

RONALDO GUIMARÃES COSTA

RONALDO GUIMARÃES COSTA

VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Melipona rufiventris*

VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Melipona rufiventris*

(HYMENOPTERA: APIDAE, MELIPONINAE) NO ESTADO DE MINAS

GERAIS – BRASIL

UFV	BIBLIOTECA BBT	CBA:
CLASSIFICACAO		
TITULO		
		
175950BBT		

BIBLIOTECA CENTRAL
-UFV-
DOAÇÃO
175950
02.10.03

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para a obtenção do título de "Magister Scientiae".

VIÇOSA

MINAS GERAIS – BRASIL

2003

T
595.7990415
C837v
2003

BIBLIOTECA CENTRAL
- UFV -
DOAÇÃO

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

T

C837v
2003
Costa, Ronaldo Guimarães, 1973-
Variabilidade genética em populações de *Melipona
rufiventris* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) no
estado de Minas Gerais - Brasil. - Viçosa : UFV, 2003
59p. : il.

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

1. *Melipona rufiventris* - Variabilidade genética. 2.
Melipona rufiventris - Taxonomia. 3. *Melipona
rufiventris* - População - Minas Gerais. 4. Isoenzimas.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 595.7990415

CDD 20.ed. 595.7990415

AGRADECIMENTOS
RONALDO GUIMARÃES COSTA

Ao fim deste trabalho fica difícil (talvez uma das partes mais difíceis) atribuir e expressar apenas, através das palavras, minha gratidão pelas pessoas que de alguma forma me ajudaram nesta trajetória de dois anos, seja através de palavras amigas, amor e pela colaboração.

VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Melipona rufiventris*
(HYMENOPTERA: APIDAE, MELIPONINAE) NO ESTADO DE MINAS

GERAIS – BRASIL

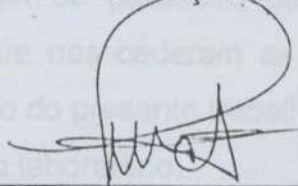
Gostaria de agradecer especialmente a Deus por esta conquista. Sem ele, provavelmente eu não teria tido sucesso e minha vida, me ajudando as pessoas que, a cada momento, me incentivam a seguir em frente. Gostaria de agradecer aos agradecimentos. Por isso, peço que, se por acaso alguém permanecer de fora, que perdoe esta brevidade.

Gostaria de agradecer também aos meus amigos, que nunca esquecerei, como a Alexa, a Lú, a Mariana, o Guga, o Bobô, a Leira, o Bruno, a Gula, Janina, e Sérgio.

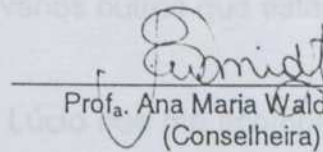
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para a obtenção do título de "Magister Scientiae".

Aos meliponicultores, Antônio Urbano, João Humberto, Antônio Lindo, Adriano Nunes, José Eriberto e Getúlio Ferreira e às pessoas que nos ajudaram durante estes dois anos me incentivando sempre. Gostaria também de agradecer aos membros de banca de professores Luiz Antônio, Antônio, e Sérgio.

Aprovada: 31 de março de 2003



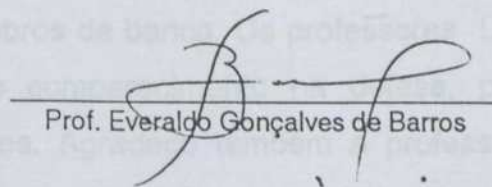
Prof. Lúcio Antônio de Oliveira Campos
(Conselheiro)



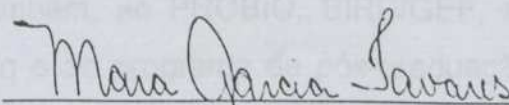
Prof.ª Ana Maria Waldschmidt
(Conselheira)



Dr. Luiz Antônio dos Santos Dias



Prof. Everaldo Gonçalves de Barros



Prof.ª Mara Garcia Tavares
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Ao fim deste trabalho fica difícil, (talvez uma das partes mais difíceis) retribuir e expressar apenas, através das palavras, minha gratidão pelas pessoas que de alguma forma me ajudaram nesta trajetória de dois anos, seja através de palavras amigas, amor e pela colaboração.

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por esta conquista. Sem ele, provavelmente eu não teria tantas Pessoas à minha volta, me ajudando, como tive em Viçosa e Belo Horizonte durante este período. São tantas as pessoas que, a cada momento, me lembro de uma ao qual devo acrescentar aos agradecimentos. Por isso, peço que, se por acaso alguém permanecer de fora, que perdoe esta mente esquecida.

Gostaria de agradecer também aos meus amigos, que nunca esquecerei como a Alexa, a Lu, a Mariana, o Guga, o Bobó, a Lenira, o Bruno, a Guta, Janina, o Geraldo (Cabrito), o Ferreira e o Iris. Aos colegas de laboratório, Andréa (e seu pai, é claro, que gentilmente nos recebeu em Formiga-MG, e nos cedeu material para o presente trabalho), Angélica, Denilce, Marco Antônio e Monteiro.

Aos meliponicultores, Antônio Urbano, João Humberto, Antônio Lino, Adriano Nunes, José Eriberto e Getúlio Ferreira e às pessoas que nos informaram do paradeiro de alguns ninhos, Geraldo Moreira e Geraldo Edson que nos cederam as amostras tornando possível, não somente a realização do presente trabalho, mas de vários outros que estão sendo feitos em nosso laboratório.

À professora Mara e ao professor Lúcio que me acompanharam e me orientaram durante estes dois anos me incentivando sempre. Gostaria também de agradecer aos demais membros da banca. Os professores Luiz Antônio, Ana Maria e Everaldo, pelo comparecimento na defesa, pela correção do trabalho e pelas sugestões. Agradeço também a professora Tânia e ao professor Serrão que também me apoiaram.

Agradeço também, ao PROBIO, BIRD/GEF, ao Ministério do Meio Ambiente, ao CNPq e ao programa de pós-graduação em Entomologia da

UFV que forneceram subsídios que possibilitaram a realização deste trabalho.

Por último, agradeço aos meus pais, Rogério e Maria Aparecida, meus irmãos, Rogério e Rosângela, e minha namorada, a Dani, pessoas que amo e, cujo apoio, carinho, compreensão foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

ABSTRACT	ii
I. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações Gerais Sobre as Abelhas do Gênero <i>Melipona</i> e a espécie <i>M. rufiventris</i>	1
1.2 Importância da Colmeia	2
1.3 Marcadores Isoenzimáticos em Análises de Variabilidade Genética	6
II. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (referentes à Introdução)	11
III. OBJETIVOS	18
IV. TRABALHOS	19
IV.1 Isoenzyme variation in <i>Melipona rufiventris rufiventris</i> (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) in Minas Gerais State – Brazil	20
IV.2 Genetic variability and relatedness among populations of <i>Melipona rufiventris</i> (Hymenoptera: Apoidea, Meliponinae)	33
V. CONCLUSÕES GERAIS	59

Muito obrigado a todos vocês!!!

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Considerações Gerais Sobre as Abelhas do Gênero <i>Melipona</i> e a espécie <i>M. rufiventris</i>	1
I.2. Importância da Conservação de <i>Melipona rufiventris rufiventris</i>	2
I.3. Marcadores Isoenzimáticos em Análises de Variabilidade Genética.....	6
II. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (referentes à Introdução)	11
III. OBJETIVOS.....	18
IV. TRABALHOS.....	19
IV.1. Isoenzyme variation in <i>Melipona rufiventris rufiventris</i> (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) in Minas Gerais State – Brazil	20
IV.2. Genetic variability and relatedness among populations of <i>Melipona rufiventris</i> (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae)	38
V. CONCLUSÕES GERAIS	59

RESUMO

COSTA, Ronaldo Guimarães. M.S. Universidade Federal de Viçosa, março de 2003. **Variabilidade genética em populações de *Melipona rufiventris* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) no Estado de Minas Gerais – Brasil.** Orientadora: Mara Garcia Tavares. Conselheiros: Lúcio Antônio de Oliveira Campos e Ana Maria Waldschmidt.

Com objetivo de caracterizar e quantificar a variabilidade genética e de encontrar marcadores genéticos que possibilitassem estudos populacionais, operárias adultas de *Melipona rufiventris* foram coletadas nas saídas das colméias e submetidas à eletroforese em gel de amido. Foram obtidas amostras de *M. rufiventris* de 39 colônias em 13 localidades do Estado de Minas Gerais, sendo 8 delas localizadas em regiões com vegetação típica de cerrado e 5 em regiões com vegetação típica de mata. Nove sistemas enzimáticos foram analisados: Malato Desidrogenase (MDH), Peptidase-A (PEP-A), Isocitrato Desidrogenase (ICD), α -Glicerofosfato Desidrogenase (α -GPDH), Glicose-Fosfato Isomerase (GPI), Fosfoglicomutase (PGM), Hexoquinase (HK), Esterase (EST) e β -Hidróxido Butirato Desidrogenase (β -HBDH). Estes nove sistemas enzimáticos permitiram estudar 17 locos, dentre os quais, apenas 2 foram polimórficos (*Est-4* e *Mdh-1*). *Est-4* apresentou polimorfismo apenas em colônias coletadas em região de mata, enquanto o polimorfismo para *Mdh-1* foi verificado apenas em colônias oriundas do cerrado. Nas colônias de Brasilândia (cerrado), a *Est-4* apresentou um padrão enzimático intermediário, entre o padrão apresentado por colônias de mata e de cerrado, o que sugere que as colônias desta região sejam híbridas. Observou-se ainda, que os sistemas PEP-A e β -HBDH apresentaram diferentes padrões de expressão entre populações de mata e cerrado, o que contribuiu para a diferenciação de ambas. A heterozigidade esperada foi de 0,0068 em populações de cerrado e de 0,0078 em populações de mata e a proporção de locos polimórficos foi de 5,88% em cada população. Esse valor de heterozigidade foi bem menor do que o verificado em outros Hymenoptera. Os altos valores de F_{st} (índice de fixação) encontrados ($F_{ST} = 0,2306$ entre sub-populações de mata e $F_{ST} = 0,3870$ entre sub-populações de cerrado) encontrados

indicam uma grande diferenciação genética entre as sub-populações de mata e de cerrado. A distância genética entre colônias de mata e de cerrado variou de 0,4739 a 0,5003, o que sugere a existência de, pelo menos, duas "formas" de *M. rufiventris rufiventris*, no estado de Minas Gerais, ou até mesmo, de duas espécies, sendo uma delas, encontrada, em regiões de mata e a outra em regiões de cerrado.

In order to characterize and quantify the genetic variability and to detect genetic markers that permit population studies, adult workers of *Melipona rufiventris* were collected when leaving the hives and submitted to starch gel electrophoresis. Samples of 39 colonies were collected from 15 locations of Minas Gerais being eight of them from cerrado areas and 5 from forest areas. There were evaluate 9 enzymatic systems: Malate Dehydrogenase (MDH), Peptidase-A (PEP-A), Isocitrate Dehydrogenase (ICD), α -Glycerophosphate Dehydrogenase (α -GPDH), Glucose-phosphate isomerase (GPI), Phosphoglucosemutase (PGM), Hexokinase (HK), Esterase (EST) e β -hydroxybutyrate dehydrogenase (β -HBDH). These 9 enzymatic systems yielded 17 loci among which only two were polymorphic (*Est-4* and *Mdh-1*). *Est-4* was polymorphic only in colonies from forest regions, while the polymorphism for *Mdh-1* was verified only in colonies from cerrado. In colonies from Brasília (cerrado), *Est-4* showed an enzymatic pattern intermediary among that presented by colonies from forest regions and cerrado, what suggests that these colonies are hybrids. Still, PEP-A e β -HBDH revealed different enzymatic expression patterns between populations from forest and cerrado regions, what contributed to their differentiation. The expected heterozygosity in populations from cerrado was 0.0068 and in populations from forest regions was 0.0078 and the number of polymorphic loci was of 5.88% in each population. This heterozygosity value was lower than that found in other Hymenoptera. The high values of F_{ST} achieved (fixation index = F_{ST} = 0.2206 in forest regions and F_{ST} = 0.3670 in cerrado) indicate a high genetic differentiation among sub-populations from both regions. The genetic distance between colonies from forest and cerrado ranged from 0.4739 to 0.5003, what suggests the existence of, at least, two "forms" of *M. rufiventris rufiventris* in Minas Gerais, or even two different species: one present in forest and the other in cerrado regions.

ABSTRACT

COSTA, Ronaldo Guimarães. M.S. Universidade Federal de Viçosa, March de 2003. **Genetic variability in *Melipona rufiventris* populations (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) in Minas Gerais State – Brazil.** Adviser: Mara Garcia Tavares. Committee members: Lúcio Antônio de Oliveira Campos and Ana Maria Waldschmidt.

In order to characterize and quantify the genetic variability and to detect genetic markers that permit population studies, adult workers of *Melipona rufiventris* were collected when leaving the hives and submitted to starch gel electrophoresis. Samples of 39 colonies were collected from 13 localities of Minas Gerais being eight of them from cerrado areas and 5 from forest areas. There were evaluate 9 enzymatic systems: Malate Dehydrogenase (MDH), Peptidase-A (PEP-A), Isocitrate Dehydrogenase (ICD), α -Glicerophosphate Dehydrogenase (α -GPDH), Glucose-phosphate Isomerase (GPI), Phosphoglucomutase (PGM), Hexoquinase (HK), Esterase (EST) e β -hydroxybutyrate dehydrogenase (β -HBDH). These 9 enzymatic systems yielded 17 loci, among which only two were polymorphic (*Est-4* and *Mdh-1*). *Est-4* was polymorphic only in colonies from forest regions, while the polymorphism for *Mdh-1* was verified only in colonies from cerrado. In colonies from Brasilândia (cerrado), *Est-4* showed an enzymatic pattern intermediary among that presented by colonies from forest regions and cerrado, what suggests that these colonies are hybrids. Still, PEP-A e β -HBDH revealed different enzymatic expression patterns between populations from forest and cerrado regions, what contributed to their differentiation. The expected heterozygosity in populations from cerrado was 0.0068 and in populations from forest regions was 0.0078 and the number of polymorphic loci was of 5.88% in each population. This heterozygosity value was lower than that found in other Hymenoptera. The high values of F_{ST} achieved (fixation index = F_{ST} = 0.2306 in forest regions and F_{ST} = 0.3870 in cerrado) indicate a high genetic differentiation among sub-populations from both regions. The genetic distance between colonies from forest and cerrado ranged from 0.4739 to 0.5003, what suggests the existence of, at least, two "forms" of *M. rufiventris rufiventris* in Minas Gerais, or even two different species: one present in forest and the other in cerrado regions.

I. INTRODUÇÃO

I.1. Considerações Gerais Sobre as Abelhas do Gênero *Melipona* e a espécie *M. rufiventris*

Acredita-se que as abelhas surgiram a partir de himenópteros da subordem Sphecoidea (Hymenoptera, Aculeata), provavelmente antes do meio do cretáceo, a cerca de 125 milhões de anos atrás. Suas fêmeas, em vez de capturarem outros artrópodes como alimento, como acontece nos grupos dentro desta subordem, coletam pólen e néctar diretamente nas flores para alimentarem suas larvas (Silveira *et al.*, 2002).

Estes insetos constituem o grupo mais importante de polinizadores em diversos ecossistemas (Grant, 1950; Michener, 2000) e reúnem cerca de 20.000 espécies de visitantes florais com características etoecológicas bastante heterogêneas, tanto no que se refere às estruturas e comportamentos de aquisição e transporte de pólen e néctar, como também no período de atividades e à escolha dos tipos florais (Ramalho *et al.*, 1991). Segundo Campos (1998) as abelhas garantem a manutenção do ciclo de reprodução sexuada de um grande número de espécies de plantas e, desta forma, garantem também a disponibilidade de alimento (frutos e sementes) para outros animais que dependem dessas plantas como alimento.

