas entre duas regiões repetidas de microsatélite, idênticas e orientadas em direções opostas. A técnica ISSR utiliza um único *primer* longo, que possui de 16 a 25 pb de comprimento, não ancorado ou ancorado na extremidade 5' ou 3' por dois ou três nucleotídeos (Zietkiewicz et al., 1994; Wolfe et al., 1998). A ancoragem serve para fixar o pareamento do *primer* em uma única posição no sítio alvo, o que resulta em baixo nível de pareamento inespecífico.

A técnica de ISSR demanda pequena quantidade de DNA por reação, apresenta alto polimorfismo genético e a velocidade com que as informações genéticas relevantes podem ser produzidas torna esta análise atraente para estudos com populações raras ou ameaçadas (Gupta et al., 1994). Entretanto, a característica

dominante dos marcadores ISSR, não permite a diferenciação de indivíduos heterozigotos e conseqüentemente, a obtenção de outras informações importantes para estudos genéticos são comprometidos (Zietkiewicz et al., 1994, Gupta et al., 1994).

Mesmo apresentando limitações, esta técnica além de ser amplamente utilizada em estudos com plantas, tem sido empregada em estudos de insetos (Kumar et al., 2001; León e Jones, 2005; Paplauskiene et al., 2006), de vertebrados (Chatterjee e Mohandas, 2003; Wolfe, 2005) e de fungos (Kerrigan et al., 2003; Sawyer et al., 2003).

Em insetos, a técnica de ISSR tem sido utilizada em diversos estudos de variabilidade genética com base na detecção de polimorfismos genéticos intra e interespecíficos. Kumar et al. (2001) utilizaram polimorfismos ISSR para estimar a diversidade genética dentro e entre 28 populações de *Scirpophaga incertulas* (Lepidoptera). Os autores relatam que a técnica utilizada mostrou-se uma ferramenta útil, possibilitando a detecção de polimorfismos intra e interpopulacionais. Estes autores sugeriram que uma estratégia efetiva de manejo desta praga requer um entendimento das variações genéticas entre e dentro das populações, e de como estas variações estão distribuídas geograficamente.

León e Jones (2005) utilizaram a técnica ISSR para estimar a estrutura genética em seis populações de *Gonatocerus ashmead* (Mymaridae, Hymenoptera) em diferentes regiões dos Estados Unidos. Os resultados obtidos mostraram divergência genética e baixo fluxo gênico entre as populações analisadas.

Em abelhas, os estudos utilizando a técnica ISSR são raros. Berezovskaia et al. (2002) observaram variações dos padrões ISSR em cinco espécies de *Bombus* (*B. sylvarum*, *B. pascuorum*, *B. lapidarius*, *B. terrestris* e *B. hortum*) proveniente da

região da Ucrânia e da Rússia. Os dados demonstraram características específicas para estas espécies, utilizando os *primers* (GTG)7A e (AGC)6G, além de observarem que 73% das marcas foram invariáveis dentro de espécies. Tendo em vista a constância das variações intraespecíficas dos padrões ISSR e a suscetibilidade das diferenças individuais observadas em *Bombus*, estes autores sugeriram que estes marcadores poderiam ser utilizados para auxiliar na resolução de problemas relacionados à classificação taxonômica existentes neste gênero.

Paplauskienė et al. (2006) analisaram variações genéticas entre duas subespécies de *Apis mellifera* (*A. m. carnica* e *A. m. caucasica*), os dados mostraram que 66,7% dos fragmentos amplificados eram polimórficos. Adicionalmente, estes autores observaram bandas privativas a cada uma das subespécies, o que facilitou a diferenciação genética entre elas.

Nascimento (2008) estimou a variabilidade genética de *M. quadrifasciata anthidioides* e *M. quadrifasciata* de faixa contínua procedente de diversas localidades do Estado de Minas Gerais, utilizando a técnica ISSR. Os dados deste estudo permitiram observar polimorfismos genéticos que foram úteis para a obtenção de informações importantes sobre a diversidade e estruturação genética *M. quadrifasciata*, além de observarem que a maior parte da variabilidade genética desta espécie encontra-se dentro das localidades.

Este trabalho teve o objetivos de estudar as relações genéticas entre *Melipona mondury*, *Melipona rufiventris* e *Melipona* sp., no estado de Minas Gerais por meio de marcadores ISSR, destacando-se *Melipona* sp. por representar uma espécie ainda não identificada. Vale salientar que no presente estudo utilizou-se número de colônia superior e foram analisadas populações de localidades diferentes daquelas estudadas anteriormente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético

Foram analisadas 35 colônias de *M. mondury* (oriundas dos municípios de Poté, Rio Vermelho, Diogo de Vasconcelos e Resende Costa), 23 de *M. rufiventris* (provenientes dos municípios Araguari e Uberlândia) e 21 provenientes de Dom Bosco, Brasilândia de Minas, Januária e Urucuaia que serão tratadas aqui como *Melipona* sp. (Figura 1 e Tabela 1). *Melipona* sp., representa uma espécie do grupo *rufiventris* existente no noroeste de Minas Gerais ainda não identificada (Tavares et al., 2007). Os espécimes coletados foram identificados pelo professor Dr. Gabriel Augusto Rodrigues de Melo da Universidade Federal do Paraná.

