

MARGARETE DO VALLE WERNECK

**USO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES
PARA ANÁLISE GENÉTICA DE
POPULAÇÕES DE *Melipona mandacaia* SMITH, 1863
(HYMENOPTERA, APOIDEA) NO ESTADO DA BAHIA.**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

MARGARETE DO VALLE WERNECK

USO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES
PARA AVALIAÇÃO GENÉTICA DE
POPULAÇÕES DE *Melipona mandacaia* SMITH, 1863
(HYMENOPTERA, APOIDEA) NO ESTADO DA BAHIA

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

APROVADA: 29 de Julho de 2008.

Prof^a. Ana Maria Waldschmidt
(Co-Orientadora)

Prof^a. Mara Garcia Tavares
(Co-Orientadora)

Prof^a. Georgina M^a de Faria Mucci

Prof^a. Tânia M^a Fernandes Salomão

Prof. Lucio Antônio de Oliveira Campos
(Orientador)

Aos meus avós
Djalma Leal Werneck que me ensinou a amar a ciência.
Conceição Morais Werneck que me deu exemplo de simplicidade e praticidade.
José Luiz de Salles Valle que me mostrou como valorizar as artes, as letras e a vida.
Dileta Vecchi do Valle que sempre me faz ver o lado bom, mesmo das coisas ruins.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e pela inspiração diária para seguir no caminho do bem.

Aos meus amados pais Célia e José Moraes, por serem meus exemplos e se sacrificarem para que eu tivesse mais essa oportunidade.

Às manas Luísa e Juliana que me apóiam mesmo sem concordar com meus objetivos.

Ao Reinaldo, pela compreensão, carinho e amor. Eu escolho você todos os dias!

À Tia Lupe, por me apoiar e por ter um imenso coração onde cabe nossa família toda.

Ao Prof. Lucio pela amizade e orientação para a carreira acadêmica e para a vida.

À Georgina pela amizade. Quero ser como você quando eu crescer!

À Prof^a. Ana Maria pelo companheirismo e por compartilhar generosamente seus conhecimentos.

À Mariana, minha prima e minha amiga. Agora já sei o caminho da minha casa!

À Carolina, pela amizade, por dividir comigo a rotina no laboratório, as disciplinas, as angústias e as alegrias desses dois anos. Seremos todos felizes!

Às “Índias seus cabelos” por se tornarem minha família em Viçosa.

Ao amigo Henrique, que não teme a concorrência, pela valiosa e desinteressada ajuda.

Aos amigos Aline, Juliano, Marcília e Riviane pelas risadas que tornaram mais suaves as longas horas que passamos debruçados sobre a bancada.

Aos colegas do laboratório pela convivência.

Às Prof^{as} Mara, Tânia e Karla pelas sugestões e paciência.

Ao Prof. Serrão e ao amigo Dihego pela ajuda na captura das imagens.

Aos funcionários do laboratório, do apiário e da secretaria: Monteiro, Íris, Cabrito, Beth e Salvadora pela atenção e boa vontade.

Àqueles, que mesmo sem me conhecer, colaboraram na coleta de amostras: Sr. José Bonifácio Varjão, Prof^a Kátia Siqueira, Sr. Gilberto Vinícius dos Santos, Sr. Roberto Paz Cavalcante, Prof. Rogério Alves e, especialmente ao Sr. João Rocha Filho.

À UFV, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural e a todos que contribuíram a seu modo para que eu chegasse até aqui. Obrigada.

BIOGRAFIA

Margarete do Valle Werneck, filha de José Morais Werneck e Célia do Valle Werneck nasceu em Cataguases, no estado de Minas Gerais no dia 27 de maio de 1975.

Em Cataguases, iniciou seus estudos na Escola Estadual Coronel Vieira onde completou o ciclo básico da alfabetização. Coursou o ensino básico na Escola Estadual Manoel Inácio Peixoto e concluiu o ensino médio na Escola Estadual Francisco Inácio Peixoto.

Em 1994 prestou vestibular para o curso de Farmácia na Universidade Federal de Juiz de Fora, graduando-se em 1999.

Em 2002 iniciou o curso de Ciências Biológicas na Faculdade de Filosofia Ciências e Letras das Faculdades Integradas de Cataguases, graduando-se em 2005.

Em 2006 iniciou o mestrado em Biologia Celular e Estrutural na Universidade Federal de Viçosa.

RESUMO

WERNECK, Margarete do Valle, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2008. **Uso de marcadores microssatélites para avaliação genética de populações de *Melipona mandacaia* Smith, 1863 (Hymenoptera, Apoidea) no Estado da Bahia;** Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Co-orientadores: Ana Maria Waldschmidt e Mara Garcia Tavares.

Melipona mandacaia é uma espécie de abelha indígena sem ferrão (Tribo Meliponini) endêmica de regiões do semi-árido do nordeste do Brasil. A cobertura vegetal original da caatinga tem sido alterada pela ação humana. Essa alteração reduz os recursos alimentares e os locais de nidificação disponíveis para as abelhas e torna mais difícil a dispersão e o fluxo genético das populações desses organismos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o emprego dos marcadores microssatélites na avaliação genética de populações de *Melipona mandacaia* no estado da Bahia, considerando a possível presença de alelos nulos. Foram utilizadas operárias adultas dos municípios de Paulo Afonso, Macururé, Central Uibaí, São Gabriel, Irecê, Lapão e Serra do Ramalho. A extração do DNA total foi realizada segundo Waldschmidt *et al.* (1997) com algumas modificações. Para amplificação foram utilizados *primers* microssatélites específicos para *M. bicolor* para avaliar sete locos (Peters *et al.* 1998). Dos sete locos avaliados, três foram monomórficos: Mbi 259, Mbi 219 e Mbi 088. Os locos que apresentaram polimorfismo foram Mbi 233 com 6 alelos, Mbi 278 com 4 alelos, Mbi 028 e Mbi 215 com 2 alelos. O acentuado déficit de heterozigotos e a presença de alelos pouco frequentes em homozigose levantaram a suspeita de subestruturação por isolamento por distância. As falhas na amplificação levantaram a suspeita também da presença de alelos nulos. Para satisfazer a condição de subestruturação, as amostras foram agrupadas em três regiões segundo a proximidade geográfica das localidades onde foram coletadas. Para verificar a presença de alelos nulos os dados agrupados foram submetidos a um estimador da presença de alelos nulos e posterior ajuste das frequências alélicas. Para avaliar a estruturação foi utilizado o coeficiente F de Wright em três cenários extremos. No primeiro a presença de alelos nulos foi desconsiderada, no segundo foi considerada a presença de infinitos alelos com frequências baixíssimas e no terceiro foi considerada a presença de um único alelo nulo com a maior frequência possível. Nos cenários 2 ($F_{ST} = 0,21$) e 3 ($F_{ST} = 0,26$) obtivemos os valores para F_{ST} mínimo e máximo esperados para uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O valor obtido no cenário 1 ($F_{ST} = 0,16$) está abaixo da faixa estabelecida pelos os valores e mínimo (2) e máximo (3). A faixa de valores de F_{ST} considerando a presença de alelos nulos é compatível com estruturação alta ou muito alta. Os valores de F_{ST} nos permitem inferir que a população de *Melipona mandacaia* em estudo encontra-se subestruturada e que há elevada diferenciação genética entre os grupos geográficos considerados. Estudos adicionais são necessários para averiguar a endogamia a que essas subpopulações estão submetidas. A presença de alelos nulos compromete o emprego dos marcadores microssatélites para avaliação genética de populações.