Com relação à polinização, merece destaque, no Brasil a subfamília Meliponinae pois, constitui um grupo de abelhas sem ferrão responsável pela polinização de 40 a 90% das angiospermas, conforme o ecossistema (Kerr *et al.*, 1996). Segundo Camargo e Menezes (1992), esta subfamília apresenta grande diversidade na região tropical, onde já foram descritas mais de 300 espécies, compreendendo duas tribos: Meliponini, que inclui as abelhas do gênero *Melipona* e Trigonini que inclui os demais gêneros de abelhas sem ferrão.

O gênero *Melipona* Illiger apresenta distribuição neotropical, abrangendo desde a América do Sul até a América Central e ilhas do Caribe (Kerr, 1969;

Camargo *et al.*, 1988; Michener, 1990). Este gênero compreende mais de quarenta espécies descritas (Michener, 1979; Camargo, 1979).

A espécie *M. rufiventris* Lepeletier 1836, é encontrada no território brasileiro desde a região Norte (Amazonas, Pará Amapá e Maranhão) até a Centro-Sul (Goiás, Minas Gerais, sul da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina). Moure e Kerr (1950), além de apresentarem dados sobre os caracteres morfológicos da espécie, propuseram uma divisão em cinco subespécies: *Melipona rufiventris rufiventris*, *Melipona rufiventris flavolineata*, *Melipona rufiventris paraensis*, *Melipona rufiventris brachychaeta* e *Melipona rufiventris dubia*. Vasconcelos (1998) analisou 21 colônias desta abelha originadas dos estados da Bahia, Espírito Santo, Piauí, Minas Gerais e Santa Catarina, por meio da técnica de RAPD e da amplificação da região 16S rRNA do genoma mitocondrial. As análises através dos marcadores RAPD e do mtDNA permitiram a separação de três grupos distintos. Um grupo representado pelas populações de Minas Gerais, outro pelas populações de Santa Catarina e o terceiro por Piauí, Maranhão, Espírito Santo e Bahia.

Melipona rufiventris rufiventris ocorre no norte da Bahia, sul de Goiás e Mato Grosso estendendo-se ao sul de Santa Catarina. Segundo Moure e Kerr (1950) esta é a única das subespécies anteriormente citadas encontrada no estado de Minas Gerais. Entretanto, variações morfológicas com relação aos padrões de coloração das cerdas corbiculares e da tibia destes insetos já foram relatadas quando diferentes cidades ao longo da sua área de distribuição foram analisadas (Moure e Kerr, 1950). Por isso, Moure (1992) sugeriu que há muito a ser feito para um melhor entendimento das diferentes formas atribuídas à espécie. É possível que o nome *M. rufiventris rufiventris*, tendo em vista as variações morfológicas encontradas por Moure e Kerr (1950), não se refira a apenas uma subespécie e mais ainda, esteja sendo utilizado para um conjunto de espécies crípticas.

1.2. Importância da Conservação de *Melipona rufiventris rufiventris*

Melipona rufiventris, assim como outros meliponíneos tem tido seu número grandemente reduzido pelos desmatamentos, queimadas, pelo

pequeno tamanho das áreas de reserva, pela ação dos madeireiros, que coletam preferencialmente árvores com mais de cinquenta anos (que são as que têm mais ocos) e pela ação dos meleiros, que derrubam árvores para obter o mel, deixando o ninho aberto e exposto à ação de predadores (Kerr *et al.*, 1999). Esta é uma das poucas espécies dessas abelhas, nativa do estado de Minas Gerais. Originalmente com grande distribuição geográfica no estado, tanto nas áreas de mata quanto no cerrado (Moure e Kerr, 1950) e representada por grandes populações locais, a espécie está se tornando extremamente rara. Por isso foi incluída entre as espécies ameaçadas de extinção da fauna nativa do estado de Minas Gerais.

Segundo Brown e Albrecht (2001), as espécies de *Melipona* são altamente susceptíveis ao desmatamento. Estes autores mediram a abundância de espécies de abelha deste gênero em locais com diversos graus de perturbação antrópica na Amazônia e sugeriram que estas abelhas possuem um grande potencial para serem utilizadas como bioindicadores. Um dos fatores que as torna tão sensíveis é a presença de uma abdomen desenvolvido nas rainhas fisogástricas, a ponto de impedi-las de voar. Desta forma, as colônias são incapazes de fugir de áreas que sofreram algum tipo de distúrbio como desmatamentos ou queimadas.

Em Minas Gerais, o desmatamento, muito provavelmente, tem exercido grande influência sobre as populações de abelhas. Algumas formações vegetais do estado foram praticamente eliminadas, como é o caso da Mata Atlântica, considerada um dos 25 hotspots para a conservação no mundo (Myers *et al.*, 2000). As áreas remanescentes são, em geral, pequenas e por isso têm condições de suportar apenas um reduzido número de espécies com pequenas populações (Viana e Melo, 1987). As formações vegetais encontradas no norte e noroeste de Minas Gerais (em grande parte compostas por vegetação típica de cerrado), têm sido, também, muito alteradas, principalmente com a expansão da pecuária (Ferreira, 1981, citado por Viana e Melo, 1987).

O desmatamento tem isolado áreas remanescentes que pertenciam anteriormente a ecossistemas contínuos, formando ilhas de vegetação. Este

isolamento pode representar várias limitações ao desenvolvimento das populações, como, por exemplo, a redução na disponibilidade de alimento, a redução na disponibilidade de locais para nidificação, diminuição no tamanho das populações e na riqueza de espécies, fatores que estão diretamente ligados ao tamanho do fragmento remanescente. A intensidade desses efeitos está relacionada, principalmente, a três fatores: 1) ao tamanho dos fragmentos remanescentes; 2) à distância entre eles; 3) às condições em que se encontravam quando foram isolados (Viana e Melo, 1987). Quanto maior a distância, menor será a probabilidade de que haja migração entre estes fragmentos. Para animais que têm capacidade de se movimentar entre as áreas isoladas ou mesmo viver em ambientes alterados, o isolamento pode não ocorrer. Contudo, para espécies que são restritas a um determinado tipo de vegetação, as áreas alteradas podem funcionar como barreiras para sua dispersão.

Segundo Didham *et al.* (1996), a fragmentação provoca grandes mudanças na estrutura das comunidades de polinizadores e tem graves consequências no que diz respeito ao fluxo gênico e à dinâmica das populações que ali coexistem. A polinização tem sido diretamente afetada pela fragmentação através da redução na abundância e na riqueza de espécies polinizadoras, e também indiretamente por alterações de comportamento e padrões de voo (Didham *et al.*, 1996). A fragmentação do habitat cria grandes áreas abertas, muitas vezes desprovidas de locais de nidificação, que constituem barreiras que dificultam a migração entre os pequenos remanescentes de mata.

Segundo Michener (2000) as abelhas sociais da tribo Meliponina têm grandes problemas quanto à sua dispersão. Estes insetos dispersam através de enxameamento, e não pela ação de indivíduos, que na sua maioria fazem parte da casta não reprodutora, as operárias. Segundo este autor, uma colônia só se estabelece após o provisionamento do novo ninho, que é feito através de campeiras que, por algum tempo, buscam provisões na colônia mãe. Desta forma, a dispersão de uma colônia por distâncias de algumas centenas de metros pode ser impossível.

Com a diminuição das populações destas abelhas há um aumento no número de cruzamentos endogâmicos. Nestes casos, devido ao mecanismo genético de determinação do sexo em abelhas (partenogênese arrenótoca), aumentam-se as possibilidades do surgimento de machos diplóides nas colônias (Kerr *et al.*, 1996). Em espécies de *Melipona*, esses machos podem ser estéreis, cegos e, além disso, produzir um número reduzido de espermatozoides, sendo assim, muitas vezes, mortos pelas operárias ao emergirem dos favos. Em colônias onde machos diplóides são produzidos em maior quantidade, as rainhas também são eliminadas pelas operárias. Estes fatores podem levar à uma drástica redução na população da colônia e sua conseqüente extinção.

Carvalho *et al.* (1995) analisaram um conjunto de 18 colônias de *Melipona scutellaris* e 50 de suas descendentes e constataram uma diminuição gradual do número de alelos *xo* (genes envolvidos na determinação do sexo) naquela população. Esses autores constataram que um número de, pelo menos seis diferentes alelos do gene *xo* é muito importante para a manutenção dessas abelhas (Kerr *et al.*, 1999). Kerr e Vencovsky (1982) sugeriram um valor mínimo necessário de 44 colônias para a manutenção de seis alelos sexuais em populações de meliponíneos. Estima-se que uma população menor seja extinta em 15 gerações.

Pelo que foi exposto anteriormente as espécies de *Melipona* (com poucas exceções), devido à exploração predatória a que estão sujeitas, à destruição dos habitats em que vivem e conseqüente isolamento de pequenas populações em fragmentos onde ficam sujeitas à endogamia recorrente, estão, presumivelmente, ameaçadas de extinção.

Muitos grupos de insetos são polinizadores, mas as abelhas são provavelmente os mais importantes, seja em abundância ou na riqueza de espécies de plantas polinizadas. O processo de polinização tem sido diretamente afetado pela fragmentação do habitat que leva à depauperização tanto na abundância das populações de polinizadores quanto na riqueza de espécies.

Assim, estudos sobre a variabilidade genética populacional em *M. rufiventris rufiventris*, em seus diferentes aspectos: morfológicos, citogenéticos e moleculares, podem fornecer dados relevantes para o conhecimento da sua estrutura populacional, grau de parentesco e fluxo gênico entre populações de remanescentes, bem como para o desenvolvimento de estratégias que visem a sua preservação. Trabalhos no sentido de elucidar aspectos da biologia da desta abelha podem ser de grande importância quando se pensa, não só na sua preservação, mas das espécies que com ela coexistem e que, com a conservação do habitat desta abelhas, também serão beneficiadas.

1.3. Marcadores Isoenzimáticos em Análises de Variabilidade Genética

O uso de marcadores isoenzimáticos possibilitou um grande avanço nas análises de variabilidade genética. Isoenzimas consistem de múltiplas formas de uma mesma enzima, que ocorre em uma espécie, como resultado da presença de um ou mais genes codificando cada uma destas enzimas (Moss, 1982). O princípio básico da técnica utilizada para evidenciar as isoenzimas consiste no uso de eletroforese em gel de amido para separar as diferentes formas da enzima (Smithies, 1955) e na visualização do produto enzimático utilizando métodos de coloração desenvolvidos para uso em técnicas histoquímicas (Hunter e Market, 1957).

Comumente, os padrões isoenzimáticos podem ser explicados por três mecanismos: a multiplicidade de locos, o alelismo múltiplo e as alterações pós-traducionais (Hopkinson, 1974; Harris e Hopkinson, 1978; Harris, 1980).

Algumas enzimas são determinadas por dois ou mais locos estruturais, cada um dos quais codifica a seqüência primária de um determinado polipeptídeo. Estes polipeptídeos podem formar, separadamente, os vários componentes de um conjunto de isoenzimas ou podem se combinar, em proporções idênticas ou diferentes, para formar uma série mais complexa de isoenzimas.

A segunda causa da formação de isoenzimas decorre da possibilidade da ocorrência de diferentes alelos em um loco gênico. Uma vez que cada

alelo codificará uma versão estruturalmente distinta da cadeia polipeptídica, a estrutura primária da enzima envolvida diferirá de um indivíduo para outro, segundo os alelos que eles apresentam no loco em questão. Os heterozigotos, uma vez que apresentam alelos diferentes, deverão exibir, geralmente, um padrão isoenzimático mais complexo que os homozigotos. O padrão dos heterozigotos será uma mistura daqueles alelos que ocorrem nos dois homozigotos correspondentes, se a enzima for monomérica. Porém, quando a enzima apresentar estrutura quaternária, formas híbridas adicionais, ausentes nos homozigotos, poderão ocorrer.

Os mecanismos descritos acima estabelecem o fundamento genético que define as principais características das várias formas moleculares de enzimas ou proteínas funcionalmente semelhantes que ocorrem em cada indivíduo de uma espécie. Mas, a complexidade de muitos sistemas isoenzimáticos estudados não pode ser totalmente explicada com base somente nestes dois mecanismos.

As modificações secundárias da estrutura das proteínas subsequentes à síntese destes polipeptídeos, podem ser também uma causa importante da multiplicidade de formas freqüentemente observadas.

Estas formas moleculares múltiplas podem se originar no interior das células e/ou in vitro, durante a estocagem ou manuseio das amostras. O aparecimento de isoenzimas secundárias parece ser muito comum. Na maior parte dos casos, seu aparecimento, a partir das formas primárias parece envolver alguma alteração estrutural da molécula. Entretanto, a natureza precisa de tais modificações estruturais não é bem conhecida, na maioria dos casos. Estas formas secundárias podem ser explicadas por ligação com outras moléculas, adição de cadeias laterais glicídicas à proteína, diferentes graus de acetilação, metilação ou fosforilação, oxidação de grupos sulfidrila, remoção de grupos amida de um ou mais resíduos de glutamina ou asparagina, proteólise, polimerização e modificações conformacionais. Dois ou mais dos mecanismos propostos podem estar operando para produzir as formas múltiplas observadas para uma dada enzima.

A eletroforese de isoenzimas é uma técnica amplamente utilizada para examinar o papel das enzimas no metabolismo celular, para estimar o grau de polimorfismo presente nas populações e as diferenças genéticas inter e intra-específicas (Scandalios, 1975).

Vários são os estudos que demonstram a variação genética dentro de diferentes grupos de himenópteros (Mestriner e Contel, 1972; Metcalf *et al.*, 1975; Contel *et al.*, 1977; Pamilo *et al.*, 1978; Lester e Selander, 1979; Lima e Mestriner, 1985; Ross *et al.*, 1987; Falcão e Contel, 1991a,b; Castanheira e Contel, 1995; Del Lama *et al.*, 2001).

Com referência aos meliponíneos, que serão objeto de estudo neste trabalho, o primeiro trabalho publicado sobre variabilidade enzimática foi o de Contel e Mestriner (1974). Neste trabalho, os autores descreveram o polimorfismo no loco Est-3 em *Melipona subnitida* e *M. quadrifasciata*. A partir de então, uma grande quantidade de informações sobre polimorfismos em populações de diferentes espécies desse grupo tem sido descrita.

Alguns trabalhos também analisaram a variabilidade genética de populações naturais de formigas, podendo-se citar Ross *et al.* (1987), Seppa e Gertsch (1992) e Diehl *et al.* (2001).

Dados de diversidade genética também existem para Symphyta (Pamilo *et al.*, 1978; Sheppard e Heydon, 1986), espécies de parasitóides (Parasitica) (Lester e Selander, 1979) e vespas (Metcalf *et al.*, 1975; Pamilo *et al.*, 1978).

Pamilo *et al.* (1978) e Lester e Selander (1979) tentaram relacionar a quantidade de variabilidade genética com o grau de sociabilidade dos Hymenoptera, mas, não encontraram diferenças significativas quanto à variabilidade genética entre espécies sociais e solitárias. Os estudos acima citados mostraram que os himenópteros têm níveis de variação genética significativamente menores do que a maioria dos insetos. A heterozigosidade média encontrada na ordem Hymenoptera é 0,036 versus 0,120 em insetos diplodiplóides (Graur, 1985). As hipóteses sugeridas para explicar estes resultados baseiam-se no fato de os machos de Hymenoptera

serem haplóides e/ou em características etoecológicas da maioria das espécies estudadas eletroforeticamente.

Além da utilidade das análises isoenzimáticas para o estudo da diversidade genética de populações, elas também já foram utilizadas para estimar o grau de parentesco intracolônial em abelhas (Contel e Kerr, 1976; Machado *et al.*, 1984), formigas (Pamilo, 1982; Kaufman *et al.*, 1992) e vespas (Strassmann *et al.*, 1989; Gaspar, 1996).

Os padrões isoenzimáticos comumente se alteram durante o desenvolvimento embrionário e são altamente característicos de cada tipo celular em estágios específicos de sua diferenciação. Alterações qualitativas e quantitativas são as duas principais modificações verificadas no ciclo de vida de muitos organismos. O aparecimento de novas formas enzimáticas ou o aumento de atividade das formas já existentes pode resultar da síntese "de novo" da molécula enzimática ou da atividade de precursores pré-existentes da enzima. As isoenzimas são, então, uma expressão da diferenciação das células e uma análise detalhada de seus padrões e propriedades que se alteram durante o desenvolvimento pode levar à compreensão dos mecanismos genéticos e metabólicos básicos que suportam a diferenciação celular (Scandalios, 1975).