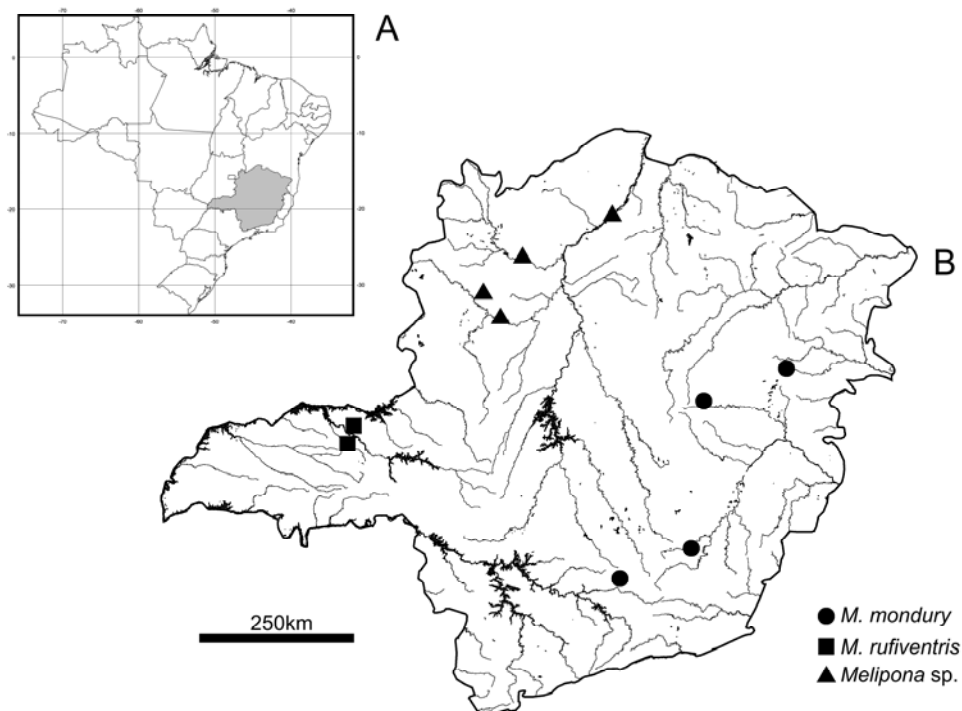


Figura 1. Locais de coleta de *M. mondury*, *M. rufiventris* e *Melipona* sp. Mapa do Brasil (A) e de Minas Gerais (B).

Tabela 2. Espécie, localidade/código, número de colônias e biomas referentes às espécies amostradas no estado de Minas Gerais.

Espécie	Localidade/ Código	Coordenadas S/W	Nº de colônias	Bioma
<i>M. mondury</i>	Rio Vermelho/ RV	-18,277/ -43,007	23	Mata Atlântica
	Resende Costa/RC	-20,922/ -44,244	7	Mata Atlântica
	Diogo de Vasconcelos/DV	-20,472/ -43,190	1	Mata Atlântica
	Poté/PO	-17,806/ -41,787	4	Mata Atlântica
<i>M. rufiventris</i>	Araguari/AR	-18,650/ -48,185	22	Cerrado
	Uberlândia/UB	-18,919/ -48,277	1	Cerrado
<i>Melipona</i> sp.	Uruçuaia/UR	-16,115/ -45,689	13	Cerrado
	Dom Bosco/DB	-16,616/ -41,916	2	Cerrado
	Brasilândia de Minas/BR	-17,019/ -46,015	2	Cerrado
	Januária/JA	-15,495/ -44,362	4	Cerrado
Total	10		79	

2.2. Extração e amplificação do DNA

A extração do DNA total das operárias foi realizada conforme o protocolo recomendado por Waldschmidt et al. (1997), modificando-se a primeira desproteinização. Assim, em vez de utilizar apenas clorofórmio, utilizou-se um volume de fenol-clorofórmio.

As condições de amplificações foram padronizadas previamente, a partir da metodologia usada por Eiadthong et al. (1999) e o DNA foi amplificado por PCR, utilizando-se diferentes *primers* ISSR (Wmed Representações LTDA).

Um total de 93 *primers* ISSR foi testado para as amplificações do DNA genômico. Com base no padrão de amplificação obtido, 20 *primers* foram pré-selecionados considerando-se o número e a resolução das bandas obtidas. Destes, nove foram utilizados para as análises (Tabela 2).

Cada reação constituiu de um volume total de 25 µL contendo: 2,5 µL de tampão 10X; 2,0 µL de dNTPs a 100 µM ; 1,0 µL de *primer* a 10 µM, 18,15 µL de água ultra pura; 1,0 µL de DNA (10 ng/µL); 0,5 U de *Taq* DNA polimerase Phoneutria

(Phoneutria Biotecnologia e Serviços LTDA) e 0,25 µL de formamida.