ABSTRACT

WERNECK, Margarete do Valle, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2008. **Microssatellites markers applied to genetic evaluation of populations of *Melipona mandacaia* Smith, 1863 (Hymenoptera, Apoidea) in Bahia State, Brazil**; Adviser: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Co-Advisers: Ana Maria Waldschmidt and Mara Garcia Tavares.

Melipona mandacaia, is an indigenous stingless bee (Meliponini Tribe), an endemic species of the semi-arid of the northeast of Brazil. The original flora of the “caatinga” has been altered by the human action. This alteration reduces the food resources and the places available for nesting, so this affects the dispersion and the genetic flow of the populations of those organisms. The objective of this work was to evaluate the job of the markers microssatélites in the genetic evaluation of populations of *Melipona mandacaia* in Bahia state, Brasil. Adult workers from Paulo Afonso, Macururé, Central Uibaí, São Gabriel, Irecê, Lapão and Serra do Ramalho were used. The extraction of genomic DNA was accomplished according to Waldschmidt et al. (1997) modified. The amplification was performed using primers microssatellites specific for *Melipona bicolor* to evaluate seven locos (Peters et al.1998). The amplification products were submitted to electrophoresis in poliacrilamide gel under 100v for 14 hours. Three of the seven appraised locos were monomorphic: Mbi 259, Mbi 219 and Mbi 088. The locos that presented polymorphism were Mbi 233 with 6 alleles, Mbi 278 with 4 alleles, Mbi 028 and Mbi 215 with 2 alleles. Because of the deficit in heterozygosis and alleles in low frequency showed in homozygosis lifted the suspicion for subestruturation and isolation by distance. The absence of amplification products in some samples lifted the suspicion also of the presence of null alleles. To satisfy the subestruturation condition, the samples were joined in three areas according to the geographical proximity of the places where they were collected. To verify the presence of null alleles the data were submitted to a null alleles estimator and further adjustment of the alleles frequencies. To evaluate the structuring the F coefficient of Wright was used in three extreme sceneries. In the first sceneries the absence of null alleles was considered, in the second the presence of infinite null alleles with the lowest possible frequencies was considered and in the third sceneries the presence of a single null allele with the highest possible frequency was considered. In the sceneries 2 ($F_{ST} = 0,21$) and 3 ($F_{ST} = 0,26$) we obtained the values for F_{ST} minimum and maximum for a population in Hardy-Weinberg equilibrium. The value obtained in the scenery 1 ($F_{ST} = 0,16$) was lower than the established interval for the minimum (2) and maximum (3) values. The strip of values of F_{ST} considering the presence of null alleles is compatible with high or very high structuration. The values of F_{ST} allow us to infer that the studied population of *Melipona mandacaia* is subestruturated and there is high genetic differentiation among the considered geographical groups. Additional studies are necessary to evaluate the endogamic matches that are happening in those subpopulations. The presence of null alleles commits the use of the microssatélites markers for genetic studies of populations.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A biologia das abelhas	1
1.2. As abelhas sem ferrão.....	1
1.3. A caatinga e sua fauna apícola.....	2
1.4. Diversidade genética	3
1.5. Estruturação genética das populações	4
1.6. Estudos de populações de insetos com marcadores moleculares	5
1.6.1. O emprego de marcadores microssatélites para estudo das abelhas	7
2. OBJETIVO	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
3.1. Material biológico	9
3.2. Extração do DNA	11
3.2.1. As adaptações do protocolo de Waldschmidt et al. (1997).....	11
3.3. Protocolo para amplificação do DNA com primers microssatélites.....	11
3.3.1. Seleção dos primers.....	12
3.3.2. Eletroforese, revelação das bandas e documentação dos resultados	12
3.4. Análise estatística dos dados	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5. CONCLUSÕES.....	20
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

1. INTRODUÇÃO

1.1. A biologia das abelhas

O maior grupo da ordem Hymenoptera é aquele constituído pelos Aculeata que inclui as vespas, abelhas e formigas. As abelhas e as vespas esfecoides constituem a superfamília Apoidea. Atualmente estão descritas 16.325 espécies vivas de abelhas, distribuídas em 425 gêneros pertencentes a 7 famílias (Michener, 2000). Estes insetos devem ser valorizados pelo seu papel ecológico como polinizadores, do qual depende a reprodução sexuada e, por conseqüência, a variabilidade genética da maioria das plantas floríferas. Dessa ação polinizadora também depende a produção de frutos e sementes que sustentam populações incontáveis de outras espécies (Silveira *et al.*, 2002).

O sistema de determinação de sexo nas abelhas, assim como nos demais Hymenoptera, é haplodiplóide, isto é, ovos fertilizados produzem as fêmeas que são diplóides (2n) e ovos não fertilizados dão origem aos machos haplóides (n) (Michener, 2000). A endogamia produz ovos fertilizados que apresentam homozigose no loco CSD determinante para o sexo, que assim se desenvolvem em machos diplóides. Machos diplóides, geralmente, têm vida curta e não são aptos para a função reprodutiva (Michener, 2000).

1.2. As abelhas sem ferrão

A Tribo Meliponini, que inclui todas as “abelhas indígenas sem ferrão”, apresenta uma ampla distribuição nas regiões tropicais do mundo, bem como nas regiões subtropicais do hemisfério sul e existe um grande número de espécies crípticas e ainda não descritas (Michener, 2000). Camargo & Pedro (2007) apresentam 32 gêneros exclusivamente neotropicais, com 391 espécies reconhecidas.

A eussocialidade, nível de organização social comum a todos os meliponíneos, é caracterizada pela sobreposição de gerações dentro do ninho e pela divisão do trabalho reprodutivo entre castas (Michener, 2000). A casta representada pela

rainha e pelos machos se encarrega da reprodução; a casta representada pelas operárias cuida da prole e mantém a colônia (Wilson, 1971).

Dos gêneros existentes no Brasil, *Melipona* é representado pelo maior número de espécies (Silveira *et al.*, 2002). Este gênero, o mais distinto entre os meliponíneos, distribui-se na região neotropical, indo do México (limite norte) até Misiones na Argentina (limite sul) (Michener, 2000). Camargo & Pedro (2007) listaram 68 espécies em uma revisão recente do gênero.

Destas, a espécie *Melipona mandacaia* Smith, 1863 é endêmica de regiões do semi-árido do nordeste do Brasil. Porém, os limites geográficos de sua ocorrência ainda não foram bem definidos. Silveira *et al.* (2002) relatam sua ocorrência nos estados da Bahia, Ceará, Paraíba e Pernambuco.

Estudos citogenéticos realizados por Rocha *et al.* (2003) revelaram que o número de cromossomos desta espécie é $2n = 18$ nas fêmeas e $n = 9$ nos machos. A análise filogenética realizada por Fernandes-Salomão *et al.* (2005) avaliaram as seqüências ITS-1 e demonstraram que as espécies *M. quadrifasciata* e *M. mandacaia* são filogeneticamente próximas.

Segundo Alves (2004) a espécie *Melipona mandacaia* é muito importante para a polinização das espécies vegetais da caatinga do semi-árido, além de representar um grande potencial para a meliponicultura.