Atualmente, inúmeros exemplos permitem um melhor entendimento sobre a variação do padrão isoenzimático durante o desenvolvimento dos himenópteros (Contel e Mestriner, 1975, Contel *et al.*, 1977, Machado e Contel, 1989, 1991; Castanheira e Contel, 1995; Figueiredo *et al.*, 1996). Variações nos padrões enzimáticos também puderam ser observadas entre castas e sexos (Tripathi e Dixon, 1968, 1969; Kubicz e Galuszka, 1971) e entre diferentes tecidos do organismo (Ruvolo-Takasusuki *et al.*, 1997; Del Lama *et al.*, 2001).

As diferenças observadas na abundância relativa e na localização intracelular e tecidual sugerem que cada isoenzima pode desempenhar um papel fisiológico diferente. As isoenzimas de uma mesma enzima podem catalizar a mesma reação química, mas não necessariamente com a mesma eficiência ou sob as mesmas condições; elas atuam sob diferentes

condições metabólicas, ou em diferentes sítios de uma mesma célula, ou em diferentes células, ou na mesma célula em estágios sucessivos da diferenciação. Aparentemente, as isoenzimas surgiram por pressões evolutivas para preencher os intrincados requerimentos da maquinaria metabólica da célula (Markert, 1975).

Vários trabalhos também demonstram a aplicação de análises isoenzimáticas em estudos de sistemática e filogenia na ordem Hymenoptera. Como exemplos, pode-se citar o trabalho de Ward (1980) e os de Pekkarinem *et al.* (1979) e Pamilo *et al.* (1981) que utilizaram a variação enzimática em estudos de filogenia em *Rhytidoponera* e de Vespidae, *Bombus* e *Psithyrus*, respectivamente.

Análises enzimáticas também foram utilizadas em estudos de especiação de vespas do complexo *Polistes fuscatus* (Metcalf *et al.*, 1984) e de diferentes espécies de *Microstigmus* (Sphecidae) (Melo, 1993). Com base nos padrões encontrados Melo (1993) conseguiu separar aproximadamente 11 espécies crípticas e o fenograma, obtido a partir dos dados isoenzimáticos, apresentaram um arranjo semelhante ao do cladograma construído com base em caracteres morfológicos e comportamentais, o que confirma a utilidade desta técnica em estudos taxonômicos deste gênero.

Pelos dados relatados, pode-se concluir que é grande a importância dos marcadores enzimáticos no estudo de diversos aspectos da biologia de insetos, em geral, e daqueles da ordem Hymenoptera, em particular. Esta importância deve-se não só ao valor das informações que esses marcadores podem nos fornecer, mas à grande quantidade de trabalhos já feitos, à rapidez com que são obtidos os resultados e ao custo da técnica frente às outras técnicas moleculares. Portanto, neste trabalho, estes marcadores foram utilizados para se analisar a variabilidade genética em diferentes populações de *Melipona rufiventris* no estado de Minas Gerais.

II. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (referentes à introdução)

- Brown, J. C., Albrecht, C. (2001). The effect of tropical deforestation on stingless bees of the genus *Melipona* (Insecta: Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in central Rondonia, Brazil. *Journal of Biogeography*, **28**:623-634.
- Camargo, J. M. F., Moure, J. S. & Roubik, D. W. (1988). *Melipona yucatanica* new species (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae), stingless bee dispersal across the Caribbean area and Post-Eocene vicariance. *Pan-Pacific Entomologist*, **64**(2): 147-157.
- Camargo, J. M. F. (1979). Sex determination in bees. XI. Production of diploid males and sex determination in *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). *J. Apic. Res.*, **18**: 77-84.
- Camargo, J. M. F. & Menezes Pedro, S. R. (1992). Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. *Apidologie*, **23**: 509-522.
- Campos, L. A. O. (1998). *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836. In: Machado, A. B. M.; G. A. B. Fonseca; R. B. Machado; L. M. S. Aguiar; L. V. Lins (ed.). *Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna de Minas Gerais*. Belo Horizonte, Biodiversitas. Pp. 560-561.
- Carvalho, G.A., Kerr, W. E., Nascimento, V. A. (1995). Sex determination in bees. XXXIII. Decrease of Xo heteroalleles in a finite population of *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). *Rev. Bras. Genet.* **18** (1): 13-16.
- Castanheira, E. B. & Contel, E. P. B. (1995). Isoenzymes related to flight activity in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae): evidence of postranslational modification of the hexokinase and detection of new glycerol-3-phosphate dehydrogenase variants. *Biochemical Genetics*, **33**: 365-375.

- Contel, E. P. B., Mestriner, and Martins, E. (1977). Genetic control and development expression of malate dehydrogenase in *Apis mellifera*. *Biochem. Genet.* 15: 859-875.
- Contel, E. P. B. & Mestriner (1974). Developmental protein patterns in two species of stingless bees: *Melipona quadrifasciata anthidioides* and *Melipona subnitida*. *Ciência e Cultura*, 27 (11): 1221-1224.
- Contel, E. P. B. & Kerr, W. E. (1976). Origin of males in *Melipona subnitida* estimated from data of an isozymic polymorphic system. *Genetica*, 46: 271-277.
- Del Lama, M. A., Bezerra, R. M., Egea Soares, A. E. & Rúvolo-Takasusuki., (2001). Genetic, ontogenetic, and tissue-specific variation of aminopeptidases of *Apis mellifera*. *Apidologie*, 32: 25-35.
- Didham, R. K., Ghazoul, J., Stork, N. E. & Davis, A. J. (1996). Insects in Fragmented Forests: a Functional Approach. *TREE*. 11(6): 255 – 260.
- Diehl, E., Araújo, A. M. de and Cavalli-Molina, S. (2001). Genetic variability and social structure of colonies in *Acromyrmex heyeri* and *A. striatus* (Hymenoptera: Formicidae). *Braz. J. Biol.* 61(4): 667-678.
- Falcão, T. M. M. A & Contel, E. P. B. (1991a). Genetic variability in natural populations of Brazilian social bees: II. Electrophoretic data for PGM and MDH give evidence for multiple fertilizations in stingless bees. *Revista Brasileira de Genética*, 14 (1): 47-59.
- Falcão, T. M. M. A & Contel, E. P. B. (1991b). Genetic variability in natural populations of Brazilian social bees: III. Electrophoretic data for ME, GPD, SOD and IDH. *Revista Brasileira de Genética*, 14 (1): 61-72.
- Figueiredo, V. L. C., Paulino-Simões, Z. L., Bitondi, M. M. G. (1996). Developmental pattern of esterases in *Apis mellifera* L. Honeybees. I. Stage-dependent changes of esterase isoenzymes in Africanized workers. *Apidologie*, 27: 47-54.

- Gaspar, J. C. W. (1996). Estrutura genética e parentesco em *Polistes satan* (Bequaert, 1940) (Hymenoptera: Vespidae). *Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de São Carlos, UFSCar*. 81p.
- Grant, V. (1950). The Flower Constancy of Bees. *Bot. Rev.*, **16**:379-398.
- Graur, D., (1985). Gene diversity in Hymenoptera. *Evolution*, **39** (1): 190– 99.
- Harris, H. & Hopkinson, D. A. (1978). *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. Amsterdam, North-Holland Biomedical Press, n.p. (Suppl.)
- Harris, H. (1980). The principles of human Biochemical Genetics. Elsevier/North-Holland, Amsterdam, third edition.
- Hopkinson, D. A. (1974). Isozymes. *J. Clin. Pathol.*, 24, suppl. (Royal Coll. Pathol.) **8**: 122-127.
- Hunter, R. L., Markert. C. L. (1957). Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, **125**: 1294-1295.
- Kaufman, B., Boomsma, J. J., Passera, L., Petersen, K. N. (1992). Relatedness and inbreeding in French population of the unicolonial ant *Iridomyrmex humilis* (Mayr). *Ins. Soc.*, **39**:195-213.
- Kerr, W. E. (1969). *Some aspects of the evolution of social bees (Apidae) in evolutionary biology*. Ed. T. DOBZHANSKY, M. K. HECHT & W. C. STREET. Columbia Univ. Press, New York, p. 119-175.
- Kerr, W. E., Carvalho, G. A. & Nascimento, V. A. (1996). Abelha Uruçu. *Biologia, Manejo e Conservação. Coleção Manejo da Vida Silvestre*, nº. 2. Belo Horizonte, Acangaú.
- Kerr, W. E., Carvalho, G. A. & Nascimento, V. A. (1999). The Probable Consequences of the Destruction of Brazilian Stingless Bees. *New York Botanical Garden Press*. p.407.

- Kerr, W. E. & Vencovsky, R. (1982). Melhoramento genético em abelhas. I. Efeito do número de colônias sobre o melhoramento. *Revista Brasileira de Genética*, **5**(2): 279-285.
- Kubicz, A., Galuszka, H. (1971). Polyacrylamide gel electrophoresis of protein and the acid phosphatase isoenzymes from hemolymphs of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Zool. Pol.*, **21**: 51-57.
- Lester, L. J. & Selander, R. K. (1979). Population genetics of haplodiploid insects. *Genetics*, **92**: 1329 – 1345.
- Lima, L. M. K. S. & Mestriner, M. A. (1985). Starch gel electrophoretic patterns of esterases and nonspecific proteins in 11 different species of meliponine bees. *Revista Brasileira de Genética*, **8** (4): 639-652.
- Machado, M. F. P. S., Contel, E. P. B. & Kerr, W. E. (1984). Proportion of males sons-of-the-queen and sons-of-workers in *Plebeia droryana* (Hymenoptera, Apidae) estimated from data of an MDH isozymic polymorphic system. *Genetica*, **65**: 193-198.
- Machado, M. F. P. S. & Contel, E. P. B. (1989). Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G-3-PDH; EC 1.1.1.8) variation in adult *Plebeia droryana* bees (Apidae, Hymenoptera). *Biochemical Genetics*, **27**: 481-486.
- Machado, M. F. P. S. & Contel, E. P. B. (1991). Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G-3-PDH; EC 1.1.1.8) variation in brazilian stingless bees and wasps species. *Biochemical Genetics*, **29** (5/6): 255-260.
- Market, C. L. (1975). Biology of isozymes. In: Market C. L. (ed.). *Isozymes*. Academic Press, New York, p 837-849.
- Melo, G. A. R. (1993). Relações filogenéticas entre espécies do gênero *Microstigmus* Ducke, 1907 (Hymenoptera, Sphecidae, Pemphredoninae), com base em dados isozimáticos e morfológicos. *Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Viçosa, UFV*. 103p.

- Metcalf, R. L., Marlin, J. C. & Whitt, G. S. (1975). Low levels of genetic heterozygosity in Hymenoptera. *Nature*, **257**: 792 – 794.
- Metcalf, R. L., Marlin, J.C., Whitt, G.S. (1984). Genetics of speciation within the *Polistes fuscatus* species complex. *J. Hered.*, **75**: 117-120.
- Mestriner, M. A. & Contel, E. P. B. (1972). The P-3 and Est loci in the honeybee *Apis mellifera*. *Genetics*, **72**: 733-738.
- Michener, C. D. (1979). Biogeography of the bees. *Ann. Mol. Bot. Gard.*, **66**: 277-347
- Michener, C. D. (1990). Classification of the Apidae (Hymenoptera). *Univ. Kansas Sci. Bull.*, **54**: 75-164.
- Michener, C. D. (2000). *The Bees of the World*. Baltimore, Johns Hopkins.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Fonseca, G. A. B. & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**: 853-858.
- Moss, D. W. (1982). *Isozymes*. Chapman e Hall, New York.
- Moure, J. S. & Kerr, W. E. (1950). Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymen. – Apoidea). *Dusenias*, **1** (2): 105-129.
- Moure, J. S. (1992). *Milikerria* e *Eomelipona*, dois subgêneros novos em *Melipona* Illiger, 1896. (Hymenoptera – Apidae). *Naturalia, Anais do "Encontro Brasileiro sobre Biologia de Abelhas e outros Insetos Sociais"*. Rio Claro, 14-18 de setembro de 1992, 32-38.
- Pamilo, P., Varvio-Aho, S. L. & Pekkarinen, A. (1978). Low enzyme gene variability in Hymenoptera as a consequence of haplodiploidy. *Hereditas*, **88**: 93–99.
- Pamilo, P., Pekkarinen, A., Varvio-Aho, S. L. (1981). Phylogenetic relationships and the origin of social parasitism in Vespidae and in

- Bombus* and *Psithyrus* as revealed by enzyme genes. In: *Biosystematics of social insects*. Systematics Assn. Special volume, nº 19 (P. E. Howse and J. L. Clement, eds.), pp. 37-48. Academic Press, London.
- Pamilo, P. (1982). Genetic population structure in polygynous *Formica* ants. *Heredity*, v. 48, p. 95-106.
- Perkkarinen, A., Varvio-Aho, S. L. & Pamilo, P. (1979). Evolutionary relationships in northern european *Bombus* and *Psithyrus* species (Hymenoptera, Apidae) studied on the basis of alloenzymes. *Ann. Entomol. Fenn.*, **45**:77-80.
- Ramalho, M. & Imperatriz-Fonseca, V. L. & Kleinert-Giovannini, A. (1991). Ecologia Nutricional de Abelhas Sociais. In: Ranizzi, A.R. & Parra, J.R.P. *Ecologia Nutricional de Insetos e suas Implicações no Manejo de Pragas*. CNPq. Editora Manole Ltda. 359p.
- Ross, K. G., Vargo, EL L. and Fletcher, D. J. C. (1987). Comparative biochemical genetics of three fre ant species in North America, with special reference to the two social forms of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Evolution*, **39**: 979-990.
- Ruvolo-Takasusuki, M. C. C., Del Lama, M. A. and Soares, A. E. E. (1997). Genetic characterization of a new *Apis mellifera* esterase. *Apidologie*, **28**: 259-267.
- Scandalios (1975). Genes, Isozymes and Evolution. In "Isozymes: Genetics and Evolution", Market, C. L., ed. Acad. Press (New Cork), **4**: 1-8.
- Seppa, p. and Gerstch, P. (1992). Genetic relatedness in the ant *Camponotus herculeanus*. A comparison of estimates from allozyme and DNA microsatellite markers. *Ins. Soc.*, **43**:235-246.
- Sheppard, W. S. & Heydon, S. L. (1986). High levels of genetic variability in three male-haploid species. *Evolution*, **40**:1350-1353.

- Silveira, F. A., Melo, G. A. R. & Almeida, E. A. B. (2002). *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*. MMA e PROBIO. Fundação Araucária, Belo Horizonte – MG, 253p.
- Smithies, O. (1955). Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal individuals. *Biochem. J.*, **61**: 629-641.
- Strassmann, J. E., Hughes, C. R., Queller, D. C., Turillazzi, S., Cervo, R., Davis, S. K. and Goodnight, K. F. (1989). Genetic relatedness in primitively eusocial wasps. *Nature*, **342**: 268-270.
- Tripathi, R. K., Dixon, S. E. (1968) Haemolymph esterases in the female larval honeybee, *Apis mellifera* L., during caste development. *Can. J. Zool.*, **46**: 1013-1017.
- Tripathi, R. K., Dixon, S. E. (1969). Changes in some haemolymph dehydrogenase isozymes of the female honeybee, *Apis mellifera* L., during caste development. *Can. J. Zool.*, **47**: 763-770.
- Vasconcelos, S. M. (1998). Divergência genética entre populações de *Melipona rufiventris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, UFU*. 42p.
- Viana, B. V. & Melo G. A. R. (1987). Conservação de Abelhas. *Informativo Agropecuário*, **13** (149).
- Ward, P. S. (1980). A systematic revision of the *Rhytidoponera impressa* group (Hymenoptera: Formicidae) in Australia and New Guinea. *Aust. J. Zool.* **28**: 475-498.