O programa de amplificação constituiu de uma desnaturação inicial de 3 minutos a 94 °C, seguida de 40 ciclos de 1 minuto a 92 °C, 2 minutos à temperatura de pareamento do *primer* (53 °C), 2 minutos a 72 °C, e um passo final de 7 minutos a 72 °C. As reações foram acompanhadas por controle negativo contendo todos os componentes, exceto o DNA genômico. Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), visualizados por coloração com brometo de etídio (0,2 µg/ml) e fotodocumentados utilizando o sistema AlphaDigiDoc® TM AD 1201.

Tabela 3. Código e seqüências dos *primers* ISSR utilizados, temperatura de pareamento empregada e número de bandas observadas nas populações analisadas.

Código	Seqüência (5' - 3')	Temperatura de pareamento (°C)	Nº. de bandas
UBC 807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	53 °C	16
UBC 815	CRCTCTCTTTCTCTCTC	53 °C	18
UBC 811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	53 °C	18
UBC 825b	ACACACACACACACACT	53 °C	14
TERRY	GTGGTGGTGGTGPC	53 °C	18
UBC 841	GACAGAGAGAGAGAGAYC	53 °C	14
UBC 848	CACACACACACACARG	53 °C	14
UBC 855	ACACACACACACACACYT	53 °C	17
UBC 857	ACACACACACACACACYG	53 °C	11
Total			140

Y = C ou T; R = A ou G; B = G, T ou C; D = G, A ou T

2.3. Análise dos dados

Os fragmentos ISSR foram codificados como caracteres binários: presença (1) ou ausência (0) de bandas. Na contagem foram consideradas apenas bandas inequívocas. Para aumentar a precisão na contagem das bandas foi utilizado o programa AlphaDigiDoc® TM AD 1201, a fim de comparar o tamanho dos fragmentos de DNA considerados. O tamanho dos fragmentos de DNA amplificados foi verificado por meio de padrão de peso molecular (1Kb DNA ladder). Nas análises foram considerados apenas os fragmentos de DNA de tamanhos entre 300 e 2000

pares de bases.

O programa TFGA versão 1.3 (Miller, 1997) foi utilizado para estimar o percentual de locos polimórficos (utilizando-se o critério de 99%) e a diversidade genética (H_e), assumindo-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações. Como ISSR é um marcador dominante, as estimativas das frequências alélicas foram realizadas segundo o método descrito por Lynch e Milligan (1994), baseado na expansão de Taylor.

As análises de agrupamento foram realizadas a partir de uma matriz de dissimilaridade genética, utilizando-se o índice de Dice ($D = 1 - S_D$) (Dice, 1945) e o método UPGMA. Foram construídos dois dendrogramas: o primeiro foi construído agrupando-se as colônias de cada uma das 10 localidades analisadas e o segundo considerando-se as 79 colônias analisadas separadamente. Os dendrogramas foram construídos através do software Genes versão 2007.00 (Cruz, 2006).

A diferenciação genética e a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das espécies foram estimadas através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992), utilizando-se o software ARLEQUIN versão 3.01 (Excoffier, 2006). Os componentes de variância utilizados foram o Φ_{ct} , Φ_{sc} e Φ_{st} . Onde o Φ_{ct} informa qual é a variabilidade genética que existe entre as espécies; Φ_{sc} é o componente que estima a variabilidade genética entre as localidades. A estimativa do Φ_{sc} não considera a variação entre espécies pelo fato da análise ser feita dentro de cada espécie separadamente. O parâmetro Φ_{st} estima a variabilidade genética que existe entre populações, considerando o conjunto como um todo.

3. RESULTADOS

As reações de PCR utilizada resultaram em um total de 140 bandas analisadas, sendo que 128 destas foram polimórficas (90,8%). A percentagem de locos polimórficos para *M. mondury*, *M. rufiventris* e *Melipona* sp. foi de 57,14%, 47,14% e 60%, respectivamente.

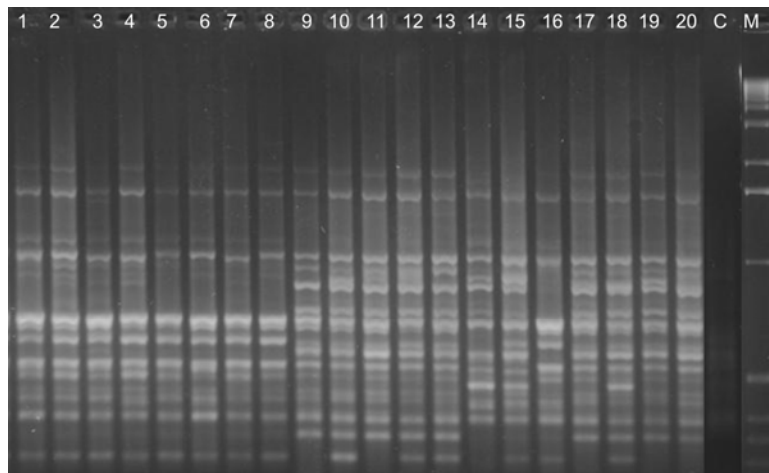


Figura 2. Padrão de amplificação do DNA de *M. mondury* (1 a 8), *M. rufiventris* (9 a 13 e 16 a 20) e *Melipona* sp. (14 e 15) utilizando-se o *primer* 811. C: controle negativo e M: marcador de peso molecular 1Kb ladder.