1.3. A caatinga e sua fauna apícola

A ocupação humana tem modificado significativamente a caatinga. O desmatamento e as culturas irrigadas estão causando a salinização do solo, aumentando a evaporação da água que existe nele e acelerando o processo de desertificação. Entretanto, não existe uma estimativa adequada de quanto da caatinga já foi alterada pelo homem. A razão para essa realidade é a dificuldade técnica para classificar os tipos de vegetação da caatinga devida à falta de conhecimento sobre o bioma (Castelletti *et al.*, 2008).

Em 1993, o IBGE estimou que 28% da área total da caatinga já estavam alterados. A partir dessa estimativa, Castelletti *et al.* (2008) incluíram as áreas impactadas pela construção de estradas e chegaram a uma estimativa de área de cerca de 45% da área original. Este dado coloca a caatinga como um dos

ecossistemas mais modificados no Brasil, superada apenas pela Mata Atlântica e pelo Cerrado.

Devido à aridez do clima e à relativa pobreza de espécies, a caatinga é o ecossistema brasileiro menos valorizado para a conservação da biodiversidade (Zanella & Martins, 2008). A biota da caatinga sempre foi tratada na literatura como pobre e com poucos registros de espécies endêmicas, porém, estudos mais recentes demonstram que essa afirmativa não corresponde à verdade. Vários relatos recentes de endemismo tanto de espécies vegetais quanto animais indicam um conhecimento bastante precário da zoologia e botânica da caatinga (Castelletti *et al.*, 2008).

Os estudos sobre a fauna apícola da caatinga têm demonstrado peculiaridades como endemismos e interações específicas entre abelhas e flora. Devido à intensa pressão sofrida por esse ecossistema, torna-se importante conhecer suas potencialidades e preservar os fragmentos remanescentes da cobertura original (Zanella & Martins, 2008).

1.4. Diversidade genética

A diversidade genética, na forma de alelos múltiplos para vários locos, existe na maioria das populações naturais, porém, vários fenômenos podem mascarar a segregação dos genótipos (Hartl & Clark, 1997).

Em populações que realizam reprodução sexuada não é esperado que dois indivíduos possuam o mesmo genótipo para todos os locos. Assim, torna-se importante descrever como os alelos estão organizados em genótipos para determinar se os alelos estão distribuídos aleatoriamente (Hartl & Clark, 1997). De acordo com o princípio de Hardy-Weinberg, nas populações infinitamente grandes e panmíticas, ao longo do tempo, as frequências gênicas não se alteram e as proporções genotípicas atingem um equilíbrio mantendo uma relação constante entre si (Beiguelman, 1994). O desvio desse equilíbrio pode ser demonstrado pelo cálculo do número de heterozigotos esperados para uma população.

A heterozigose pode ser interpretada como uma medida da diversidade genética. Quando há excesso de homozigotos na população, a heterozigose observada na população (H_o) é menor do que o valor esperado (H_e). Esse déficit

de heterozigotos em populações diplóides pode ser causado por diversos fatores. Uma das causas do déficit de heterozigotos é a endogamia onde um indivíduo é homozigoto para um determinado loco por haver herdado duas cópias idênticas de um alelo por ancestralidade devido ao cruzamento entre aparentados. Outra causa é a deriva genética que ocorre quando populações são isoladas em pequenos grupos e pode levar à fixação ou eliminação de alelos por variação aleatória das suas frequências ao longo das gerações, independentemente do valor adaptativo dos alelos. Outros fatores causadores de baixa heterozigose são o efeito fundador e o efeito gargalo. Sob essas condições as frequências alélicas dos fundadores ou sobreviventes nem sempre correspondem às da população original. Assim, a população se expande a partir de um número limitado de indivíduos e pode mostrar composição genética diferente daquela exibida pela população original. Ainda pode ser destacado o efeito Walund em que o isolamento de populações em grandes grupos, entre os quais o fluxo gênico é restrito produz aumento de indivíduos homozigotos, efeito resultante dos cruzamentos parcialmente aleatórios.

A interpretação da baixa variabilidade genética deve ser criteriosa e levar em consideração as limitações das técnicas moleculares empregadas, as quais podem produzir artificialmente uma reduzida heterozigose sem, contudo, corresponder à realidade da população em estudo.

1.5. Estruturação genética das populações

Normalmente, espécies ou populações não formam uma única unidade panmítica onde os indivíduos se acasalam aleatoriamente por toda a faixa de distribuição da espécie. As populações podem estar subdivididas em grupos ou regiões por fatores impostos naturalmente pelo ambiente ou artificialmente introduzidos pela ação humana (Excoffier, 2001). A subestruturação causa, ao longo das gerações, a diferenciação genética entre as subpopulações. As diferenças genéticas surgem pela seleção natural de diferentes genótipos em cada subpopulação, por processos aleatórios de transmissão dos alelos de uma geração

a outra ou por diferenças nas frequências alélicas do subgrupo isolado (Hartl & Clark, 1997).

Uma consequência relevante da subestruturação de populações é a redução do número de genótipos heterozigotos em relação à proporção esperada para uma população que apresenta cruzamentos aleatórios (Hartl & Clark, 1997).

A ocorrência de subestruturação é um fator importante no estudo da composição genética de uma população (Chakraborty & Jin, 1992) porque pode afetar a interpretação dos padrões observados de diversidade genética (Excoffier, 2001).

1.6. Estudos de populações de insetos com marcadores moleculares

Atualmente existem muitas técnicas moleculares descritas e que podem ser utilizadas em estudos de populações de insetos com os mais diversos propósitos. Os marcadores moleculares apresentam vantagens sobre os marcadores morfológicos por exibirem maior grau de polimorfismo e serem, geralmente, neutros (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A escolha da técnica depende de fatores como os recursos disponíveis para realização do trabalho, experiência do pesquisador (Solferini & Selivon, 2001) e o tipo de problema a ser analisado (Sunnucks, 2000). Os marcadores dominantes requerem de duas a dez vezes mais indivíduos e mais locos quando comparados com marcadores codominantes (Baverstock & Moritz, 1996). Os marcadores codominantes fornecem maior informação genética por loco e possibilitam inferir sobre a heterozigotidade de uma população (Ferreira & Grattapaglia, 1998), tornando-se valiosos para avaliação da endogamia.

Assim, além das características da técnica, do problema a ser analisado e de questões operacionais, a disponibilidade de material biológico e o esforço de coleta das amostras são também fatores determinantes para a escolha da técnica a ser empregada.

Os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) são seqüências de uma a seis bases de comprimento repetidas em tandem (Hancock, 1999). Eles estão distribuídos aleatoriamente pelo genoma (Schlötterer & Wiehe, 1999) e são raros em regiões codificadoras (Hancock, 1999), possuem expressão co-dominante, são

multialélicos e apresentam alto grau de polimorfismo genético (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

As interrupções nas seqüências repetitivas parecem conferir estabilidade aos microssatélites, porque reduzem a possibilidade de erro por deslizamento da DNA polimerase durante a replicação (Weber, 1990; Hancock, 1999).

Os microssatélites possuem taxa de mutação muito variável e dependente de vários fatores tais como o número de repetições (Weber, 1990), a seqüência de bases (Estoup & Cornuet, 1999) e o padrão de repetição dessas bases (Chackraborty et al., 1997).

A taxa de mutação dos microssatélites varia também com o tipo de organismo. A estimativa é de 6×10^{-6} por loco por geração em *Drosophilla* (Schug et al., 1997). As mutações mais freqüentes nos microssatélites são as alterações no número de repetições (Eisen, 1999).