III. OBJETIVOS

Diante das evidências de que as abelhas da espécie *M. rufiventris* estão se tornando raras no estado de Minas Gerais e da possibilidade de que o nome *M. rufiventris* esteja sendo utilizado para um conjunto de espécies crípticas, este trabalho teve como objetivo geral analisar a variabilidade genética com base em marcadores isoenzimáticos e avaliar o status taxonômico desta espécie.

Assim, este trabalho teve como objetivos específicos:

1. Caracterizar, enzimaticamente, as populações de *M. rufiventris* amostradas em diferentes biomas (cerrado e mata) de Minas Gerais, com o intuito de verificar se estas poderiam ser diferenciadas geneticamente;
2. Avaliar, com base nos padrões enzimáticos, o status taxonômico de diferentes populações de *M. rufiventris* localizadas em Minas Gerais.

ISOENZYME VARIATION IN *Melipona rufiventris*
rufiventris (HYMENOPTERA: APIDAE, MELIPONINAE)
IN MINAS GERAIS STATE - BRAZIL

III. TRABALHOS

Ronaldo Guimarães Costa & Mara Garcia Tavaros

Universidade Federal de Viçosa - UFV
Departamento de Biologia Geral
Av. Pq. Rolfs, s/n - Campus
CEP: 35.671-000 - Viçosa, Minas Gerais, Brasil

ABSTRACT

The stingless bee *Melipona rufiventris* is an important pollinator agent in several Brazilian ecosystems. Originally with a great distribution in Minas Gerais (MG) state, both in Cerrado and in Forest regions, this species is becoming very rare. Therefore this species was included in the endangered species list.

ISOENZYME VARIATION IN *Melipona rufiventris* *rufiventris* (HYMENOPTERA: APIDAE, MELIPONINAE) IN MINAS GERAIS STATE – BRAZIL

enzymatic variation was analyzed in 10 colonies from Cerrado and 10 colonies from Forest regions. The heterozygosity ranged from 0.0061 in Cerrado to 0.0083 in Forest regions and the proportion of polymorphic loci was of 5.85% in both ecosystems. Only Est-4 was polymorphic in colonies from Forest regions and Mdh-1 in colonies from Cerrado. The locus Hbdh-1, according to the experimental conditions, was unrevealed in all colonies from Cerrado. A great genetic differentiation among colonies into ecosystems ($F_{ST} = 0.2305$ for Est-4 in Forest regions and $F_{ST} = 0.3870$ for Mdh-1 in Cerrado) was achieved. *M. rufiventris* was

Ronaldo Guimarães Costa & Mara Garcia Tavares

Genetic variation of *M. rufiventris* was found to be low, typical of an endangered species.

Key words: Hymenoptera, *Melipona*, genetic variability, isozymes.

Universidade Federal de Viçosa -UFV

Departamento de Biologia Geral

Av. Ph Rolfs, s/n – Campus

CEP: 36 571 000 – Viçosa, Minas Gerais, Brasil

ABSTRACT

The stingless bee *Melipona rufiventris* is an important pollinator agent in several Brazilian ecosystems. Originally with a great distribution in Minas Gerais (MG) state, both in Cerrado and in Forest regions, this species is becoming very rare. Therefore this species was included in the endangered species' list of Minas Gerais. We used isoenzyme data to a better understanding of the genetic structure of several *M. rufiventris* colonies. Samples of 35 colonies were collected from 12 localities and evaluated by 9 enzymatic systems, which yielded 17 loci. The observed heterozygosity ranged from 0.0061 in Cerrado to 0.0083 in Forest regions and, the proportion of polymorphic loci was of 5.88% in both ecosystems. Only *Est-4* was polymorphic in colonies from Forest regions and *Mdh-1* in colonies from Cerrado. The locus *Hbdh-1*, according to the experimental conditions, was unrevealed in all colonies from Cerrado. A great genetic differentiation among colonies into ecosystems ($F_{ST} = 0.2306$ for *Est-4* in Forest regions and $F_{ST} = 0.3870$ for *Mdh-1* in Cerrado) was achieved. *M. rufiventris* was characterised by a predominance of monomorphic loci, with high fixation of alleles. Genetic variation of *M. rufiventris* was found to be low, typical of an endangered species.

Key words: Hymenoptera, *Melipona*, genetic variability, isozymes.

INTRODUCTION

The stingless bee *Melipona rufiventris* is an important pollinator agent in several Brazilian ecosystems. Originally with a great distribution in Minas Gerais (MG), both in Cerrado and in Forest regions, this species is becoming very rare in this State due to habitat destruction and fragmentation, the predatory honey collection, and the small size of remnant populations.

Moure and Kerr (1950) suggested that *M. rufiventris* could be a polytypic species, constituted by five subspecies: *M. r. rufiventris*, *M. r. flavolineata*, *M. r. paraensis*, *M. r. brachychaeta* and *M. r. dubia*. Of these, only *M. r. rufiventris* is found in Minas Gerais. However, morphological variations have been related for this subspecies when different localities along its distribution area were analysed (Moure and Kerr, 1950, Moure, 1975). Thus, Moure (1992) suggest that there is much to be done to a better knowledge of different "forms" attributed to this species. It is possible that the name *M. rufiventris* is being used to a set of cryptic species.

Therefore, studies concerning the genetic variability of *M. rufiventris* could provide relevant data for its population structure knowledge, kinship relation among individuals, for gene flow between remnant populations and, moreover, to elaborate strategies for it's preservation. This kind of strategy becomes of great importance when we think not only in *M. rufiventris* conservation, but also in several species that coexist with it, and that, with the preservation of it's habitat will be also benefited. It's important to bear in mind that remains less than 9% of the original Atlantic Forest and a great number of tropical tree species are pollinated by *Melipona* bees.

Genetic studies on *M. rufiventris*, however, are scarce. Machado and Contel (1991) analysing the pattern of expression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *M. rufiventris*, found variations that could be a phenomenon closely related not only to adult age and activity in the hive, but also to a gradual acquisition of the ability to fly. Recently, Vasconcelos (1998) used molecular markers to estimate evolutionary relationships involved in the speciation process of *M. rufiventris* originated from different regions of Brazil. Analyses permitted the formation of three distinct groups.

Groups 1 and 2 were represented by populations from Minas Gerais and Santa Catarina, respectively, while group 3 were joined populations from Espírito Santo, Bahia, Piauí and Maranhão.

Since *M. rufiventris* was included in the endangered species' list of Minas Gerais State, in the present study, we present isoenzyme data to a better understanding of the genetic structure of this species, with special reference to populations from Minas Gerais-Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Population sampling

Melipona rufiventris adult workers were obtained from 35 colonies in 12 localities of Minas Gerais state: seven in areas of Forest regions and the other five in areas of Cerrado (Table I). Eight workers were analysed for each hive.

Isoenzyme electrophoresis

Standard horizontal starch gels (14%) electrophoresis procedures were used (Harris and Hopkinson, 1978). The following enzyme systems were assayed: hexokinase (E.C.2.7.1.1, HK), glucose phosphate isomerase (E.C.5.3.1.9, GPI), esterase (E.C.3.1.1.1, EST), aminopeptidase A (E.C.3.4.11, PEP-A), hydroxybutyrate dehydrogenase (E.C.1.1.1.30, HBDH), isocitrate dehydrogenase (E.C.1.1.1.42, ICD), malate dehydrogenase (E.C.1.1.1.37, MDH), phosphoglucomutase (E.C.2.7.5.1, PGM) and α -glycerophosphate dehydrogenase (E.C.1.1.1.8, GPD).

Isoenzyme loci were sequentially numbered from anode to cathode. For all isoenzymes, the fastest allele of each enzyme system was called number 1, the second electromorph number 2, and so on.

Genetic diversity measures

The isoenzyme dataset was used to estimate the following genetic diversity measures: a) allele frequencies for each locus, b) percentage of polymorphism (P) to describe the proportion of polymorphic loci, using the 95% criterion for frequency of the most common allele, c) observed heterozygosity (H_o) describing the proportion of observed heterozygotes at a given locus, and d) expected heterozygosity (H_e) under random mating using the algorithm of Levene (1949). The chi-squares (χ^2) test for the Hardy-Weinberg equilibrium at each locus was performed using the algorithm of Levene (1949). The population genetic structure was assessed by estimating *F*-statistics of Wright (Wright, 1978). All listed diversity measures were performed by using the POPGENE version 1.32 computer program (Yeh *et al.*, 1999).

RESULTS

The survey of 9 enzymatic systems provided data on isoenzyme variation for 17 loci of *Melipona rufiventris* indicate that *M. rufiventris* is characterised by a predominance of monomorphic loci, with only *Est-4* (Figure 1) being polymorphic in colonies from Forest regions and *Mdh-1* in colonies from Cerrado (Figure 2). Variable enzymes and allele frequencies are listed in Table II for colonies of both ecosystems.

The results showed that six loci (*Est-1*, 2, 3, 4, *Pep-1* (Figure 3) and *Mdh-1*) exhibited different migration rate among colonies from Forest regions and Cerrado areas and that *Hbdh-1* was consistently unrevealed in all colonies of *M. rufiventris* from Cerrado areas (Figure 4) under the experimental conditions. These seven loci could be used to distinguish colonies from the two different geographic regions (Costa *et al.*, unpublished data) and, therefore, data for polymorphic loci will be presented separately for each population.

- *Melipona rufiventris* from Forest regions.

Est-4 was polymorphic in colonies of *M. rufiventris* collected in Coluna and Rio Vermelho ($P=0.058$ at the 95 % level) (Figure 1). Two alleles, called *Est-4*² and *Est-4*³ were detected for this locus in these colonies. The variation observed in the electrophoretic phenotypes of *Est-4* in these colonies is compatible with the segregation of two alleles at a single locus. The other colonies collected in areas of Forest regions (Itamarandiba, Marliéria and Resende Costa) showed only homozygous individuals (allele *Est-4*²).

Allele frequencies with respect to this locus were 0.9297 and 0.0703 for *Est-4*² and *Est-4*³, respectively (Table II). *Est-4*¹ was found exclusively in colonies from Cerrado areas. The high frequency for *Est-4*² can be explained by the great number of sampled colonies from areas where all individuals were monomorphic for this allele. The genotype frequencies, however, were in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium model for this locus. The expected heterozygosity for *M. rufiventris* from Forest regions areas, based on all 17 loci was 0.0078 (Table II).

Table III present the F statistics for *M. rufiventris*. Sub-populations from Forest regions areas exhibited an excess of heterozygotes ($F_{IS} = -0.3981$) for *Est-4*. When genotypes from all sub-populations of this area were pooled, an excess of heterozygotes was still observed at this locus ($F_{IT} = -0.0756$). The fixation index, F_{ST} , was extremely high ($F_{ST} = 0.2306$), indicating great genetic differentiation among sub-populations (Wright, 1978).

- *Melipona rufiventris* from Cerrado areas

The 27 colonies of *M. rufiventris* collected in Cerrado were also analysed for 17 enzymatic loci, from which only *Mdh-1* was polymorphic at the 95 per cent level ($P= 0.058$) in two colonies collected in Arcos, one colony from Formiga and two colonies from Córrego Dantas (Figure 2). Colonies presented a monomorphic profile for all other enzymatic system analysed.

The electrophoretic profiles observed for *Mdh-1*, with males exhibiting one band and heterozygotes workers three activity bands, suggest that this is a dimeric isoenzyme and that it is controlled by one locus with two co-dominant alleles (*Mdh-1*¹ and *Mdh-1*²). The remaining colonies of Cerrado showed a monomorphic profile for *Mdh-1*, consisting of the allele of slow mobility (*Mdh-1*²). MDH allele frequencies were 0.0579 and 0.9421 for alleles 1 and 2, respectively (Table II) and, with respect to this locus, the genotype frequencies were not in Hardy-Weinberg equilibrium. *Mdh-1*¹ was also found in colonies from Forest regions and Brasília.

The expected heterozygosity for *M. rufiventris*, based on 17 scorable loci, was 0.0068 (Table II). In sub-populations of *M. rufiventris* from Cerrado areas, cases of excess of heterozygotes were observed at *Mdh-1*, as is reflected in the significant negative F_{IS} value ($F_{IS} = -0.4545$). However, when analyzed at the populations' level, F_{IT} assumed a positive value ($F_{IT} = 0.1084$), indicating a deficiency of heterozygotes in the population as a whole. Populations of *M. rufiventris* from Cerrado areas also presented an extremely high differentiation among sub-populations ($F_{ST} = 0.3870$) (Table III).

DISCUSSION

The results obtained in the present investigation indicate that genetic variability is low in *M. rufiventris*. The proportion of polymorphic loci (5.88%) is significantly lower than the values (around 50%) usually found for invertebrates (Fergusson, 1980). The mean expected heterozygosity (0.73%) for the colonies reported here is also extremely lower than the value estimated for 263 insect species (10.7%) (Lima, 1989) and for 172 Hymenopteran species (3.6%) (Packer and Owen, 1992) and demonstrates the high fixation of alleles in populations of *M. rufiventris*.

Various authors have demonstrated reduced genetic variability in Hymenoptera when compared with diploid organisms (Snyder, 1974, Metcalf *et al.*, 1975, Pamilo *et al.*, 1978; Berkelhamer, 1983) and several hypotheses have been proposed. These are based upon either the sex determining

system of the Hymenoptera that eliminates exposed deleterious alleles in haploid males (Graur, 1985) and promote a reduction of effective population size (Crozier, 1976; Pamilo, 1978; Packer and Owen, 2001) or in the behavioral/ecological consequences of social life, that include buffered life conditions of colonies and a further reduction in effective population size of most of the studied species.

Another factor that can be influencing this low value is that populations of *M. rufiventris* have decreased considerably lately, till the point that *M. rufiventris* is now being considered an endangered species in Minas Gerais (Brazil) (Campos, 1998). As small populations are more susceptible to inbreeding, this could reduce genetic variability in these populations. Packer and Owen (2001) showed that endangered species of some species of Lepidoptera have significant lower levels of heterozygosity when compared with non-endangered species of the same order.

Two factors, however, can affect heterozygosity estimates (Singh and Rhomberg, 1987). First, genes encoding enzymes and other proteins with different functions have variable levels of heterozygosity and, second, representation of such enzymes in the sampled loci in different organism is equally variable, i. e., some loci can be monomorphic in a species, while in others it can be extremely polymorphic. So, the amount of genetic variability that could be assessed depends on the analysed systems. Nevertheless, the 9 analysed enzymatic systems in the present study are among the most highly variable enzyme systems in Hymenoptera (Packer and Owen, 1992) and still only two loci were polymorphic: *Mdh-1* and *Est-4*.

In stingless bees, the level of heterozygosity for MDH is high. An estimate of intralocus heterozygosity for MDH in populations of *M. rufiventris* from Cerrado was 0.1091. Data obtained by other authors agree with ours. Contel (1980) reported values of heterozygosity for MDH of 0.17 and 0.075 for *Partamona* sp. and *Scaura latitarsis*, respectively, and the estimate of intralocus heterozygosity for MDH was 0.10 for 10 stingless bees' species (Falcão and Contel, 1991).

The EST system, another highly polymorphic system among stingless bees, also presented a high value of intralocus heterozygosity (0.1307) in

populations of *M. rufiventris* from Forest areas. In colonies from Cerrado areas, however, EST system was monomorphic.

The presence of different polymorphic loci in colonies from Forest regions (*Est-4*) and Cerrado areas (*Mdh-1*), added to the presence of different fixed alleles at six biochemical loci (*Est-1, 2, 3, 4, Pep-1* and *Mdh-1*) between these two populations and the detection of HBDH system only in colonies from Forest region areas suggest a differentiation among the colonies of these two areas (Costa *et al.*, unpublished data).

The high F_{ST} values found for sub-populations from Forest and Cerrado implies that the genetic divergence among sub-populations of *M. rufiventris* is very great. For example, of the total genetic variation found in the sub-populations from Cerrado areas, 0.3870 is due to differences in allele frequencies among sub-populations, which implies that 61.3% of the total genetic variation is found within sub-populations.

Therefore as F_{ST} is influenced by the effective sub-populations size, and by other factors, including natural selection, these results should be viewed with caution due to the limited size of the sample (number of colonies) analysed in the present study and the fact that stingless bees' queen has a highly developed abdomen that prohibits flight thus difficulting migration between sub-populations.