O número de bandas por *primer* variou de 11 a 18, com uma média de 14 bandas (Tabela 3). O maior número de bandas (18) foi observado quando utilizou-se os *primers* UBC-815, UBC-811 e TERRY (Figura 2). Todos os *primers* utilizados produziram fragmentos exclusivos (bandas privativas) para as diferentes espécies analisadas.

O valor de H_e (variabilidade genética) foi 0,18 para *M. mondury*, 0,16 para *M. rufiventris* e 0,20 para *Melipona* sp.

A matriz de dissimilaridade genética demonstrou que as populações de *M. mondury* (provenientes de Diogo de Vasconcelos e Poté) apresentaram a menor

divergência genética (0,121), enquanto que as populações de *Melipona* sp. (oriundas de Urucuia) apresentou maior variabilidade genética entre todas as localidades analisadas (Tabela 3).

Tabela 4. Matriz de dissimilaridade genética entre as populações analisadas. Códigos das localidades são os mesmos da Tabela 2.

	JA	DB	UR	RV	RC	DV	PO	BRA	AR	UB
JA	***									
DB	0.330	***								
UR	0.380	0.375	***							
RV	0.428	0.508	0.495	***						
RC	0.401	0.421	0.512	0.303	***					
DV	0.416	0.494	0.517	0.289	0.257	***				
PO	0.377	0.440	0.459	0.285	0.235	0.121	***			
BRA	0.282	0.123	0.402	0.455	0.376	0.483	0.423	***		
AR	0.346	0.476	0.525	0.461	0.462	0.436	0.400	0.449	***	
UB	0.350	0.483	0.532	0.468	0.449	0.457	0.411	0.459	0.151	***

A análise de agrupamento realizada considerando-se as colônias agrupadas por localidades resultou na formação de três grupos distintos, cada um deles, representado por uma das espécies analisadas (Figura 3). Observa-se nas Figuras 3 e 4 que o símbolo em forma de círculo representa a espécie *M. mondury*, o símbolo em forma de quadrado representa a espécie *M. rufiventris* e o símbolo em forma de triângulo representa a espécie *Melipona* sp.

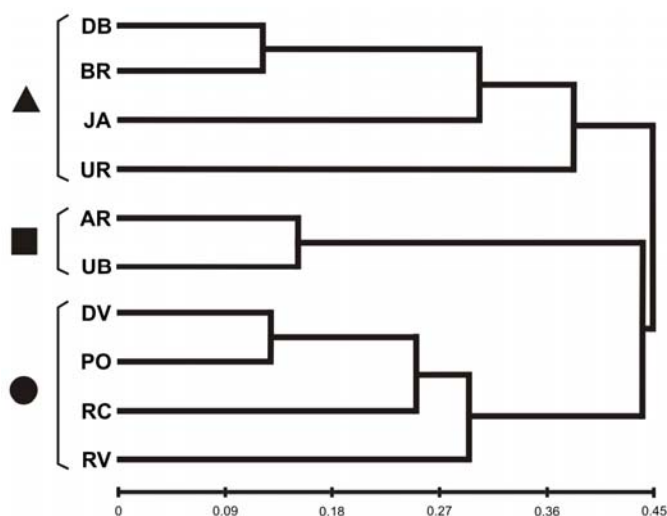


Figura 3. Dendrograma evidenciando a estruturação genética entre *M. mondury* (●); *M. rufiventris* (■) e *Melipona* sp. (▲) construído com base na matriz de dissimilaridade, obtido pelo método UPGMA.

Destaca-se ainda, o grupo formado pelas populações de *Melipona* sp. onde as colônias oriundas de Urucuia apresentaram uma maior divergência genética quando comparadas às demais localidades. Este fato ficou mais evidente quando se realizou a análise de agrupamento considerando-se todas as colônias provenientes de cada localidade em separado (Figura 4), onde é possível visualizar com melhor clareza a estruturação de Urucuia.