O polimorfismo dos microssatélites pode ter diversas origens. Os principais mecanismos apontados são o “deslizamento” da polimerase durante a replicação e o “crossing-over” desigual (Hancock, 1999).

O polimorfismo por deslizamento da polimerase ocorre quando a fita de DNA nascente se dissocia da fita molde e volta a se alinhar com ela. A repetição de seqüências pode causar o realinhamento em local equivocado, mas que apresente o mesmo padrão de repetição de bases. Se o realinhamento ocorre à frente do ponto de interrupção, um trecho do DNA molde pode deixar de ser copiado e resultar numa fita nascente mais curta. Se, por outro lado o realinhamento ocorre num ponto que já foi copiado, um trecho do DNA molde será copiado novamente, resultando numa fita nascente mais longa.

Por “crossing-over” desigual, o polimorfismo surge como consequência do emparelhamento equivocado entre os cromossomos homólogos, causado pela presença de seqüências repetitivas, resultando numa fita dupla mais curta e outra mais longa após a recombinação (Hancock, 1999).

Como apresentam alto grau de polimorfismo, expressão codominante, presença abundante em todo o genoma e relativa facilidade de execução técnica, os microssatélites têm sido considerados os marcadores ideais para estudos genéticos de populações (Lehman et al., 1996a).

1.6.1. O emprego de marcadores microssatélites para estudo das abelhas

Em 1993 Estoup *et al.* caracterizaram seqüências microssatélites e desenvolveram *primers* para duas espécies de abelhas: *Apis mellifera* e *Bombus terrestris*. Posteriormente, Estoup *et al.* (1995) verificaram a variação dos microssatélites em populações de *A. mellifera* para estudo de estrutura populacional e encontraram padrões de variação em diversas partes do mundo.

Peters *et al.* (1998) sequenciaram trinta e três locos microssatélites em *Melipona bicolor bicolor*. A partir destes foram construídos 25 *primers* que foram testados em operárias adultas da espécie coletadas em meliponários de São Paulo. Dezenove deles se mostraram polimórficos. Quando testados em *M. quadrifasciata*, apenas dezenove deles resultaram em produtos de PCR e o polimorfismo ocorreu em oito *primers*.

Green *et al.* (2001) sequenciaram locos microssatélites e construíram *primers* específicos para *Trigona carbonaria*, uma abelha sem ferrão endêmica da Austrália e Kukuk *et al.* (2002) desenvolveram *primers* microssatélites para *Lasioglossum (Chialictus) hemichalceum*, uma espécie de abelha comunal endêmica da Austrália.

Francisco *et al.* (2006) estudaram o número de alelos e a heterozigozidade para locos microssatélites em *Plebeia remota*, *Partamona mulata* e *P. helleri* e concluíram que o déficit de heterozigotos pode ser um artefato da técnica utilizada em que alguns alelos não são amplificados com os *primers* utilizados.

Arias *et al.* (2006) discutiram o uso de marcadores moleculares como ferramenta para estudos evolutivos e de populações de abelhas sem ferrão. Os marcadores microssatélites foram considerados muito úteis para análise de parentesco, variação intra-específica, hibridização de espécies, dinâmica de populações, mapeamento genético e estudos de filogeografia, além de serem empregados para avaliar o impacto do comportamento reprodutivo, da estrutura social e da dispersão em populações ameaçadas. Estes autores consideraram que o alto grau de polimorfismo de microssatélites numa população é consequência de novas mutações, deriva genética, e seleção de genes ligados às seqüências repetitivas.

Carvalho-Zilse & Kerr (2006) utilizaram os microssatélites para estudos populacionais em *M. scutellaris*. Dos dez *primers* heterólogos (específicos para

M. bicolor) testados, sete foram utilizados com sucesso. Os *primers* desenvolvidos para *A. mellifera* não produziram bons resultados com a *M. scutellaris*, revelando bandas fracas e inespecíficas, indicando que a transferência destes marcadores é melhor entre grupos mais próximos. Os autores encontraram baixa heterozigose e apenas um loco em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Quezada-Euán *et al.* (2007), utilizando *primers* microssatélites heterólogos desenvolvidos para *M. bicolor*, *B. terrestris* e *T. carbonaria*, verificaram diferenças morfológicas e moleculares entre populações de *M. beecheii* geograficamente distantes devido ao reduzido fluxo gênico entre as localidades.

Souza *et al.* (2007) desenvolveram *primers* microssatélites para abelhas euglossine através do sequenciamento e clonagem de trechos de DNA. Destes marcadores, treze foram desenhados especificamente para *Eulaema nigrita* e outros treze para *Euglossa cordata*.

Apesar de serem amplamente empregados nos estudos de populações, a possível presença de alelos nulos é considerada uma restrição à aplicação dos marcadores microssatélites em análises genéticas (Pemberton *et al.*, 1995).

Alelos nulos surgem quando ocorre uma mutação no DNA alvo, precisamente na seqüência homóloga à seqüência do *primer* utilizado na reação de PCR. Isto reduz ou inibe completamente a capacidade de *anelamento* do mesmo com a fita molde (Callen *et al.*, 1993). Esses alelos mutantes não são visíveis nos géis submetidos às técnicas de revelação de bandas normalmente utilizadas para produtos de PCR separados por eletroforese.

Chapuis & Estoup (2007) estudaram o efeito dos alelos nulos de microssatélites na estimativa da diferenciação de populações. Eles concluíram que a presença destes alelos leva à estimação errônea das distâncias genéticas em casos de diferenciação populacional significativa. Esse dado é importante porque as distâncias genéticas baseadas em microssatélites são geralmente usadas para construção de dendogramas de taxa relacionados.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de marcadores microsatélites para avaliação genética de populações de *Melipona mandacaia* Smith, 1863 (Hymenoptera, Apoidea) no estado da Bahia, considerando a possível presença de alelos nulos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

Foram utilizados exemplares de *Melipona mandacaia*, coletadas nos municípios de Macururé, Paulo Afonso, São Gabriel, Lapão, Central, Uibaí, Irecê e Serra do Ramalho, no estado da Bahia (Figura 1, Tabela1).

Tabela 1: Municípios amostrados, coordenadas geográficas e número de amostras por município

Indicação no mapa	Município	Coordenadas geográficas		Nº de amostras
1	Paulo Afonso	09° 24' 21" S	38° 12' 52" W	6
2	Macururé	09° 10' 03" S	39° 03' 27" W	14
3	Uibaí	11° 20' 12" S	42° 07' 57" W	33
4	Lapão	11° 22' 59" S	41° 49' 54" W	3
5	Irecê	11° 18' 15" S	41° 51' 20" W	9
6	São Gabriel	11° 13' 45" S	41° 54' 42" W	14
7	Central	11° 08' 08" S	42° 06' 46" W	3
8	Serra do Ramalho	13° 33' 45" S	43° 35' 48" W	23
Total de amostras				105