In conclusion, the genetic data obtained in the present study suggest that heterozygosity is lower in *M. rufiventris* than in typical species of eusocial Hymenoptera and that, at biochemical level, this species exhibits a great genetic differentiation among sub-populations. It will be of interest to determine if the phenomenon of low gene diversity in *M. rufiventris* is confined to loci encoding soluble proteins or whether it is a genomic-wide phenomenon. Clearly, a better understanding of the genetics of this species could be helpful for evaluation of the genetic status of *M. rufiventris* population's in Minas Gerais and consequently for the preservation of this and other species of stingless bees.

Acknowledgements: The authors are grateful to PROBIO, BIRD/GEF, MMA and CNPq for the financial support given to the subproject "Elaboração de plano de manejo para uruçú amarela (*Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836)" and to the *Melipona* keepers that provided the samples for analyses.

Figure 1. Electrophoretic pattern of Esterase 4 in *Melipona rufiventris* on 14% starch gel, revealed by α -naphthyl acetate. Samples 1-5: adult workers from Atlantic forest; samples 6-10: adult workers from Cerrado. The arrow indicates the direction of migration.

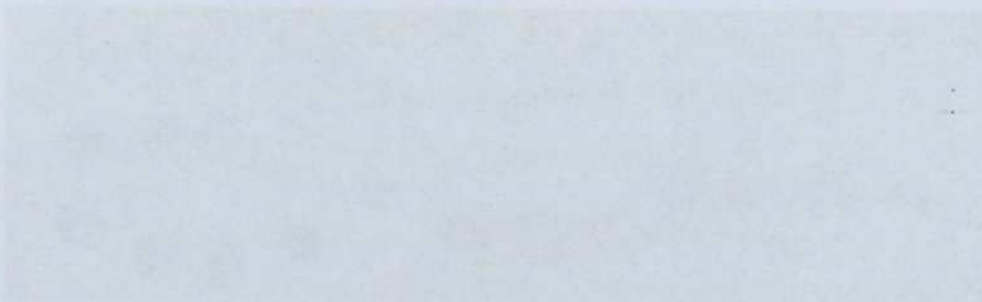


Figure 2. Electrophoretic pattern of Malate Dehydrogenase-1 in *Melipona rufiventris* from Cerrado areas on 14% starch gel. Samples 1, 2, 11 and 12: homogeneous individuals for MDH-1; samples 3-4, 9-8: nonhomogeneous individuals for MDH-1; samples 5 and 10: heterozygous individuals. The arrow indicates the direction of migration.

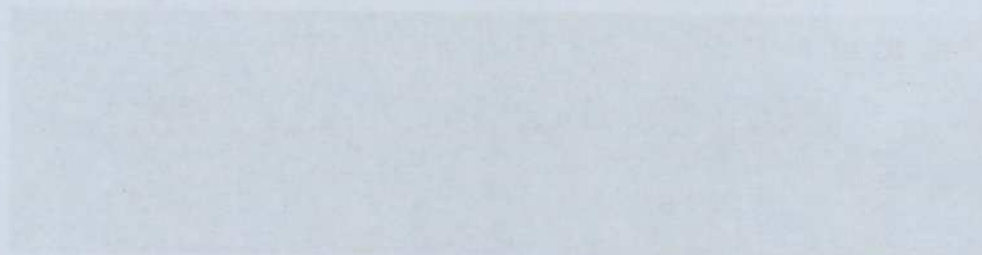


Figure 3. Electrophoretic pattern of Pepsinase 1 in *Melipona rufiventris* on 14% starch gel. Samples 1-5: adult workers from Atlantic Forest; samples 11-18: adult workers from Cerrado; samples 9-10, 19-21: adult workers from Cerrado. The arrow indicates the direction of migration.

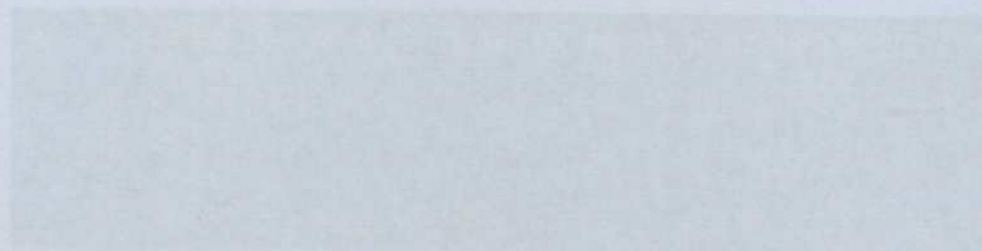


Figure 4. Electrophoretic pattern of 2 - ICH in *Melipona rufiventris* on 14% starch gel. Samples 1-5: adult workers from Atlantic forest; samples 16-20: adult workers from Cerrado. The arrow indicates the direction of migration.

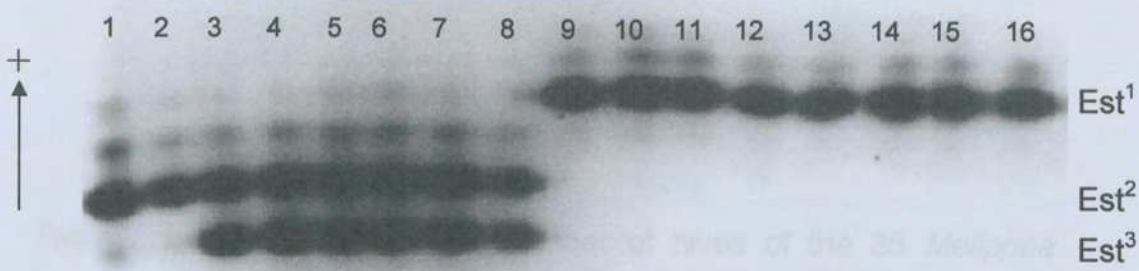


Figure 1. Electrophoretic pattern of Esterase 4 in *Melipona rufiventris* on 14% starch gel, revealed by α -naphthil acetate. Samples 1-8: adult workers from Atlantic forest; samples 9-16: adult workers from Cerrado. The arrow indicates the direction of migration.

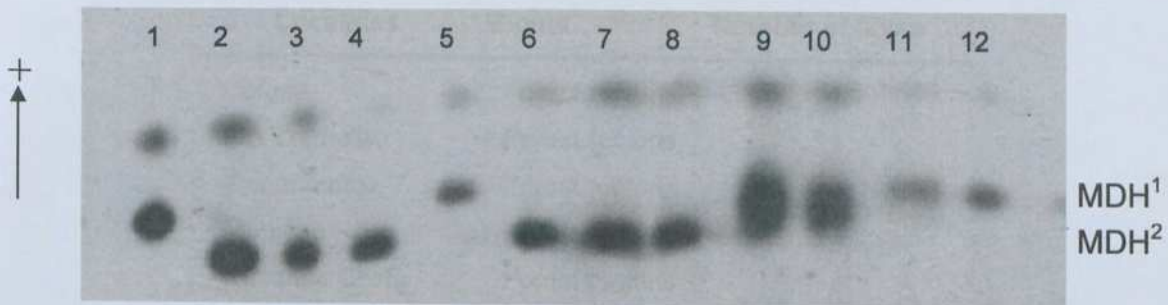


Figure 2. Electrophoretic pattern of Malate Dehydrogenase-1 in *Melipona rufiventris* from Cerrado areas on 14% starch gel. Samples 1, 5, 11 and 12: homozygous individuals for *Mdh-1*¹; samples 2-4, 6-8: homozygous individuals for *Mdh-1*²; samples 9 and 10: heterozygous individuals. The arrow indicates the direction of migration.

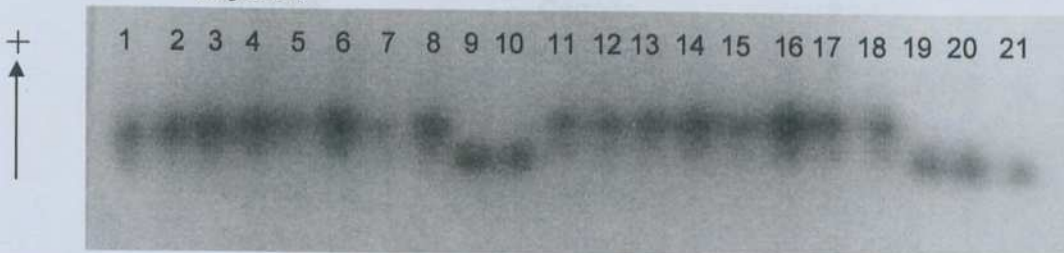


Figure 3. Electrophoretic pattern of Peptidase-1 in *Melipona rufiventris* on 14% starch gel. Samples 1-8: adult workers from Atlantic Forest; samples 11-18: adult workers from Brasília; samples 9-10, 19-21: adult workers from Cerrado. The arrow indicates the direction of migration.

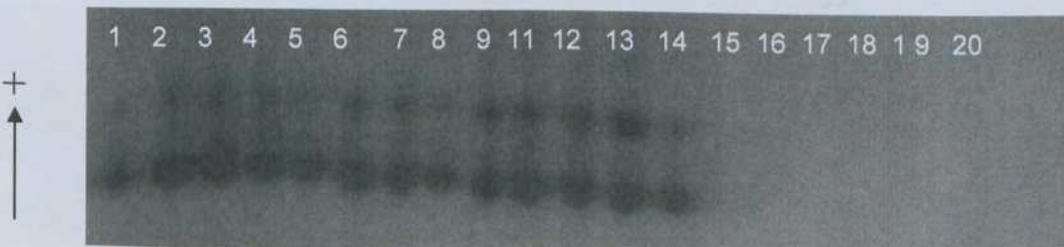


Figure 4. Electrophoretic pattern of β - HBDH in *Melipona rufiventris* on 14% starch gel. Samples 1-14: adult workers from Atlantic forest; samples 15-20: adult workers from Cerrado. The arrow indicates the direction of migration.

Table II. Allele frequencies, χ^2 , observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities for 17 enzyme loci analyzed in *M. rufiventris* populations from Cerrado and Forest regions.

Locus	Allele	Forest regions	χ^2	Cerrado	χ^2
Col-1		1.0000		1.0000	
Col-2		1.0000		1.0000	
Col-3		1.0000		1.0000	
Col-4		1.0000		1.0000	
Col-5		1.0000		1.0000	
Col-6		1.0000		1.0000	
Col-7		1.0000		1.0000	
Col-8		1.0000		1.0000	
Col-9		1.0000		1.0000	
Col-10		1.0000		1.0000	
Col-11		1.0000		1.0000	
Col-12		1.0000		1.0000	
Col-13		1.0000		1.0000	
Col-14		1.0000		1.0000	
Col-15		1.0000		1.0000	
Col-16		1.0000		1.0000	
Col-17		1.0000		1.0000	
H_o		0.0083 ± 0.0341		0.0081 ± 0.0344	
H_e		0.0078 ± 0.0320		0.0068 ± 0.0273	

Table I. Localities, bioma and number of hives of the 35 *Melipona rufiventris* colonies analyzed.

Localities	Bioma	Number of hives
Coluna	Forest regions	1
Rio Vermelho	Forest regions	1
Itamarandiba	Forest regions	1
Marliéria	Forest regions	1
Resende Costa	Forest regions	4
Subtotal		8
Arcos	Cerrado	4
Forniga	Cerrado	2
Córrego Dantas	Cerrado	2
Uberaba	Cerrado	2
Patos de Minas	Cerrado	5
Guimarânia	Cerrado	10
Patrocínio	Cerrado	2
Subtotal		27
Total		35

Table II. Allele frequencies, χ^2 , observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities for 17 enzyme loci analyzed in *M. rufiventris* populations from Cerrado and Forest regions.

Locus	Allele	Forest regions	χ^2	Cerrado	χ^2
<i>Pgm-1</i>	1	1.0000		1.0000	
<i>Gpi-1</i>	1	1.0000		1.0000	
<i>Icd-1</i>	1	1.0000		1.0000	
<i>Hk-1</i>	1	1.0000		1.0000	
<i>Gpdh-1</i>	1	1.0000		1.0000	
<i>Gpdh-2</i>	1	1.0000		1.0000	
<i>Pep-1</i>	1	-		1.0000	
	2	1.0000		-	
<i>Hbdh-1</i>	1	1.0000		-	
<i>Mdh-1</i>	1	1.0000		0.0579	
	2	-		0.9421	2.74*
<i>Mdh-2</i>	1	1.0000		1.0000	
<i>Est-1</i>	1			1.0000	
	2	1.0000		-	
<i>Est-2</i>	1	-		1.0000	
	2	1.0000		-	
<i>Est-3</i>	1	-		1.0000	
	2	1.0000		-	
<i>Est-4</i>	1	-		1.0000	
	2	0.9297		-	
	3	0.0703	0.32	-	
<i>Est-5</i>	1	1.0000		1.0000	
<i>Est-6</i>	1	1.0000		1.0000	
<i>Est-7</i>	1	1.0000		1.0000	
H_o		0.0083 \pm 0.0341		0.0061 \pm 0.0243	
H_e		0.0078 \pm 0.0320		0.0068 \pm 0.0273	

*P < 0.05

REFERENCES

- Barthelmer, R. C. (1983). Intraspecific genetic variation and haplodiploidy, eusociality, and polygyny in the Hymenoptera. *Evolution*, 37: 540 - 545.
- Campos, L. A. O. (1988). *Melipona rufiventris* Lepelletier, 1836. In: Machado, L. A. B. M.; G. A. B. Fonseca; R. B. Machado; L. M. S. Aguiar; L. V. Lima (ed.). *Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna Brasileira*. São Paulo: FAPESP, 1988, p. 1-10.
- Corral, L. P. (1980). Variabilidade protéica em populações naturais de abelhas da Amazônia. Private Docent Thesis, FMRP, USP.
- Corral, L. P. (1979). Características genéticas e propriedades de efeito de seleção natural em populações de abelhas da Amazônia. M.Sc. Thesis, FMRP, USP.
- Corral, L. P. (1980). Experimental Systematics and Evolution. *Biologia*, Glasgow, 10: 1-10.
- Graul, D. (1965). Gene diversity in Hymenoptera. *Evolution*, 39 (1): 100-98.
- Harris, H. and Hopkinson, D. A. (1976). *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. Amsterdam, North-Holland Biomedical Press, n.p. (Suppl.).
- Lavene, H. (1940). On a matching problem in genetics. *Ann Math Stat* 20: 81-84.
- Uma, L. M. K. S. (1989). Variabilidade protéica em populações naturais de *Spodoptera rugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, São Paulo.

Table III. Estimates of F statistics for 35 *Melipona rufiventris* colonies for the two polymorphic loci.

Region	<i>Mdh-1</i>			<i>Est-4</i>				
	n	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	n	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
Forest regions		****	****	0.0000	128	-0.3981	-0.0756	0.2306
Cerrado	432	-0.4545	0.1084	0.3870		****	****	0.0000
Mean	432	-0.4545	0.1084	0.3870	128	-0.3981	-0.0756	0.2306

n = sample size

REFERENCES

- Berkelhamer, R. C. (1983). Intraspecific genetic variation and haplodiploidy, eusociality, and polygyny in the Hymenoptera. *Evolution*; **37**: 540 – 545.
- Campos, L. A. O. (1998). *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836. In: Machado, A. B. M.; G. A. B. Fonseca; R. B. Machado; L. M. S. Aguiar; L. V. Lins (ed.). *Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna de Minas Gerais*. Belo Horizonte, Biodiversitas. Pp. 560-561.
- Contel, E. P. B. (1980). Variabilidade protéica em populações naturais de abelhas da Amazônia. Private Docent Thesis, FMRP, USP.
- Crozier, R. H. (1976). Counter-intuitive property of effective population size. *Nature*, **262**: 384.
- Falcão, T. M. M. A & Contel, E. P. B. (1991). Genetic variability in natural populations of Brazilian social bees: II. Electrophoretic data for PGM and MDH give evidence for multiple fertilizations in stingless bees. *Revista Brasileira de Genética*, **14** (1): 47-59.
- Ferguson, A. (1980). *Biochemical Systematics and Evolution*. Blackie, Glasgow.
- Graur, D. (1985). Gene diversity in Hymenoptera. *Evolution*, **39** (1): 190– 99.
- Harris, H. and Hopkinson, D. A. (1978). *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. Amsterdam, North-Holland Biomedical Press, n.p. (Suppl.).
- Levene, H. (1949). On a matching problem in genetics. *Ann Math Stat* **20**: 91-94.
- Lima, L. M. K. S. (1989). Variabilidade protéica em populações naturais de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, São Paulo.