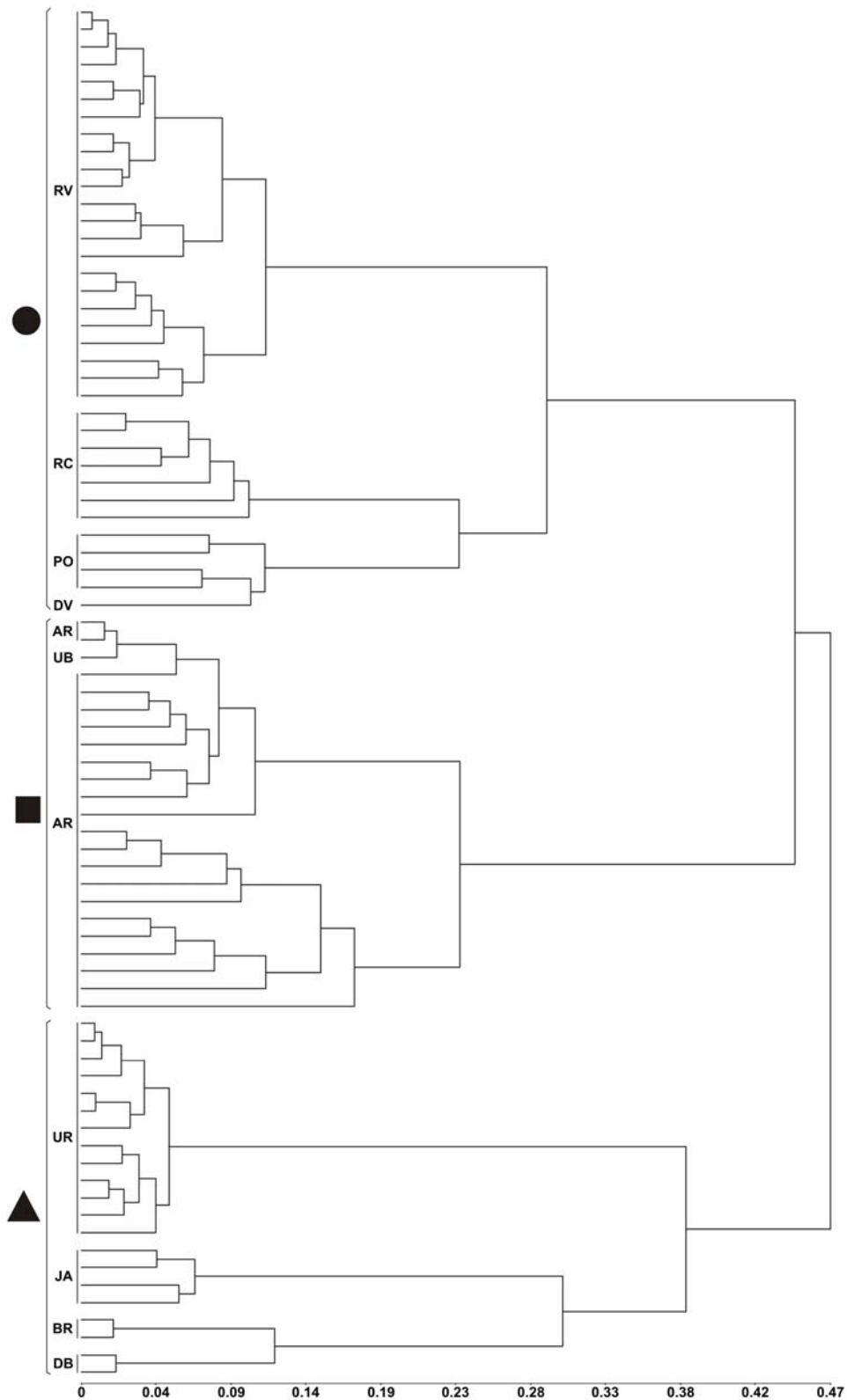


Figura 4. Dendrograma de dissimilaridade genética entre as localidades de coleta, evidenciando a estruturação genética entre *M. mondury* (●); *M. rufiventris* (■) e *Melipona* sp. (▲) obtido pelo método UPGMA.

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. (Tabela 4).

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* ($\Phi_{st} = 0,20$). Esta estruturação pode ser constatada nos grupos representados pelo dendrograma (Figura 4).

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 %) (Tabela 4). Esta estruturação genética pode ser confirmada pelo valor do Φ_{st} (0,77) entre os grupos formados.

Tabela 5. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para diferentes níveis hierárquicos e valores de estruturação genética (ϕ_{st}) estimados para as populações de uruçú amarela analisadas.

Fonte de variação	G.L	Soma dos quadrados	Varição (%)	Valor de P*
Dois níveis hierárquicos: <i>M. mondury</i>				
Entre localidades	3	263.474	72.67	<0,001
Dentro de localidades	31	160.554	27.33	<0,001
Total	34	424.029		
Índice de fixação	$\phi_{st} = 0.72$			
Dois níveis hierárquicos: <i>M. rufiventris</i>				
Entre localidades	1	8.281	19.24	<0,001
Dentro de localidades	21	251.245	80.76	<0,001
Total	22	259.826		
Índice de fixação	$\phi_{st} = 0.20$			
Dois níveis hierárquicos: <i>Melipona</i> sp.				
Entre localidades	3	254,947	87,95	<0,001
Dentro de localidades	17	48,577	12,05	<0,001
Total	20	303.524		
Índice de fixação	$\phi_{st} = 0.88$			
Três níveis hierárquicos: considerando três grupos				
Entre espécies	2	934,438	28,18	<0,001
Entre localidades	7	530.563	48.77	<0,001
Dentro de localidades	69	493.872	23.05	<0,001
Total	78	1958.873		
Índices de fixação	$\phi_{ct} = 0,28$	$\phi_{st} = 0.77$	$\phi_{sc} = 0,67$	

*Valores de P são as probabilidades de ter um componente da variância maior que os valores observados ao acaso. As probabilidades foram calculadas por 1023 permutações ao acaso. GL= grau de liberdade

4. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados mostraram um alto polimorfismo (acima de 50%, exceto em *M. rufiventris*), evidenciando que os marcadores ISSR foram eficientes na detecção da variabilidade genética presente nas populações analisadas. Este resultado também foi observado em Lepidoptera e Hymenoptera (Kumar et al., 2001; Berezovskaia et al., 2002; Leon e Jones, 2005; Paplauskiene et al., 2006; Nascimento, 2008).