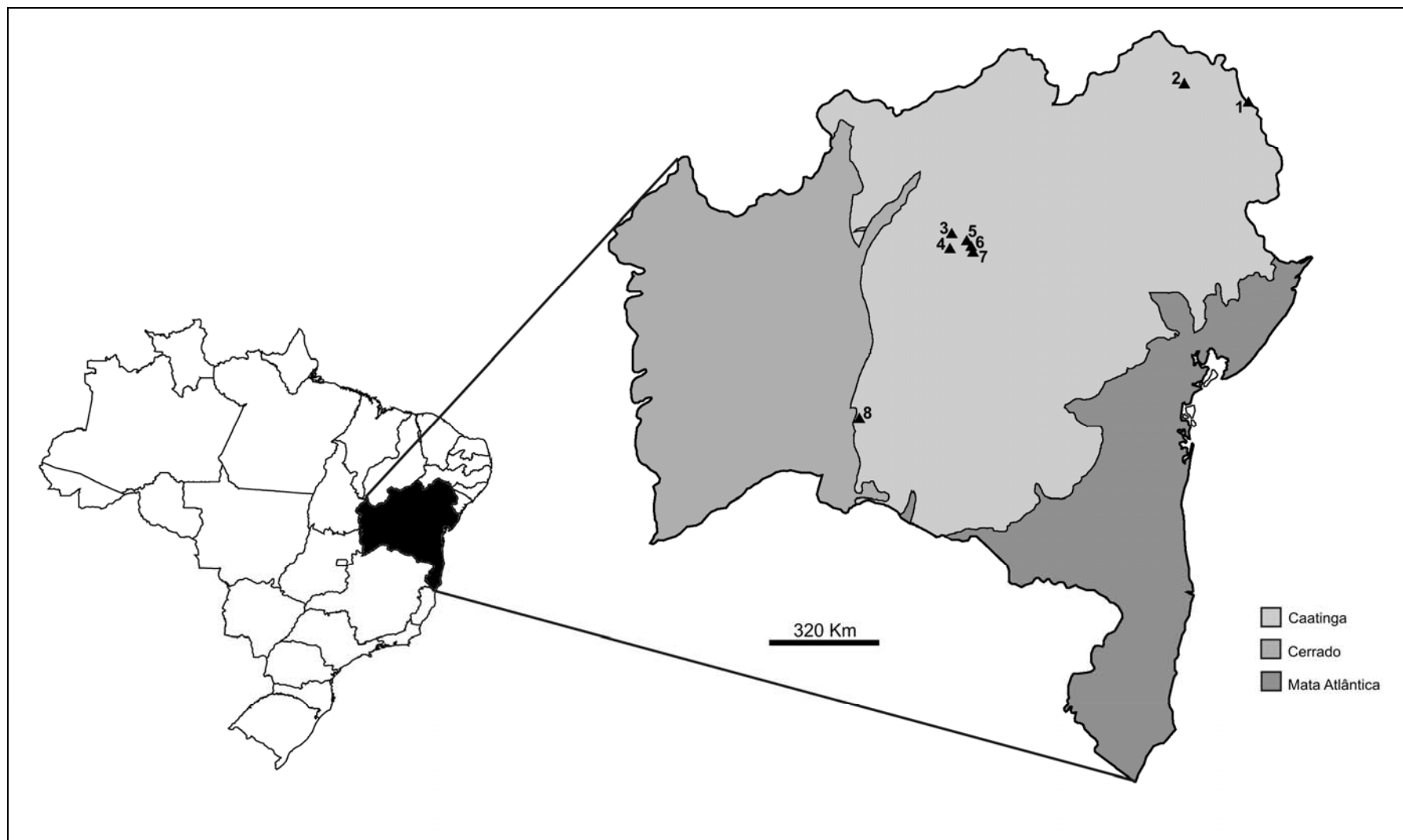


Figura 1: Mapa geográfico dos municípios amostrados no estado da Bahia.
1- Paulo Afonso, 2 - Macururé, 3 - Central, 4 - Uibaí, 5- São Gabriel, 6 - Irecê, 7 - Lapão e 8 - Serra do Ramalho.

Foram coletadas cerca de 10 operárias adultas de cada ninho, provenientes de meliponários ou de ambientes naturais. Os espécimes foram conservados em etanol absoluto e mantidos sob refrigeração a -20°C até o processamento das amostras.

3.2. Extração do DNA

3.2.1. As adaptações do protocolo de Waldschmidt et al. (1997).

O DNA total das abelhas foi extraído segundo o protocolo proposto por Waldschmidt *et al.* (1997) com algumas modificações.

A proporção de proteinase utilizada foi aumentada para 4 µL a 20 mg/ mL, pois as extrações realizadas com o protocolo original mostraram contaminação por proteínas. O volume final de tampão utilizado para cada amostra foi reduzido para 900 µL para que a maceração do material fosse realizada diretamente nos tubos de eppendorf, com utilização de pistilo de vidro, sem que o tampão derramasse. A primeira desproteinização foi realizada com fenol-clorofórmio 24:1, e não apenas com clorofórmio como no protocolo original.

3.3. Protocolo para amplificação do DNA com *primers* microssatélites

A amplificação do DNA foi realizada empregando-se o protocolo proposto por Peters *et al.* (1998).

Cada mistura de reação teve volume total de 10 µL contendo 0,4 µL de dNTP a 2,5µM, 2,0µL de tampão para *Taq* polimerase, 0,6 µL de MgCl₂ na concentração de 25 µM, 5,5 µL de água Mili-Q, 0,1 µL *Taq* polimerase 1X, 0,2 µL de cada um dos *primers* (R e F) a 10 µM e 1,0 µL de DNA genômico (correspondente a 10 ng).

As misturas foram incubadas em termociclador programado para realizar uma desnaturação inicial a 94° C por 3 minutos, 40 ciclos compostos por 30 segundos de desnaturação a 92° C, 1 minuto com a temperatura de “anelamento” dos

primers, 30 segundos a 72°C para ação da Taq-polimerase seguidos de 5 minutos para extensão das fitas de DNA a 72°C.

3.3.1. Seleção dos *primers*

A princípio, uma única amostra de DNA foi utilizada para amplificação com dezoito pares de *primers*, desenvolvidos especificamente para *Melipona bicolor* (Peters *et al.*, 1998), disponíveis no laboratório.

Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% com 1 mm de espessura. Para os testes, a altura da coluna de gel foi de 14 cm de altura submetido à corrente elétrica de 100 v, por 4 horas consecutivas.

Para a realização do trabalho, foram selecionados sete *primers* que produziram poucas bandas inespecíficas que permitiam a segurança na interpretação dos resultados quanto ao tamanho dos fragmentos amplificados segundo a referência bibliográfica utilizada (Tabela 2).

Tabela 2: *Primers* microssatélites empregados na amplificação do DNA genômico de *M. mandacaiá*

<i>Primer</i>	Tamanho pares de bases	Seqüência do loco	Temperatura (°C)
Mbi 028	108	(TCC) ₆ ACC(TCC) ₃	57,5
Mbi 088	94	(GAAA) ₂ GGAAG(AAAGA) ₄ (AAGGA) ₂ AAAGAAAC(GAG) ₂	58
Mbi 215	92	(TTC) ₆	62,5
Mbi 219	151	(ATT) ₄	62
Mbi 233	119	(GAA) ₁₁	57,5
Mbi 259	183	(AGG)(AGA) ₅ (GGA) ₂ GAA(GGA) ₂	62,5
Mbi 278	113	CTT(CTC) ₂ CTTCTCTGCTTCC (TCT) ₉ CCTTCG(TCT) ₂	65

3.3.2. Eletroforese, revelação das bandas e documentação dos resultados.

Os produtos obtidos com a amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% com 1 mm de espessura. A altura da coluna de gel foi de 25 cm de altura, com diferença de potencial de 100 v, por 14 horas consecutivas.