- Machado, M. F. P. S. and Contel, E. P. B. (1991). Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G-3-PDH; EC 1.1.1.8) Variation in Brazilian stingless bees and in wasp species. *Biochemical Genetics*, **29**: 255-260.
- Metcalf, R. L., Marlin, J. C. and Whitt, G. S. 1975. Low levels of genetic heterozygosity in Hymenoptera. *Nature*, **257**: 792 – 794.
- Moure, J. S. and Kerr, W. E. (1950). Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymen. – Apoidea). *Dusenian*, **1** (2): 105-129.
- Moure, J. S. (1975). Notas sobre as espécies de *Melipona* descritas por Lepeletier em 1836 (Hymenoptera: Apidae). *Revista Brasileira de Biologia*, **35**(4): 615-623.
- Moure, J. S. (1992). *Milikerria* e *Eomelipona*, dois subgêneros novos em *Melipona* Illiger, 1896. (Hymenoptera – Apidae). *Naturalia, Anais do "Encontro Brasileiro sobre Biologia de Abelhas e outros Insetos Sociais"*. Rio Claro, 14-18 de setembro de 1992, 32-38.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *Am. Nat.* **106**:282-292.
- Packer, L., and R. E. Owen. (1992). Variable enzyme systems in the Hymenoptera. *Biochemical Systematics and Ecology* **20**:1-7.
- Packer, L. and R. Owen (2001). Population genetic aspects of pollinator decline. *Conservation Ecology* **5**(1): 4. [online] URL: <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art4>
- Pamilo, P., Varvio-Aho, S. L. and Pekkarinen, A. (1978). Low enzyme gene variability in Hymenoptera as a consequence of haplodiploidy. *Hereditas*, **88**: 93–99.
- Singh, R. S., and Rhomberg, L. R. (1987). A comprehensive study of genic variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **115**:313-322.

Snyder, T. P. (1974). Lack of allozymic variability in three bee species. *Evolution*, **28**: 687-689.

Vasconcelos, S. M. (1998). Divergência genética entre populações de *Melipona rufiventris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, UFU*. 42p.

Wright, S. (1978). *Variability within and among natural populations*. Vol. 4. The University of Chicago Press, Chicago.

Yeh, F.C.; Yang, R. and Boyle, T. (1999). *POPGENE version 1.31: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis*. Quick User Guide.

Ronaldo Guimarães Costa & Mara Garcia Tavares

Universidade Federal de Viçosa - UFV

Departamento de Biologia Geral

Av. Ph. Rolfs, s/n - Campus

CEP: 36.571-000 - Viçosa, Minas Gerais, Brasil

ABSTRACT

The genus *Melipona* comprises one of the most important groups of pollinators of Angiosperms in Brazil. Populations of *Melipona rufiventris*, however, are becoming rare in Minas Gerais due to the human action, mainly

GENETIC VARIABILITY AND RELATEDNESS AMONG POPULATIONS OF *Melipona rufiventris* (HYMENOPTERA: APIDAE, MELIPONINAE)

populations located in two biomes of Minas Gerais (Cerrado and Forest regions) and the evaluation of the taxonomic status of this species. Samples of 38 colonies were collected from 13 localities and evaluated by 9 enzymatic systems, which yielded 17 loci. Only *Est-1* was polymorphic in colonies from Forest regions and *Mbr-1* in colonies from Cerrado. The enzymes Isocitrate Dehydrogenase (IDH), α -Glycerophosphate Dehydrogenase (α -GPDH), Glucose-phosphate isomerase (GPI), α -Phosphoglucuronase (PGM), Hexokinase (HK), Peptidase-A (PEP-A) and β -hydroxybutyrate

Ronaldo Guimarães Costa & Mara Garcia Tavares

Universidade Federal de Viçosa -UFV

Departamento de Biologia Geral

Av. Ph Rolfs, s/n – Campus

CEP: 36 571 000 – Viçosa, Minas Gerais, Brasil

Cerrado regions.

Key words: Hymenoptera, *Melipona rufiventris*, isoenzymes, genetic variability, cryptic species.

ABSTRACT

The genus *Melipona* comprises one of the most important groups of pollinators of Angiosperms in Brazil. Populations of *Melipona rufiventris*, however, are becoming rare in Minas Gerais due to the human action, mainly due to deforestation and predatory honey collection. Morphological variations have been related to this species, which may suggest that the name *M. rufiventris*, in fact, refers to a group of cryptic species. Thus, in the present study, we performed an enzymatic characterisation of *M. rufiventris* populations located in two biomas of Minas Gerais (Cerrado and Forest regions) and the evaluation of the taxonomic status of this species. Samples of 39 colonies were collected from 13 localities and evaluated by 9 enzymatic systems, which yielded 17 loci. Only *Est-4* was polymorphic in colonies from Forest regions and *Mdh-1* in colonies from Cerrado. The enzymes Isocitrate Dehydrogenase (ICD), α -Glicerophosphate Dehydrogenase (α -GPDH), Glucose-phosphate Isomerase (GPI), Phosphoglucomutase (PGM), Hexoquinase (HK), Peptidase-A (PEP-A) and β -hydroxybutyrate dehydrogenase (β -HBDH); however, PEP-A and β -HBDH revealed different enzyme expression patterns between populations from Forest and Cerrado regions. These enzymatic data suggest that populations from Forest regions and Cerrado have accumulated some unique polymorphisms, which make them different. The recorded high value for the fixation index ($F_{ST} = 0.9539$) found when all colonies were considered together and the genetic distances observed between populations from Forest and Cerrado regions (ranging from 0.4739 to 0.5003), reinforce the genetic differentiation among sub-populations. In the dendrogram, colonies from Forest regions and Brasilândia, were combined as a single cluster, separated from Cerrado colonies. These data may suggest the existence of, at least, two "forms" of *M. rufiventris* or even two different species: one in Forest and the other in Cerrado regions.

Key words: Hymenoptera, *Melipona rufiventris*, isoenzymes, genetic variability, cryptic species.

INTRODUCTION

The genus *Melipona* comprises one of the most important groups of pollinators of Angiosperms in Brazil (Kerr *et al.*, 1996). There are currently over forty described species of *Melipona* (Michener, 1979; Camargo, 1979). These species have a geographic distribution restrict to Neotropics, including South America, Central America and Caribbean islands (Kerr, 1969; Camargo *et al.*, 1988; Michener, 1990).

Originally with a great distribution in Minas Gerais (MG) state, both in Cerrado and in Atlantic Forest, populations of *Melipona rufiventris* are becoming rare due to the human action, mainly due to deforestation and predatory honey collection. Therefore this species was included in the endangered species' list of MG (Campos, 1998).

Of the five subspecies related by Moure and Kerr (1950), *M. rufiventris rufiventris* is the unique recorded in MG. Morphological variations, however, have been related to this subspecies (Moure, 1975) which lead Moure (1992) to suggest that there is much to be done to the knowledge of the different "forms" attributed to this species, since their taxonomy is based primarily on morphologic characters. According to Moure (1992), it is possible that the name *M. rufiventris* is being used to a group of cryptic species.

Biochemical research involving a different number of enzymatic systems in Hymenoptera has contributed with useful information about the relationships of different species. Halliday (1975; 1979; 1981) described enzyme variation in cryptic species of ants (*Iridomyrmex purpureus* group). Enzymatic data were analysed by Nozawa and Itô (1989) to establish the phylogenetic relationships among nine wasps of Vespinae from Japan. Using cladistic data analyses from 26 enzymatic loci, Packer (1991) inferred about the phylogeny of eight species of *Evylaeus* genera (Halictidae). A similar analysis was done by Richards (1994) to study the evolution of social behaviour in *Halictus*. Melo (1993) described what he suggested to be several sibling species of *Microstigmus* genus (Hymenoptera, Sphecidae) through enzyme data.

The widespread occurrence of *M. rufiventris rufiventris* in Minas Gerais – Brazil and the endangered status of this species led us to perform an enzymatic characterization of *M. rufiventris* populations located in different biomas of Minas Gerais and the evaluation of the taxonomic status of this species.

MATERIAL AND METHODS

Population sampling

Melipona rufiventris adult workers were obtained from 39 colonies in 13 localities of Minas Gerais: eight of them in areas of Cerrado (31 colonies) and five in Forest regions (8 colonies) (Figure 1). Eight workers from each hive were stored at – 80°C and analysed later.

Alloenzyme electrophoresis

Standard horizontal starch gels (14%) electrophoresis procedures were used (Harris and Hopkinson, 1978). The following enzyme systems were assayed: hexokinase (E.C.2.7.1.1, HK), glucose phosphate isomerase (E.C.5.3.1.9, GPI), esterase (E.C.3.1.1.1, EST), aminopeptidase A (E.C.3.4.11, PEP-A), hydroxybutyrate dehydrogenase (E.C.1.1.1.30, HBDH), isocitrate dehydrogenase (E.C.1.1.1.42, ICD), malate dehydrogenase (E.C.1.1.1.37, MDH), phosphoglucomutase (E.C.2.7.5.1, PGM) and α -glycerophosphate dehydrogenase (E.C.1.1.1.8, GPD).

Data analysis

The population gene diversity was assessed by estimating allele frequencies and *F*-statistics of Wright (Wright, 1978) from isoenzyme dataset. Genetic distances (GD) between populations were calculated using Nei's genetic distance estimates (Nei, 1972). The GD matrix was submitted to cluster analysis, following the UPGMA algorithm, and to Multidimensional Scaling analysis (MDS) algorithm. To evaluate how well the GD matrix was

reproduced on biplot and scatterplot 3D of MDS it was used the goodness-of-fit stress. The smaller the stress value, the better is the fit. Both analyses and algorithms were described by Dias (1998). All analyses were performed by using the POPGENE version 1.32 (Yeh *et al.*, 1999) and STATISTICA (1987) computer programs.



Figure 1. Geographic location of the 13 localities of Minas Gerais where samples of *Melipona rufiventris* were collected and the predominant vegetation type of each locality. COL = Coluna (1), RVE = Rio Vermelho (1), ITA = Itamarandiba (1), MAR = Marliéria (1), RES = Resende Costa (4), ARC = Arcos (4), FOR = Formiga (2), COR = Cônego Dantas (2), UBE = Uberaba (2), PAT = Patrocínio (2), GUI = Guimarães (10), PMI = Picos de Minas (5) and BRA = Brasília (4). The number of hives sampled in each locality is given in parentheses.

RESULTS

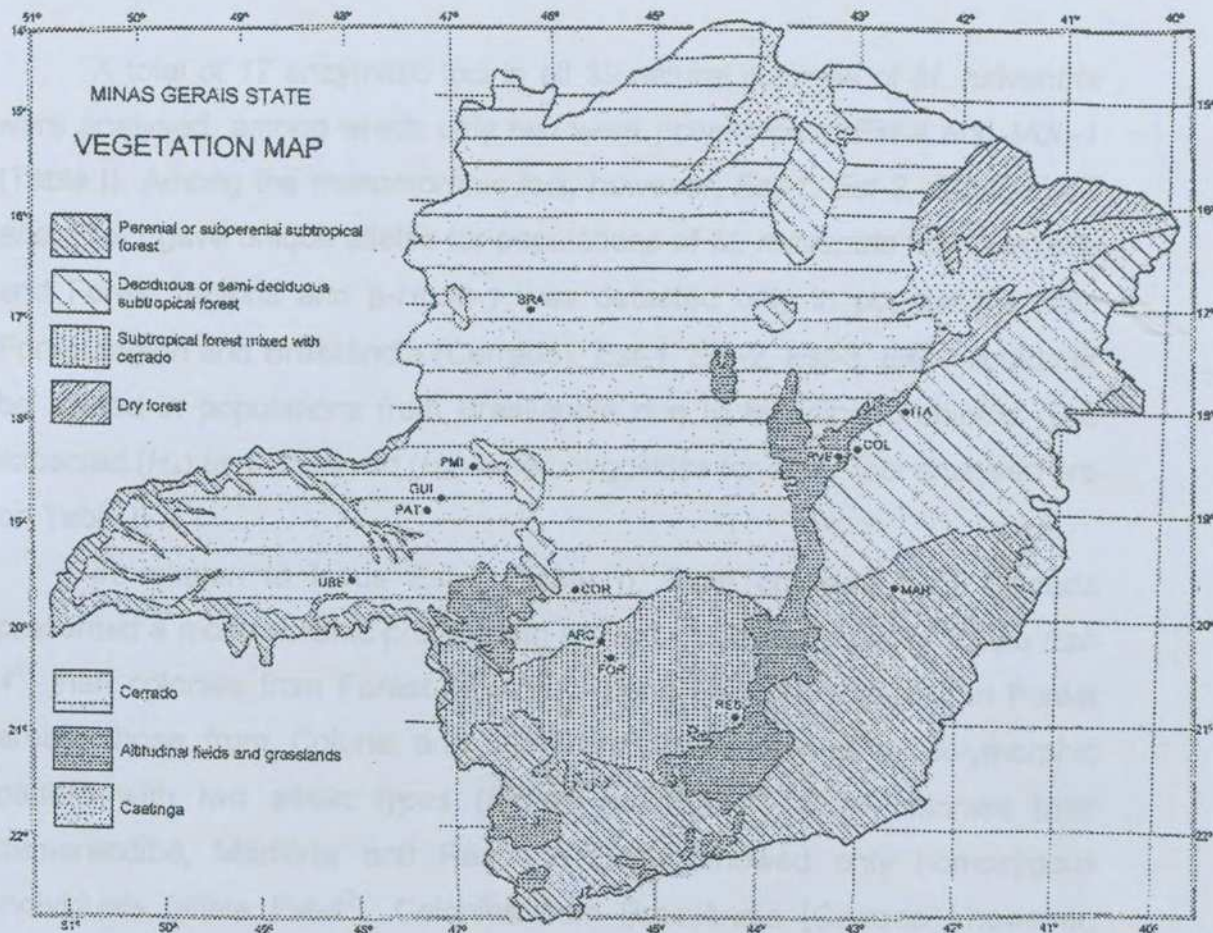


Figure 1. Geographic location of the 13 localities of Minas Gerais where samples of *Melipona rufiventris* were collected and the predominant vegetation type of each locality. COL = Coluna (1), RVE = Rio Vermelho (1), ITA = Itamamarandiba (1), MAR = Marliéria (1), RES = Resende Costa (4), ARC = Arcos (4), FOR = Formiga (2), COR = Córrego Dantas (2), UBE = Uberaba (2), PAT = Patrocínio (2), GUI = Guimarânia (10), PMI = Patos de Minas (5) and BRA = Brasilândia (4). The number of hives sampled in each locality is given in parentheses.

RESULTS

A total of 17 enzymatic loci in all 39 natural colonies of *M. rufiventris* were analysed, among which only two were polymorphic: *Est-4* and *Mdh-1* (Table I). Among the monomorphic loci, however, *Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Est-7* and *Pep-1* gave unique alleles for populations of *M. rufiventris* from Cerrado and Forest regions and β -*Hbdh-1* was detected only in populations from Forest region and Brasilândia (Cerrado). *Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Est-7* could not be scored in populations from Brasilândia due to technical problems. The expected (H_e) and observed (H_o) heterozygosities for all 17 loci analysed are on Table II.

In relation to locus *Est-4* (Table I), most colonies from Cerrado presented a monomorphic profile, with a band of greater mobility (allele *Est-4*¹) than colonies from Forest regions. Among colonies collected in Forest areas, those from Coluna and Rio Vermelho presented a polymorphic pattern with two allelic types (*Est-4*² and *Est-4*³) while colonies from Itamarandiba, Marliéria and Resende Costa showed only homozygous individuals (allele *Est-4*²). Colonies from Brasilândia (Cerrado), however, exhibited in *Est-4* locus, an intermediary polymorphic profile between colonies from Cerrado and Forest regions (Figure 2).