Paplauskiene et al. (2006), por exemplo, verificaram que *Apis mellifera carnica* e *A. m. caucasica* apresentaram 66,7% dos fragmentos amplificados polimórficos. Nascimento (2008) observou que *M. quadrifasciata* apresentou 59,18% dos fragmentos polimórficos.

As principais diferenças morfológicas entre *M. mondury* e *M. rufiventris* podem ser visualizadas na Tabela 1. No presente estudo, observou-se presença de bandas privativas das diferentes espécies. A presença de bandas exclusivas também foi constatada por Paplauskiene et al. (2006) nas duas subespécies de *Apis mellifera*.

Os valores de diversidade genética em *M. mondury* (0,18) e *M. rufiventris* (0,16) verificados no presente trabalho, foram menores, porém próximos aos valores encontrados por Tavares et al. (2007), para estas mesmas espécies ($H_e = 0,21$ e $H_e = 0,23$ para *M. mondury* e *M. rufiventris* respectivamente), utilizando marcadores RAPD. Por outro lado, os espécimes de *Melipona* sp. analisados no presente estudo apresentaram maior diversidade genética ($H_e = 0,20$) do que os espécimes de *Melipona* sp. (oriundas de Dom Bosco e Brasilândia) analisadas por Tavares et al. (2007) ($H_e = 0,17$). No presente estudo utilizou-se maior número de colônia referente a *Melipona* sp. Nascimento (2008) em estudos sobre variabilidade genética de *M. quadrifasciata*, utilizando marcadores ISSR, encontrou nível de diversidade genética

($H_e = 0,20$) igual ao observado em *Melipona* sp.

Estudos apontam que as espécies pertencentes a ordem Hymenoptera apresentam menor diversidade genética ($H_e < 0,09$) quando comparados com outros ordens de insetos (Berkelhamer, 1983; Graur, 1985; Packer e Owen, 1992), devido ao sistema de haplodiploidia associada ao tamanho efetivo da população, pelo comportamento social e pela variação ambiental (Graur, 1985, Owen, 1985), entretanto, nos estudos supracitados foram utilizadas a técnica de isoenzimas, cuja taxa de polimorfismo é menor, o que reflete na baixa diversidade genética observados nos Hymenoptera analisados por estes autores.

Os dados apresentados no presente estudo utilizando a técnica ISSR demonstraram que as espécies de abelhas analisadas apresentaram níveis similares de diversidade genética quando comparados com outras espécies de insetos utilizado a técnica ISSR ou RAPD. Em *Scirpophaga incertulas* (Lepidoptera: Pyralidae) ($H_e = 0,17$) (Kumar et al., 2001) utilizando marcadores ISSR, em *Bombix mori* (Lepidoptera: Bombycidae) ($H_e = 0,21$) (Pradeep et al., 2005) utilizando marcadores ISSR e em *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) ($H_e = 0,26$) utilizando marcadores RAPD (Martins, 2008).

As análises de agrupamento realizadas demonstraram a formação de três grupos distintos que correspondem a *M. mondury*, *M. rufiventris* e *Melipona* sp.

No grupo formado por *Melipona* sp. evidenciou que as colônias provenientes de Urucuia apresentaram uma grande divergência genética em relação às colônias das demais localidades. As colônias de Urucuia formaram um grupo distinto daquelas formadas pelas colônias oriundas de Januária, Dom Bosco e Brasilândia de Minas. Entretanto, por causa do pequeno número de amostras provenientes dos municípios de Brasilândia de Minas, Dom Bosco e Januária, estudos adicionais são necessários

antes de conclusões definitivas sobre a estruturação observada em *Melipona* sp.

De acordo com estudos preliminares os espécimes oriundos Urucuia apresentaram características morfológicas um pouco diferentes de *M. mondury* e *M. rufiventris* (Gabriel Melo, informação pessoal). Entretanto, estudos moleculares utilizando amostragem maior e novas análises morfológicas, são fundamentais para melhor entender a taxonomia do grupo.

Estudos preliminares realizados com populações de abelhas do complexo *rufiventris* verificaram que as abelhas do noroeste de Minas Gerais (Dom Bosco, Brasilândia de Minas e Urucuia) e as abelhas oriundas dos Estados do Maranhão e do Ceará reuniram-se em um grupo (Schetino, 2005; Silva, 2007; Pires, 2007). Estudo recente, realizado por Lopes (2008) utilizando seqüências de mtDNA mostraram que abelhas do Maranhão, do Ceará, do Piauí e do Tocantins se agruparam com *Melipona* sp. do noroeste de Minas, mostrando ser possível que essas espécies também seja encontrada nesses estados.