Logo após, sob agitação suave e constante, os géis foram mergulhados em etanol absoluto 10% e ácido acético 5% para fixação das bandas. Foram então submetidos à impregnação com solução de nitrato de prata 0,2% por 10 minutos. Posteriormente, sob agitação manual, foram lavados em água destilada durante 1 minuto. Para visualização das bandas foi utilizada uma solução reveladora contendo NaOH 3% e formol 0,6%. A etapa de revelação foi mantida até que os géis adquirissem uma tonalidade amarelo-dourada e as bandas ficassem amarronzadas. Na seqüência, os géis foram colocados em etanol 60% (V/V) para interromper a revelação. As imagens dos géis frescos foram obtidas com scanner de mesa.

3.4. Análise estatística dos dados

Para a verificação da diversidade genética foram realizados testes de estatística descritiva como o número de alelos por loco, as frequências genotípicas e alélicas, a heterozigose observada (H_o) e a heterozigose esperada (H_e) (Nei, 1978). Estas análises foram realizadas utilizando-se o programa TFPGA versão 1.3 (Miller, 1987) disponível na rede mundial de computadores no endereço eletrônico: <http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm/> . Para essas análises foram considerados os dados brutos.

A presença de alelos nulos e a ocorrência de amplificação preferencial de alelos foram avaliadas pelo programa Micro-Checker (Oosterhout *et al.*, 2004; Oosterhout *et al.*, 2006) disponível na rede mundial de computadores no endereço eletrônico <http://www.microchecker.hull.ac.uk/>. Levando em consideração a distribuição endêmica da espécie, para essas análises consideramos uma única população. Devido à distância entre as regiões do estado onde as amostras foram coletadas, assumimos que esta população está subestruturada por isolamento por distância. As amostras foram divididas em três grupos de acordo com a proximidade geográfica das localidades onde foram coletadas:

- Grupo do Norte: localidades de Macururé e Paulo Afonso
- Grupo do Centro: localidades de Lapão, Irecê, Central, São Gabriel e Uibaí
- Grupo do Sul: apenas a localidade de Serra do Ramalho

O índice de fixação F de Wright (F_{st}) foi calculado com o aplicativo EXCELL[®] do Windows para verificar a estrutura genética da população amostrada, considerando-se os três grupos acima, utilizando a fórmula:

$$F_{ST} = \frac{H_t - H_s}{H_t}, \text{ onde:}$$

H_s é a heterozigose da subpopulação para um determinado loco;

H_t (Heterozigosidade total) é a média do somatório das heterozigosas de cada região para um determinado loco.

O índice F_{st} foi calculado para os três grupos, Norte, Centro e Sul. Posteriormente, o F_{st} total foi calculado como a média do somatório dos índices F_{st} calculados para as regiões, em cada um dos locos polimórficos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises realizadas com os sete *primers* microssatélites selecionados demonstraram que os locos Mbi 259, Mbi 219 e Mbi 088 foram monomórficos. Os locos Mbi 028 e Mbi 215 apresentaram apenas dois alelos e os locos Mbi 278 e Mbi 233 apresentaram quatro e seis alelos respectivamente.

Foram atribuídos valores arbitrários aos genótipos, com o menor valor correspondendo ao alelo de menor tamanho. Em seguida os valores atribuídos obedeceram à ordem crescente de tamanho dos fragmentos observados.

Os genótipos encontrados, número de indivíduos de cada genótipo e as frequências genotípicas para cada loco encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3: Número de indivíduos (N) por genótipo e frequências genotípicas dos locos polimórficos encontrados em *M. mandacaiá*. As falhas na amplificação foram anotadas sob o código “??”

Genótipo	Mbi 233		Mbi 278		Mbi 028		Mbi 215	
	N	Freq.	N	Freq.	N	Freq.	N	Freq.
11	8	7,62	28	26,67	46	43,82	91	86,67
12	10	9,52	4	3,81	56	53,33	8	7,62
13	4	3,81	-	-	-	-	-	-
14	4	3,81	-	-	-	-	-	-
15	2	1,92	-	-	-	-	-	-
22	4	3,81	26	24,76	2	1,9	5	4,76
23	22	20,95	-	-	-	-	-	-
24	11	10,48	-	-	-	-	-	-
26	3	2,86	-	-	-	-	-	-
33	6	5,71	11	10,48	-	-	-	-
34	6	5,71	14	13,33	-	-	-	-
35	2	1,92	-	-	-	-	-	-
44	6	5,71	1	0,95	-	-	-	-
45	1	0,95	-	-	-	-	-	-
46	1	0,95	-	-	-	-	-	-
55	1	0,95	-	-	-	-	-	-
66	7	6,66	-	-	-	-	-	-
??	7	6,66	21	20,00	1	0,95	1	0,95

A observação atenciosa da Tabela 3 revelou um grande número de indivíduos homocigotos. A partir das frequências genotípicas foram calculadas as frequências dos alelos apresentados por cada um dos locos polimórficos (Tabela 4).

Tabela 4: Frequências alélicas verificadas nos locos polimórficos encontrados em *M. mandacaiá*.

Loco	Alelo	Frequência
Mbi 233	1	0,3906
	2	0,2240
	3	0,1094
	4	0,1562
	5	0,0677
	6	0,0521
Mbi 278	1	0,5000
	2	0,3041
	3	0,1701
	4	0,0258
Mbi 028	1	0,8990
	2	0,1010
Mbi 215	1	0,9471
	2	0,0529

A observação da Tabela 4 evidenciou a presença de alelos pouco freqüentes em homozigose, como os alelos 5 e 6 no loco Mbi 233, o alelo 4 no loco Mbi 278 e o alelo 2 nos locos Mbi 028 e Mbi 215.

A heterozigose média observada ($H_o=0,097$) foi comparada com a heterozigose média esperada ($H_e=0,237$). A comparação evidenciou um acentuado excesso de homozigotos ($X^2=0,684$). As localidades foram então avaliadas separadamente e a deficiência de heterozigotos se confirmou na maioria das amostras (Figura 2).

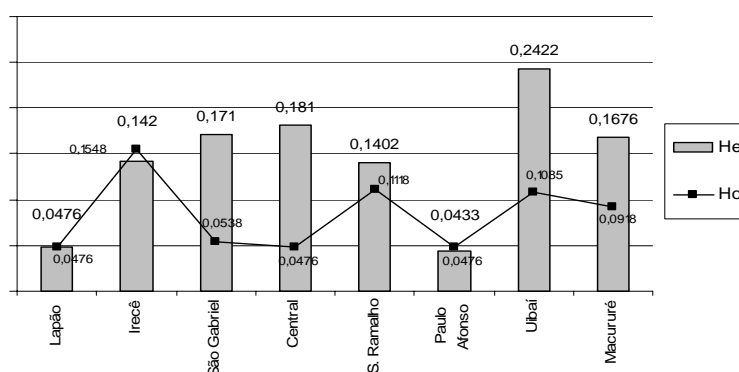


Figura 2: Comparação entre Heterozigose esperada (He) e Heterozigose observada (Ho) para *M. mandacaiá* em cada localidade amostrada.