Malate dehydrogenase (*Mdh-1*) results also showed different patterns of mobility when colonies sampled in Cerrado and Forest regions were compared (Table II). Colonies from Forest regions presented a monomorphic profile, with a faster activity band (*Mdh-1*¹) when compared with those monomorphic colonies from Cerrado (alleles *Mdh-1*²). However, some colonies from three neighbour cities located in areas characteristic of subtropical Forest mixed with Cerrado (Formiga and Arcos) and typical Cerrado (Córrego Dantas) presented polymorphic patterns for *Mdh-1* (*Mdh-1*¹/*Mdh-1*²). Colonies from Brasilândia (Cerrado) showed a *Mdh-1* profile similar to colonies from Forest regions.

The data obtained allowed an analysis of the population structure. *F* statistics for the polymorphic loci for all colonies considered together are presented in Table III. F_{ST} which is the correlation between two gametes

drawn at random from each subpopulation, indicates the extent of genetic differentiation among the subpopulations (Yeh, 2000). The value is dramatically high for the analysed loci in *M. rufiventris*. Of the total genetic diversity, 95.39% was due to differences among sub-populations.

Estimates of genetic distances between colonies of *M. rufiventris* from the same vegetation type were low, with a maximum value of 0.0058 and 0.0250 for Forest regions and Cerrado populations, respectively. Greater genetic distances, ranging from 0.4739 to 0.5003 were estimated between these two populations (Forest and Cerrado). When colonies from Forest regions and Brasilândia were compared, relatively high genetic distances (0.3179 to 0.3736) were revealed, as well as comparisons between colonies from Cerrado and Brasilândia (0.4278 to 0.5989).

In fact, in the dendrogram (Figure 3), colonies from Forest regions and Brasilândia, were combined as a single cluster, separated from Cerrado colonies. In biplot and scatterplot 3D of MDS (Figures 4 and 5, respectively), where each colony may seem like one point, it was possible to verify those colonies which presented nonzero distances from each other, such as 38, 37, 9, 16, 1 and 2. Due to the addition of a third dimension (Figure 5), the colonies 1 and 2, for instance, could be differentiated in the scatterplot 3D. In both figures, however, the other colonies form an undifferentiated cloud of points due to distances zero in regard to each other.

DISCUSSION

The present study provides information regarding the interrelationships of populations of *Melipona rufiventris* from Forest regions and Cerrado.

The expected heterozygosity among all 39 colonies of *M. rufiventris* was 0.140 and an average of six polymorphic loci was observed among these colonies (*Pep-1*, *Mdh-1*, *Est-1*, 2, 3 and 4), yielding a percentage of 35.29% of polymorphic loci. These values are much higher than those found in many other species of Hymenoptera and suggest that populations from Forest regions and Cerrado, although with a low heterozygosity (Costa *et al.*,

unpublished data) have nevertheless accumulated some unique polymorphisms which make them different.

Except for colonies of Brasilândia, all colonies from Cerrado were grouped together in a major cluster of the dendrogram, opposite to the cluster that contains colonies from Forest regions. Still, all colonies from Brasilândia were grouped together in the dendrogram and were closer to colonies of Forest regions than to colonies from Cerrado.

This dendrogram clearly permitted the differentiation between populations from Forest region and Cerrado and may suggest the existence of, at least, two "forms" of *M. rufiventris* in Minas Gerais. This result can be reinforced by the high value of F_{ST} (0.9539) observed among subpopulations. According to Wright (1978) values of F_{ST} above of 0.25 indicates a very high genetic differentiation. So, a value of 0.9539 supports well the existence of two "forms" of *M. rufiventris* in Minas Gerais.

The genetic identity among colonies from the two areas, however, was very high, ranging from 0.6063 to 0.6226. This high genetic identity may resulted, among other characteristics, by the existence of several enzymatic systems, like PGM, GPI, HK and α -GPDH, that showed identical expression patterns between populations from the two regions. These results constitute a strong evidence of high relatedness level between the "forms" reported in this study. It is possible, that in the past, *M. rufiventris rufiventris* had a continuous distribution in Minas Gerais and differentiation between populations characteristic of analysed both vegetation type occurred by natural selection.

Furthermore, the dendrogram indicates a close phyletic relationship between colonies from Brasilândia and Forest regions. Although only four hives from Brasilândia were evaluated in the present study, these colonies presented a pattern of expression at *Est-4* (Fig. 2) intermediary between that found in colonies from Forest and Cerrado regions, which may indicate the occurrence of matings within the two different "forms" of *M. rufiventris* with the production of hybrid colonies. Additionally, colonies from Brasilândia presented similar enzymatic profile to colonies from Forest regions at loci *Mdh-1*, *Pep-1* and *Hbdh-1*. Unfortunately, colonies from Brasilândia could

not be scored to loci *Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Est-5*, *Est-6* and *Est-7*, which could have permitted a detailed comparison and a clear demonstration of the taxonomic status of *M. rufiventris*.

In the present study, however, samples from Brasilândia were collected in colonies maintained in a meliponary where colonies typical from Forest regions (possibly from areas of Gallery Wood that were near from rivers and streams of the region) could have been put together with colonies typical from Cerrado. Therefore, individuals originated from different regions could have mated and originated hybrid colonies.

Nascimento *et al.* (2000) have already reported, through enzyme analyses, a case of hybridization between *M. scutellaris* (from the Diamantina plateau in the state of Bahia, Brazil) and *M. capixaba* (from Domingos Martins, in the State of Espírito Santo, Brazil). These two *Melipona* species, in nature, are separated by more than 300 km of Forest but were maintained together in a meliponary located in Uberlândia-MG. The observation that these two species are capable of forming fertile hybrids led Nascimento *et al.* (2000) to suggest that, in spite of geographical separation, there were no pressure to develop a sexual isolating mechanism between them.

Alternatively, these two reported "forms" of *M. rufiventris rufiventris* may constitute two species that mate in some areas of Minas Gerais producing the hybrid form. This possibility is supported by the values of genetic distance observed among colonies from Forest regions and Cerrado, that ranged from 0.4739 to 0.5003 and are quite higher than the values reported for distinct insect species. For example, the genetic distance (D; Nei, 1972) between *Neodiprion maurus* and *N. pratti* was 0.195 (Kuenzi and Coppel, 1986) and the genetic distances (D; Nei, 1978) found by Rosenmeier and Packer (1993) between *Neodiprion pratti banksianus* and *N. maurus* was 0.125, while that between *Halictus tumulorum* and *H. confuses* ranged from 0.180 to 0.195.

In the case of *Trigona atripes* species group, Yong (1991) found genetic distances ranging from 0.27 (between *T. collina* and *T. rufibasalis*)

and 0.54 (between *T. atripes* and *T. collina*) and emphasised that these values are comparable to that reported for distinct species.

Although interlaboratory variation and different statistical methods of analysis makes comparisons difficult to interpret and the fact that genetic distances among subspecies or species of one group of organisms should not be the same among other groups of animals or plants once the speciation process occurs in distinct forms in distinct organisms, the high values of genetic distances between the two "forms" of *M. rufiventris rufiventris*, described in the present paper, supports the existence of two species of *Melipona* in Minas Gerais recognised as *M. rufiventris*.

Other differences such as the existence of a prominent clay structure constructed by this bees at the hive entrance in colonies from Forest regions and its absence in colonies originated from Cerrado and a distinct pattern of colour between populations from these two regions (Costa, personal observation) may reinforce this hypothesis. However, further investigation concerning differences at the DNA level, morphological and cytogenetic aspects, as well as behavioral differences between these two "forms" reported here may contribute to a better understanding of the natural history and taxonomic status of *M. rufiventris*. This knowledge can be an important tool to the development of conservation plans for this and other important pollinator's species.

Acknowledgements: The authors are grateful to PROBIO, BIRD/GEF, MMA and CNPq for the financial support given to the subproject "Elaboração de plano de manejo para uruçú amarela (*Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836)" and to the *Melipona* keepers that provided the samples for analyses.

Table 1. Allele frequencies for all encountered polymorphic loci in 39 *Melipona rufiventris* colonies.

Locus	Allele	Colonies*																				
		COL	RVE	ITA	MAR	RES1	RES2	RES3	RES4	ARC1	ARC2	ARC3	ARC4	FOR1	FOR2	COR1	COR2	UBE1	UBE2	PAT1	PAT2	
<i>Hbdh-1</i>	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Pep-1</i>	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Mdh-1</i>	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.313	0.125	0	0.625	0	0.125	0.375	0	0	0	0	0	0
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	0.687	0.875	1.000	0.375	1.000	0.875	0.625	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Est-1</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Est-2</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Est-3</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Est-4</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	2	0.688	0.750	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0.312	0.250	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Locus	Allele	Colonies*																				
		PAT3	PAT4	PAT5	GUI1	GUI2	GUI3	GUI4	GUI5	GUI6	GUI7	GUI8	GUI9	GUI10	PMI1	PMI2	BRA1	BRA2	BRA3	BRA4		
<i>Hbdh-1</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pep-1</i>	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mdh-1</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Est-1</i>	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Est-2</i>	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Est-3</i>	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Est-4</i>	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Samples COL, RVE, ITA, MAR, RES1, RES2, RES3 and RES4 are from Forest regions; other samples are from cerrado, being colonies BRA1, BRA2, BRA3 and BRA4 from Brasilândia.

Table III. Estimates of F -statistics of Wright for 312 adult workers from 39 *Melipona rufiventris* colonies.

Table II. Gene diversity measures for 17 loci based on 39 *Melipona rufiventris* colonies.

Locus	N	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
<i>Pgm-1</i>	624	---	---	0.0000
<i>Gpi-1</i>				0.0000
<i>Icd-1</i>				0.0000
<i>Hk-1</i>				0.0000
<i>Gpdh-1</i>				0.0000
<i>Gpdh-2</i>				0.0000
<i>Pep-1</i>				1.0000
<i>Hbdh-1</i>				0.0000
<i>Mdh-1</i>				0.9096
<i>Mdh-2</i>				0.0000
<i>Est-1</i>				1.0000
<i>Est-2</i>				1.0000
<i>Est-3</i>				1.0000
<i>Est-4</i>				0.6363
<i>Est-5</i>				1.0000
<i>Est-6</i>				1.0000
<i>Est-7</i>				1.0000
Mean				0.9539
<i>n</i> = sample size				
	Locus	H_o^*	H_e^*	
	<i>Pgm-1</i>	0.000	0.000	
	<i>Gpi-1</i>	0.000	0.000	
	<i>Icd-1</i>	0.000	0.000	
	<i>Hk-1</i>	0.000	0.000	
	<i>Gpdh-1</i>	0.000	0.000	
	<i>Gpdh-2</i>	0.000	0.000	
	<i>Pep-1</i>	0.000	0.427	
	<i>Hbdh-1</i>	0.000	0.000	
	<i>Mdh-1</i>	0.067	0.513	
	<i>Mdh-2</i>	0.000	0.000	
	<i>Est-1</i>	0.000	0.353	
	<i>Est-2</i>	0.000	0.353	
	<i>Est-3</i>	0.000	0.353	
	<i>Est-4</i>	0.103	0.391	
	<i>Est-5</i>	0.000	0.000	
	<i>Est-6</i>	0.000	0.000	
	<i>Est-7</i>	0.000	0.000	
	Mean	0.010	0.140	

Table III. Estimates of F -statistics of Wright for 312 adult workers from 39 *Melipona rufiventris* colonies.

Locus	N	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
<i>Pgm-1</i>	624	****	****	0.0000
<i>Gpi-1</i>	624	****	****	0.0000
<i>Icd-1</i>	624	****	****	0.0000
<i>Hk-1</i>	624	****	****	0.0000
<i>Gpdh-1</i>	624	****	****	0.0000
<i>Gpdh-2</i>	624	****	****	0.0000
<i>Pep-1</i>	624	****	1.0000	1.0000
<i>Hbdh-1</i>	624	****	1.0000	0.0000
<i>Mdh-1</i>	624	-0.4545	0.8686	0.9096
<i>Mdh-2</i>	624	****	****	0.0000
<i>Est-1</i>	624	****	1.0000	1.0000
<i>Est-2</i>	624	****	1.0000	1.0000
<i>Est-3</i>	624	****	1.0000	1.0000
<i>Est-4</i>	624	-0.6101	0.7370	0.8366
<i>Est-5</i>	624	****	1.0000	1.0000
<i>Est-6</i>	624	****	1.0000	1.0000
<i>Est-7</i>	624	****	1.0000	1.0000
Mean	624	-0.5446	0.9288	0.9539

n = sample size

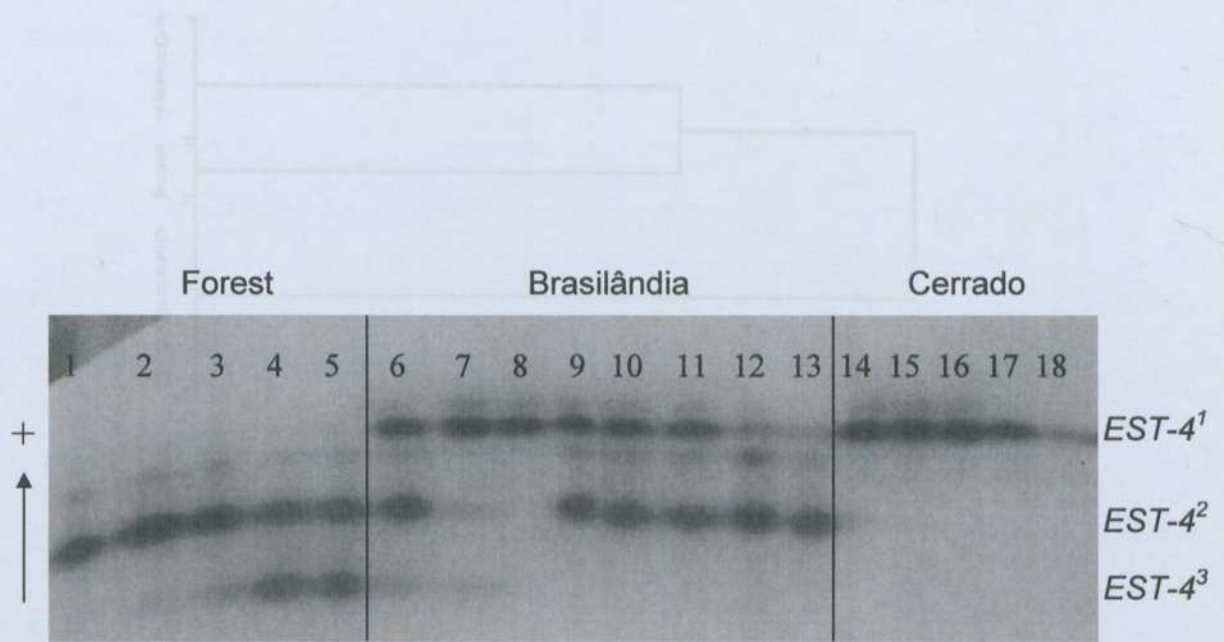


Figure 2. Enzymatic profile for *Est-4* revealed by α -naphthyl acetate in adult workers from Forest regions (1-5), adult workers from two colonies from Brasília (6-13) and adult workers from Cerrado (14-18). Note that *M. rufiventris* workers from Brasília present bands from Forest and Cerrado. 14% starch gel.