O percentual de variação obtido pela AMOVA considerando dois níveis hierárquicos (entre localidade e dentro de localidades) mostrou um percentual de variação maior entre as localidades do que dentro de localidades para *M. mondury* e *Melipona* sp. Adicionalmente, a variabilidade genética dentro de *Melipona* sp. foi mais heterogênea do que dentro de *M. mondury* e *M. rufiventris*. A diferenciação genética entre as colônias analisadas pode ser explicada pelo baixo fluxo gênico e atuação de forças seletivas nessas populações em diferentes ambientes, já que cada espécie pertence a biomas distintos.

Melipona sp. vivem em áreas de transição entre o bioma cerrado e caatinga, apresentando características na vegetação, no solo, na água e no clima bastante diferente da região do triangulo mineiro (Araguari, Uberlândia) que pertencem ao

bioma cerrado. Possivelmente, essas duas espécies estejam em Alopatria (Informação pessoal, Jorge Dergam).

Por outro lado, *M. rufiventris* apresentou o menor percentual de variação que pode esta subestimada pelo pequeno número de colônias analisadas, refletindo também no valor do $\phi_{st} = 0,20$, que apesar de apresentar estruturação entre as localidades analisadas, este valor foi considerado baixo quando comparados com *M. mondury* (0,77) e *Melipona* sp. (0,88).

Em outras espécies de abelhas são comuns encontrar valores de ϕ_{st} em igual ou superior a 0,5, como pode ser confirmado no trabalho de Nascimento (2008) em estudo sobre variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata* cujo valor de ϕ_{st} foi igual a 0,54.

Para genética da conservação altos valores de ϕ_{st} , como apresentado por *M. mondury* e *Melipona* sp. significa que todas as populações necessitam ser conservadas e não apenas algumas delas, visto que elas encontram-se estruturadas, e assim tornam-se sensíveis a extinção local (Primack e Rodrigues, 2001). O percentual de variação obtido pela AMOVA considerando os 3 grupos (entre espécie, entre localidades e dentro de localidade), foi maior entre localidades.

5. CONCLUSÕES

O estudo realizado por meio de marcadores ISSR possibilitou chegar às seguintes conclusões:

- Alto polimorfismo molecular em *M. mondury* e *Melipona* sp.
- Há maior nível de variabilidade genética em *Melipona* sp. e uma alta estrutura genética entre *M. mondury* e *Melipona* sp.
- A maior parte da variabilidade genética estimada para as espécies analisadas é encontrada dentro das localidades.
- Maior divergência genética nas populações de Uruçuia em relação às demais populações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEREZOVSKAIA, A. P., MOROZ, O. I. U; SIDORENKO, A. P. Intra and Interspecies Differences in the ISSR-PCR Patterns of Bumble Bee (Hymenoptera : Bombinae). **TSitologija i genetika** 36: 28-35. 2002.

BUSSE, A.H.P., BORGES, A., TAVARES, M.G., CAMPOS, L.A. Variabilidade genética em populações de *Melipona rufiventris* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) no estado de Minas Gerais – Brasil. In: **Anais** do 49º congresso Nacional de Genética. CD Rom. 2003.

CAMPOS, L.A.O. *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836. In: Machado, A.B.M., Fonseca, G.A.B., Machado, R.B., Aguiar, L.M., Lins, L.V. **Livro Vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 608p. 1998.

CHATTERJEE S.N.; MOHANDAS T.P. Identification of ISSR markers associated with productivity traits in silkworm, *Bombyx mori* L. **Genome**.46: 438-447.2003.

COSTA, R.G. **Variabilidade genética em populações de *Melipona rufiventris* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) no estado de Minas Gerais – Brasil**. Dissertação de mestrado Universidade Federal de Viçosa, 57p. 2003.

COSTA, R.G. Isoenzyme variation in *Melipona rufiventris* (Hymenoptera: Apidae, *Meliponina*) in Minas Gerais State, Brazil. **Biochemical Genetics**. 43.2005.

CRUZ, C. D. **Programa Genes**: Versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001.

DICE, L.R. Measures of the amount of ecological association between species. **ecology** 26: 297-307. 1945.

EIADTHONG, W., YONEMORI, K., SUGIURA, A., UTSUNOMIYA, N.; ZUBHADRABANDHU, S. Identification of mango cultivars of Thailand and evaluation of their genetic variation using the amplified fragments by simple sequence repeat-(SSR-) anchored primers **Scientia Horticulturae**. 82: 57-66.1999.

EXCOFFIER, L, LARVAL, G.; SCHNEIDER .S. Arlequin version. 3.01 **An Integrated Software Package for population Genetics Data Analysis**. **Computational and Molecular Population Genetics Lab** (CMPG). Institute of Zoology. University of Berne. 2006.

EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E., QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance

inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**. 131: 479-491.1992.

GUPTA M, CHYI Y- S, ROMERO-SEVERSON, J; OWEN, J. I. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics** 89, 998-1006.1994.