Segundo Francisco *et al.* (2006), os *primers* heterólogos, apesar de contribuírem para a compreensão da estrutura genética de populações de espécies para as quais não foram especificamente desenhados, devem ser usados com cautela, pois revelam grau de polimorfismo mais baixo. A transferência destes marcadores é melhor entre grupos mais próximos (Carvalho-Zilse & Kerr, 2006) e quanto maior a distância filogenética entre a espécie para a qual os *primers* foram desenhados e a espécie em que foram empregados, menor será o polimorfismo observado. Peters *et al.* (1998) testaram 25 *primers* microssatélites específicos para *Melipona bicolor bicolor* em operárias adultas da espécie e de *M. quadrifasciata*. Dezenove deles foram polimórficos para *Melipona bicolor* e apenas oito para *M. quadrifasciata*. Porém, o excesso de homozigotos não pode ser atribuído somente à utilização de *primers* heterólogos.

A endogamia não pode ser a única alternativa para o excesso de homozigotos porque as abelhas são organismos haplodiplóides e, neste caso, a observação de um grande número de homozigotos poderia resultar na existência de machos diplóides

entre as operárias na proporção de 1:1. Porém, machos diplóides não foram observados nas amostras analisadas.

O déficit de heterozigotos também não pode ser explicado somente por subestruturação da população. Porém, a subestruturação associada à presença de alelos não detectáveis, ou alelos nulos, poderia ser uma explicação para a redução de heterozigotos. É comum encontrarmos alelos nulos em espécies diferentes daquela para a qual os *primers* foram desenvolvidos (Chapuis & Estoup, 2007).

Tabela 5: Locos em que foi apontada a presença de alelos nulos nos três grupos geográficos e as frequências alélicas não ajustadas e ajustadas para a presença de alelos nulos

Grupo	Loco	Alelo	Freq. não ajustadas	Freq. ajustadas (Brookfield, 1996)	
Norte: amostras de Macururé e Paulo Afonso	Mbi 233	1	0,0952	0,0825	
		2	0,4762	0,4127	
		3	0,0476	0,0413	
		4	0,3333	0,2889	
		5	0	0,0000	
		6	0,0476	0,0413	
		Soma das frequências de Nulos		0,1333	
	Mbi 215	1	0,775	0,5253	
		2	0,225	0,1525	
		Soma das frequências de Nulos		0,3222	
	Centro: amostras de Lapão, Irecê, Central, São Gabriel e Uibaí	Mbi 233	1	0,3909	0,2542
			2	0,1091	0,0710
3			0,1545	0,1005	
4			0,1545	0,1005	
5			0,1182	0,0769	
6			0,0727	0,0473	
		Soma das frequências de Nulos		0,3496	
Mbi 215		1	0,9839	0,9536	
		2	0,0161	0,0156	
		Soma das frequências de Nulos		0,0308	
Mbi 278		1	0,4561	0,2425	
		2	0,2105	0,1119	
		3	0,2895	0,1539	
		4	0,0439	0,0233	
		Soma das frequências de Nulos		0,4478	
Sul: amostras de Serra do Ramalho	Mbi 278	1	0,1429	0,0822	
		2	0,8571	0,4934	
		3	0	0,0000	
		4	0	0,0000	
		Soma das frequências de Nulos		0,4244	

As localidades foram reunidas em três grupos de acordo com a proximidade geográfica, segundo a teoria do isolamento por distância proposta por Wright (1943) (Tabela 5) e os genótipos foram submetidos a um teste para estimar a presença de alelos nulos utilizando o programa Micro-Checker[®] (Ver Material e Métodos).

No grupo do Norte o programa apontou a presença de alelos nulos para os locos Mbi 233 e Mbi 215. No grupo do Centro o programa apontou a presença de alelos nulos nos locos Mbi 233, Mbi 215 e Mbi 278 e no grupo do Sul, somente para o loco Mbi 278.

Nos locos em que a presença de alelos nulos foi apontada, as frequências alélicas foram ajustadas utilizando o algoritmo de Brookfield (1996) que desconsidera as amostras não amplificadas. Esse estimador foi escolhido porque a não visualização das bandas pode ter causa na execução da técnica, e não a presença de alelos nulos.

Através do ajuste realizado pela versão do programa Micro-Checker[®] utilizada não é possível determinar o número de alelos não detectados presentes nas amostras. Assim, para avaliar os efeitos da presença dos alelos nulos sobre a estruturação genética da população em estudo, o coeficiente F de Wright foi calculado para três cenários diferentes, os quais simulam três situações extremas. No primeiro cenário a presença de alelos nulos não foi considerada. No segundo cenário foi considerada a presença de infinitos alelos nulos com frequências muitíssimo baixas. No terceiro, foi prevista a presença de um único alelo nulo, com a máxima frequência possível admitida pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 6).

Tabela 6: Índice F_{st} para os locos polimórficos observados em *M. mandacaiá*

Loco	Valores de F_{st}		
	Desconsiderada a presença de alelos nulos	Infinitos alelos nulos com frequências mínimas	Único alelo nulo com a máxima frequência
Mbi 233	0,115	0,120	0,151
Mbi 278	0,420	0,276	0,373
Mbi 028	0,015	0,020	0,020
Mbi 215	0,075	0,432	0,479
Média	0,16	0,21	0,26

Nos cenários 2 ($F_{ST} = 0,21$) e 3 ($F_{ST} = 0,26$) obtivemos os valores para F_{ST} mínimo e máximo, respectivamente, esperados para uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O valor obtido no cenário 1 ($F_{ST} = 0,16$) foi significativamente menor, encontrando-se fora da faixa estabelecida entre os valores máximo e mínimo obtidos nos cenários 2 e 3. O fato de se obter um valor de F_{ST} alterado pode induzir à inferências errôneas sobre a estruturação da população avaliada. Assim, a possível presença de alelos nulos deve ser investigada com critério quando os marcadores microssatélites e programas estatísticos que não consideram a sua presença forem empregados para avaliar a estrutura de populações.

As frequências de alelos nulos reportadas para insetos da ordem Diptera são de 0,05 (Lehman *et al.*, 1996b). Nas populações avaliadas no presente trabalho as frequências de alelos nulos estão muito acima desse valor e podem ter sido influenciadas por outras causas da redução da heterozigose como a utilização de primers heterólogos.

Segundo Wright (1978) os valores de F_{ST} entre 0,05 e 0,15 indicam moderada diferenciação genética entre populações; valores entre 0,15 e 0,25 indicam alta diferenciação genética entre populações e valores acima de 0,25 são compatíveis com diferenciação genética muito alta.

O valor do índice F_{ST} obtido sem considerar a presença de alelos nulos ($F_{ST} = 0,16$) indica o limite entre diferenciação moderada a alta.

Admitindo-se que todas as amostras obtidas constituem uma única população e que esta se encontra subestruturada em três regiões, a faixa de valores calculados para o índice F_{ST} considerando a presença de alelos nulos é compatível com estruturação alta ou muito alta. Esse fato pode ser atribuído à grande distância geográfica entre as regiões do estado em que as amostras foram coletadas e à dificuldade de dispersão da espécie *M. mandacaia* em ambientes fragmentados pela remoção parcial ou total da vegetação nativa.

5. CONCLUSÕES

Utilizando as frequências alélicas não ajustadas, os valores de heterozigose esperada (H_e) e observada (H_o) revelaram um acentuado déficit de heterozigotos na população.

Não foi possível determinar o número de alelos nulos e, conseqüentemente suas frequências. Assim, os valores de heterozigose ajustados para a presença de alelos nulos não puderam ser calculados.

Os valores de F_{ST} nos permitem inferir que a população de *Melipona mandacaia* em estudo encontra-se subestruturada e que há elevada diferenciação genética entre os grupos geográficos considerados.