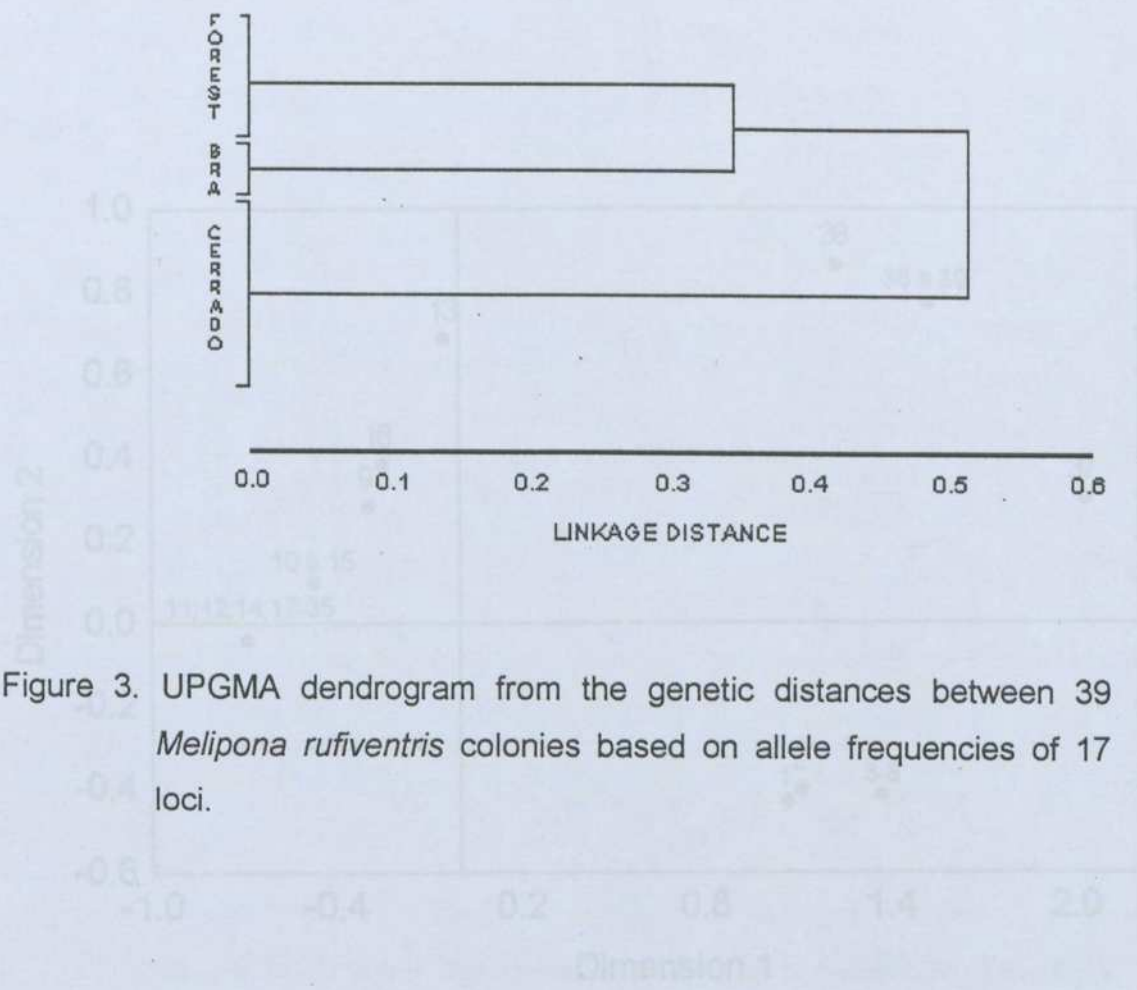


Figure 3. UPGMA dendrogram from the genetic distances between 39 *Melipona rufiventris* colonies based on allele frequencies of 17 loci.

Figure 4. Biplot of MDS from the genetic distances between 39 *Melipona rufiventris* colonies based on allele frequencies of 17 loci (stress=0.0038, after 100 iterations). Samples 1-3 are from Forest region; samples 9-39 are from Cerrado region, being samples 36-39 from Brasília.

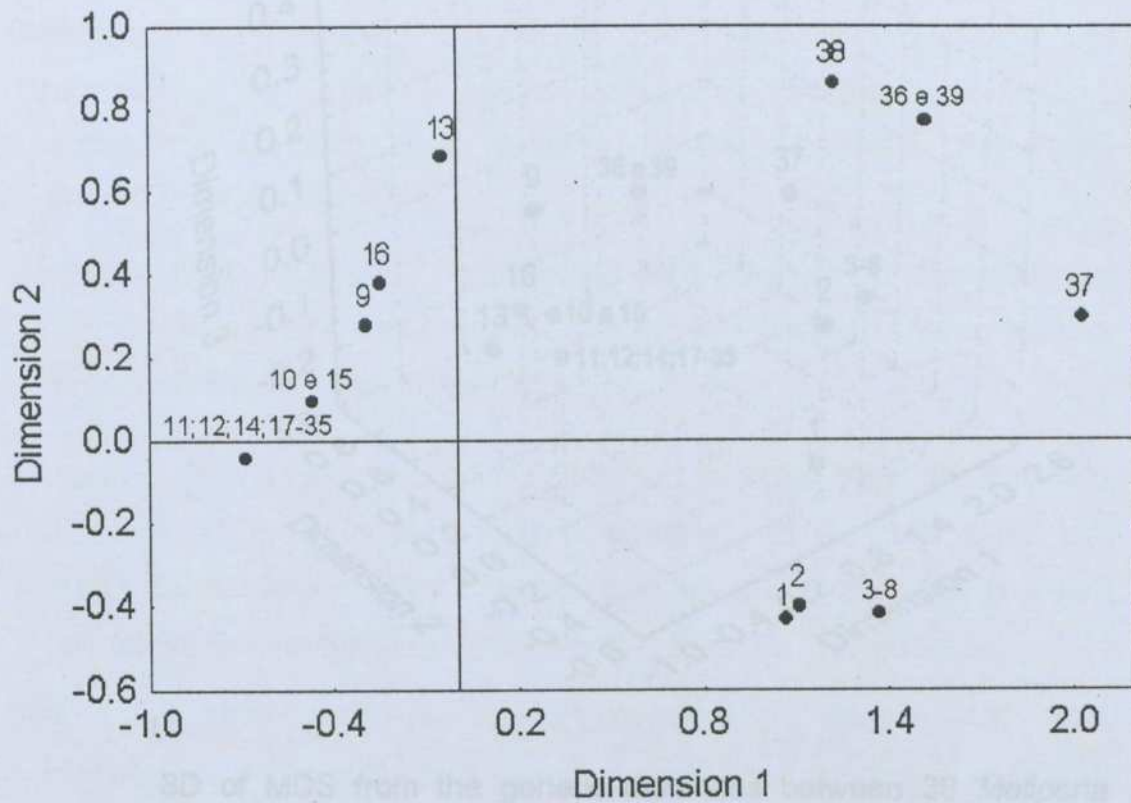
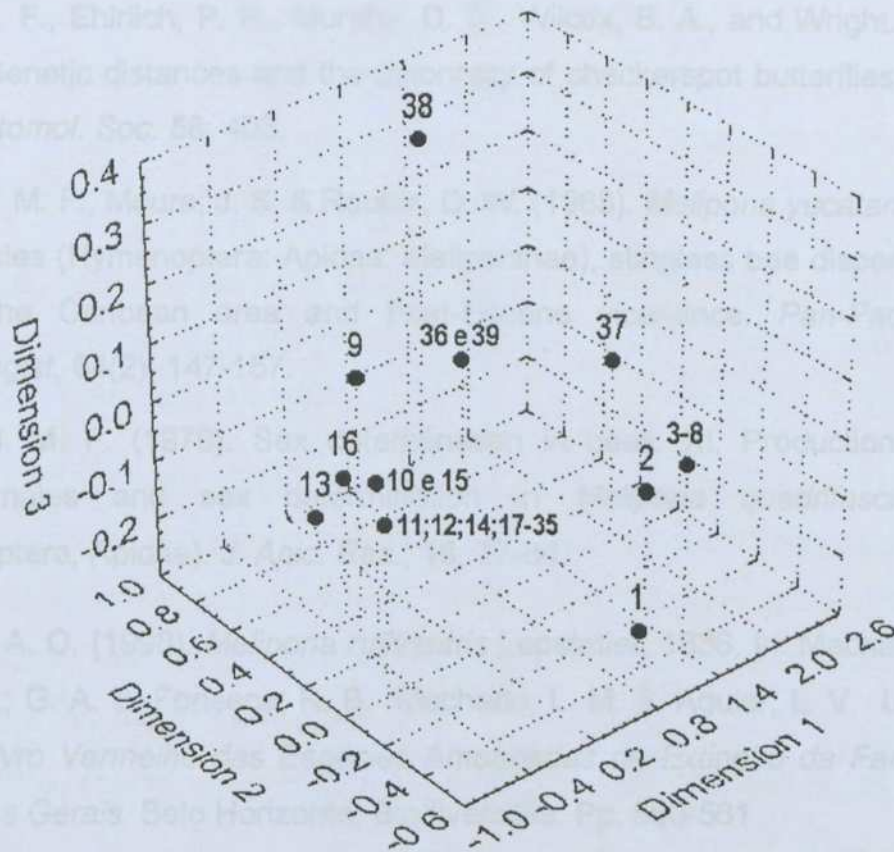


Figure 4. Biplot of MDS from the genetic distances between 39 *Melipona rufiventris* colonies based on allele frequencies of 17 loci (stress=0.0036, after 100 iterations). Samples 1-8 are from Forest regions; samples 9-39 are from Cerrado region, being samples 36-39 from Brasília.

Figure



3D of MDS from the genetic distances between 39 *Melipona rufiventris* colonies based on allele frequencies of 17 loci (stress=0.0022, after 100 iterations). Samples 1-8 are from Forest regions; samples 9-39 are from Cerrado region, being samples 36-39 from Brasilândia.

REFERENCES

- Brussard, P. F., Ehrlich, P. R., Murphy, D. D., Wilcox, B. A., and Wright, K. (1985). Genetic distances and the taxonomy of checkerspot butterflies. *J. Kans. Entomol. Soc.* **58**: 403.
- Camargo, J. M. F., Moure, J. S. & Roubik, D. W. (1988). *Melipona yucatanica* new species (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae), stingless bee dispersal across the Caribbean area and Post-Eocene vicariance. *Pan-Pacific Entomologist*, **64**(2): 147-157.
- Camargo, J. M. F. (1979). Sex determination in bees. XI. Production of diploid males and sex determination in *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). *J. Apic. Res.*, **18**: 77-84.
- Campos, L. A. O. (1998). *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836. In: Machado, A. B. M.; G. A. B. Fonseca; R. B. Machado; L. M. S. Aguiar; L. V. Lins (ed.). *Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna de Minas Gerais*. Belo Horizonte, Biodiversitas. Pp. 560-561.
- Dias, L.A.S. (1998). Análises multidimensionais. In: Alfenas, A.C. (ed.). *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Editora UFV, Viçosa. p. 405-475.
- Halliday, R. B. (1975). Electrophoretic variation of amylase in meat ants, *Iridomyrmex purpureus* and its taxonomic significance. *Aust. J. Zool.* **23**: 271-276.
- Halliday, R. B. (1979). Esterase variations at three loci in meat ants. *J. Hered.* **70**: 57-61.
- Halliday, R. B. (1981). Heterozygosity and genetic distance in sibling species of meat ants (*Iridomyrmex purpureus* group). *Evolution*, **35** (2): 234-242.
- Harris, H. and Hopkinson, D. A. (1978). *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. Amsterdam, North-Holland Biomedical Press, n.p. (Suppl.).

- Kerr, W. E. (1969). *Some aspects of the evolution of social bees (Apidae) in evolutionary biology*. Ed. T. DOBZHANSKY, M. K. HECHT & W. C. STREET. Columbia Univ. Press, New York, p. 119-175.
- Kerr, W. E., Carvalho, G. A. and Nascimento, V. A. (1996). *Abelha Uruçu. Biologia, Manejo e Conservação. Coleção Manejo da Vida Silvestre, nº. 2*. Belo Horizonte, Acangaú.
- Kuenzi, F. M. and Coppel, H. C. (1986). Isozymes of the sawfly Neodiprion and Diprion similes: Diagnostic characters and genetic distance. *Biochem. Syst. Ecol.*, **14**: 423.
- Melo, G. A. R. (1993). Relações filogenéticas entre espécies do gênero *Microstigmus* Ducke, 1907 (Hymenoptera, Sphecidae, Pemphredoninae), com base em dados isozimáticos e morfológicos. *Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Viçosa, UFV*. 103p.
- Michener, C.D. (1979). Biogeography of the bees. *Ann. Mol. Bot. Gard.*, **66**: 277-347.
- Michener, C.D. (1990). Classification of the Apidae (Hymenoptera). *Univ. Kansas Sci. Bull.*, **54**: 75-164.
- Moure, J. S. & Kerr, W. E. (1950). Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymen. – Apoidea). *Dusenya*, **1** (2): 105-129.
- Moure, J. S. (1975). Notas sobre as espécies de *Melipona* descritas por Lepeletier em 1836 (Hymenoptera: Apidae). *Revista Brasileira de Biologia*, **35**(4): 615-623.
- Moure, J. S. (1992). *Milikerria* e *Eomelipona*, dois subgêneros novos em *Melipona* Illiger, 1896. (Hymenoptera – Apidae). *Naturalia, Anais do "Encontro Brasileiro sobre Biologia de Abelhas e outros Insetos Sociais"*. Rio Claro, 14-18 de setembro de 1992, 32-38.

- Nascimento, A. V., Matusita, S. H. and Kerr, W. E. (2000). Evidence of hybridization between two species of *Melipona* bees. *Genetics and Molecular Biology*, **23** (1) 79-81.
- Nei, M. (1972). Genetic distances between populations. *American Naturalist*, **106**: 283-292.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583-590.
- Nozawa, k. and Itô, Y. (1989). Biochemical-genetic differentiation among nine species of polistine wasps from Japan. *Ins. Soc.*, **36**: 183-196.
- Packer, L. (1991). The evolution of social behavior and the nest architecture in sweat bees of the subgenus *Evyllaesus* (Hymenoptera: Halictidae): a phylogenetic approach. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **29**: 153-160.
- Richards, M.H. (1994). Social evolution in the genus *Halictus*: a phylogenetic approach. *Ins. Soc.* **41**: 315-325.
- Rosenmeier, L. and Packer, L. (1993). A comparison of genetic variation in two sibling species pairs of haplodiploid insects. *Biochemical Genetics*, **31**:185-200.
- Ross, H. H. (1955) The taxonomy and evolution of the sawfly genus *Neodiprion*. *For. Sci.* **1**: 196
- Statistica (1987). <http://www.statsoft.com/textbook>.
- Van Driel, J.W., Sluiteres, J. F. and Van Der Kaay, H. J. (1987). Allozyme variation in *Anopheles stephensi* Liston from Pakistan (Diptera: Culicidae). *Biochem. Genet.* **25**: 789-802
- Wright, S. (1978). *Variability within and among natural populations*. Vol. 4. The University of Chicago Press, Chicago.
- Yeh, F.C. (2000). Population genetics. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D. and BOYLE, T. (eds). *Forest conservation genetics: principles and practice*. CSIRO/CABI, Australia. p. 21-37.

Yeh, F.C.; Yang, R. and Boyle, T. (1999). *POPGENE version 1.31: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis*. Quick User Guide.

Yong, H.S. (1991). Biochemical genetic differentiation in the *Trigona atripes* species group of Malaysian stingless bees (Insecta: Hymenoptera: Apidae). *Comp. Biochem. Physiol.* **99** (3): 625-628.

IV. CONCLUSÕES GERAIS

. As populações de *Melipona rufiventris* analisadas no presente trabalho apresentaram um baixo nível de variabilidade genética. Foram detectados polimorfismos enzimáticos em apenas dois locos (*Mdh-1* e *Est-4*).

. A presença de um padrão enzimático intermediário para a *Est-4*, em colônias de Brasilândia, quando comparado com aqueles observados em colônias de mata e de cerrado, sugere que as colônias desta região sejam híbridas.

. Os sistemas enzimáticos PEP-A e β -HBDH apresentaram diferentes padrões de expressão entre populações de mata e cerrado, diferenciando-as.

. Os altos valores do coeficiente F_{ST} (0,9539) e dos índices de distâncias genéticas observados entre colônias de mata e de cerrado (variando de 0,4739 a 0,5003) confirmam a diferenciação genética entre populações de mata e cerrado.

. A grande diferença entre as populações estudadas sugere que o nome *M. rufiventris rufiventris*, em Minas Gerais, na verdade, esteja sendo utilizado para duas espécies de *Melipona*.