KERRIGAN, j; SMITH, M.T;ROGERS, J. D; POOT, G. A; DOUHAN, G. W. *Ascobotryozyma cognata* sp. Nov., a new ascomycetous yeast associated with nematodes from wood-boring beetle galleries. **Mycological Research**. 107: 1110-1120.2003

KUMAR, L. S, SAWANT, A. S, GUPTA, V. S.; RANJEKAR, P. K. Comparative analysis of genetic diversity among Indian populations of *Scirpophaga incertulas* by ISSR-PCR and RAPD-PCR. **Biochemical Genetics**. 39: 9-10. 2001.

LEÓN, J. H.; JONES, W. A. Genetic differentiation among geographic populations of *Gonatocerus ashmeadi*, the predominant egg parasitoid of the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca coagulata*. **Jornal of Insect Science**. 5: 2. 2005.

LOPES, D.M. **Diversidade e estrutura genética em populações de *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae) por análise de microssatélites** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 55p. 2004.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markes. **Molecular Ecology**, 3:91-99. 1994.

MARTINS, W.F.S.**Diversidade genética de populações naturais de *Anthonomus grandis Boheman* (Coleoptera: Curculionidae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pernambuco. 2008

MELO, G.A. Notas sobre meliponíneos Neotropicais, com a descrição de três novas espécies (Hymenoptera, Apidae). In: G. A. R. Melo; I. Alves-dos-Santos, Apoidea Neotropicais: **Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure**. Editora UNESC, Criciúma. 2003.

MILLER, M. P. **Tools for population genetics analyses (TFPGA): A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data**. 1997. <http://herb.bio.nau.edu/miller/tfpga.htm>.>

MOURE, J. S. Notas sobre as espécies de *Melipona* descritas por Lepeletier em 1836 (Hymenoptera - Apidae). **Revista Brasileira de Biologia** 35: 615-623. 1975.

MOURE, J.S. *Melikerria* e *Eomelipona*, dois subgêneros novos em *Melipona* Illeger, 1896. (Hymenoptera-Apidae). *Naturalia*, **Anais** do “Encontro Brasileiro sobre Biologia de Abelhas e outros Insetos Sociais” Rio Claro, 14-18 de setembro. 32038.1992.

MOURE, J.S; KERR, W.E. Sugestão para modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apoidea). **Dusenía**, 1:105-129. 1950.

NASCIMENTO, M.A. **Variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) do Estado de Minas Gerais com marcadores ISSR**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 30p. 2008.

PAPLAUSKIENĖ, V., ČEKŠTERYTĖ, V.; PAŠAKINSKIENĖ, I.; TAMAŠAUSKIENĖ, D.; RAČYS, J. The use of ISSR method for the assessment of bee. **Biologija**. 3:16 - 20. 2006.

PEDRO, S. R. M; CAMARGO, J.M.F. **Apoidea Apiformes**, In: C.R.F.Brandão e E. M. Canello (ed.). Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil. Vol. 5: Invertebrados Terrestres. São Paulo, FAPESP. Pp,195-211.1999.

PHILLIPS C.B; CANE R.P; MEE J; CHAPMAN H.M; HOELMER K.A; COUTINOT D. Intraspecific variation in the ability of *Microctonus aethiopoidea* (Hymenoptera: Braconidae) to parasitise *Sitona lepidus* (Coleoptera: Curculionidae). **New Zealand Journal of Agricultural Research**. 45: 295 - 303. 2002.

PIRES, C.V. **Comparação entre algumas populações de abelhas do complexo *rufiventris* com base em seqüências do DNA mitocondrial**. Monografia. (Curso: Ciências Biológicas). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa MG, 20p.2007.

PRADEEP A.R., CHATTERJEE S.N., NAIR C.V. Genetic differentiation induced by selection in an inbred population of the silkworm *Bombyx mori*, revealed by RAPD and ISSR marker systems. **Journal of Applied Genetics**.46: 291-298.2005.

SAWYER, N.A; CHAMBERS, S.M; CAIRNEY, J.W.G. Distribution of *Amanitai* sp. Genotypes under eastern Australian sclerophyll vegetation. **Mycological Research**.107:1157-1162.2003.

SCHETINO, M.A.A. **Filogeografia de *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury*: Contribuição para a elucidação do padrão de distribuição geográfico, inferências taxanômicas e preservação**. Viçosa, MG. Monografia (Curso de Biologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

SCHWARZ, H.F .The genus *Melipona*. **Bulletin of the American Museum of Natural**. 63:231-460.1932.

SILVA, F.O; TAVARES, M.G. BATALHA-FILHO, H. WALDSCHMIDT, A.M; FRENANDES-SALOMÃO, T.M; CAMPOS, L.A.O. Variabilidade genética em populações de abelhas do complexo *rufiventris* (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) no Brasil. **53º Congresso Brasileiro de Genética**. Águas de Lindóia, SP. Brasil. 2007.

TAVARES, M. G; DIAS, L. A. S.; BORGES, A. A.; LOPES, D. M; BUSSE, A. H. P.;

COSTA, R. G.; SALOMÃO, T. M. F.; CAMPOS, L. A. O. 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**. 30:667-675.2007.

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

WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Methods Enzymology**. 395: 134-144. 2005.

WOLFE, A.D; LISTON, A. 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, eds.), pp.43-46. Kluwer,Boston.1998.

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