Estudos adicionais são necessários para averiguar a endogamia a que essas subpopulações estão submetidas.

A presença de alelos nulos compromete o emprego dos marcadores microssatélites para avaliação genética de populações.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arias, M.C., Brito, R.M., Francisco, F.O., Moreto, G., De-Oliveira, F.F., Silvestre, D., Sheppard, W.S.. (2006). Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. *Apidologie* 37: 259-274.

Alves - Rogério

Baverstock P.K.R. & Moritz C. (1996) Project design. "In" *Molecular Systematics*. 2nd. Edition (eds. D.M. Hillis; C. Moritz & B.K. Mable), pp. 17-27, Sinauer Associates, Massachusetts.

Beiguelman, B. (1994) *Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações*. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, Brasil. 460p.

Brookfield, J.F.Y. (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5: 453-455.

Callen, D.F.; Thmpson, A.D.; Shen, Y.; Phillips, H.A.; Richards, R.I.; Mulley J.C. & Sutherland, G.R. (1993) Incidence and Origin of Null Alleles in the (AC)n Microsatellite Markers. *American Journal of Human Genetics* 52: 922-927.

Camargo, J. M. F. & Pedro, S. R. M. (2007) *Meliponini Lapeletier, 1836*. "In": *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region*. Moure, J. S.; Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs.). Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia, 1058 p.

Carvalho-Zilse C.D. & Kerr W.E. (2006). Utilização de marcadores microssatélites para estudos populacionais em *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). *Magistra* 18: 4, 213-220.

Castelletti C.H. M.; Santos A.M.; Tabarelli M. & Silva J.M.C. (2008) Quanto ainda resta da Caatinga? Uma estimativa preliminar "In" *Ecologia e Conservação da Caatinga*, UFPE ed.

Chakraborty, R. & Jin, L. (1992) Heterozygote deficiency, population substructure and their implications in DNA fingerprinting. *Human Genetics* 88: 267-272.

Chakraborty, R.; Kimmel, M. Stivers, D.N.; Davison, L.J. & Deka, R. (1997) Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *The National Academy of Sciences USA* 94: 1041-1046.

Chapuis, M.P. & Estoup, A. (2007) Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population. *Molecular Biology and Evolution* 24 (3): 621- 631.

Eisen J.A. (1999) Mechanistic basis for microsatellite instability. "In" *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds. D.B. Goldstein & C. Schlotterer), pp. 34-48, Oxford University Press, New York.

Estoup A. & Cornuet J-M. (1999) Microsatellite evolution: inferences from population data. "In" *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds. D.B. Goldstein & C. Schlotterer), pp. 49-65, Oxford University Press, New York.

Estoup, A. ; Solignac, M.; Harry, M.; Cornuet, J-M. (1993). Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Research* v 21, 6, 1427-1431.

Estoup, A.; Garnery, L.; Solignac, M.; Cornuet, J-M. (1995). Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics* 140: 679 – 695.

Excoffier,L. (2001) Analysis of Population Subdivision. "In" *Handbook of Statistical Genetics* (eds. D.J. Balding, M. Bishop & C. Cannings), pp. 271-307, John Wiley & Sons, Ltd. England.

Fernandes-Salomão, T.M., Rocha, R.B., Campos, L.A.O., Araújo, E.F.. (2005). The first internal transcribed spacer (ITS-1) of *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): characterization and phylogenetic analysis. *Isects Socieux* 52: 11-18.

Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética 2.ed. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília.

Francisco F.O. Brito R.M. & Arias M.C. (2006) Allele number and heterozygosity for microsatellite loci in different stingless bee species (Hymenoptera: Apidae, Meliponini) Neotropical entomology 35 (5): 638-643.

Green, C.L.; Franck, P.; Oldroyd, B.P. (2001) Characterization of microsatellite loci for *Trigona carbonaria*, a stingless bee endemic to Australia. Molecular Ecology 1: 89-92.

Hancock J.M. (1999) Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. "In" Microsatellites: Evolution and Applications (eds. D.B. Goldstein & C. Schlötterer), pp. 1-9, Oxford University Press, New York.

Hartl, D.L. & Clark, A.G. Principles of Population Genetics. 3^a ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Canadá, 1997.

Kukuk, P.F.; Forbes, S.H.; Zahorchack, R.; Riddle, A.; Pilgrim, K. (2002). Highly polymorphic microsatellite markers developed for the social halictine bee *Lasioglossum (Chilalictus) hemichalceum*. Molecular Ecology Notes 2: 529-530.

Lehmann, T.; Hawley, W.A. & Collins, F.H. (1996-a) An Evaluation of Evolutionary Constraints on Microsatellite Loci Using Null Alleles. Genetics 144: 1155-1163.

Lehmann, T.; Hawley, W.A.; Kamau, L.; Fontenille, D. and Simard, F.H. (1996-b) Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* populations from East and West Africa: comparison of microsatellite and allozyme loci. Heredity 77:192-208.

Michener, C.D. (2000) The Bees of the World. The John Hopkins University Press, London, p. 913.

Miller, M.P. (1987) TFPGA – Tools for Populations Genetics Analyses V1.3 A Windows[®] program for analysis of allozyme and molecular population genetic data. <http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>

Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590

Oosterhout, C.V.; Hutchinson, W.F.; Wills, D.P.M. & Shipley, P. (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.

Oosterhout, C.V.; Weetman, D. & Hutchinson, W.F. (2006) Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. *Molecular Ecology Notes* 6: 255-256.

Peters, J.M.; Queller, D.C.; Imperatriz-Fonseca, V.L.; Strassmann, J.E. (1998) Microsatellite loci for stingless bees. *Molecular Ecology* 7: 783-787.

Quezada-Euán, J.J.G.; Paxton, R.J.; Palmer, K.A.; Itzá, W de J.M.; Tay, W.T.; Oldroyd, B.P. (2007) Morphological and molecular characters reveal differentiation in a Neotropical social bee, *Melipona beecheii* (Apidae: Meliponini). *Apidologie* 38: 247-258.

Rocha, M.P.; Cruz, M.P.; Fernandes, A.; Walschmidt, A.M.; Silva-Junior, J.C.; Pompolo, S.G. (2003). Longitudinal differentiation in *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Meliponini) chromosomes. *Hereditas* 138: 133-137.

Schlötterer C. & Wiehe T. (1999) Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps. "In" *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds. D.B. Goldstein & C. Schlötterer), pp. 238-248, Oxford University Press, New York.

Schug, M.D.; Mackay, T.F.C. & Aquadro, C.F. (1997) Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* 15: 99-102.

Silveira, F. A.; Melo, G. A. R. & Almeida, E. A. B. (2002) *Abelhas Brasileiras: sistemática e identificação*. Belo Horizonte. 253 p.: il.

Solferini V.N. & Selivon D. (2001) Polimorfismos de isozimas. "In" *Biologia Molecular e Evolução* (ed. S.R. Matioli), pp. 137-142, Holos Editora, Ribeirão Preto.

Souza, R.O.; Cervini, M.; Del Lama, M.A.; Paxton, R.J.(2007) Microsatellite loci for euglossine bees (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Ecology Notes* 2007.

Sunnucks P. (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends in ecology and Evolution* 15: 199-203.

Waldschmidt, A.M.; Fernandes-Salomão, T.M.; Barros, E.G.; Campos, L.A.O. (1997) Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Brazilian Journal of Genetics* : 20 (3).

Weber J.L. (1990) Informativeness of human (dC-dA)_n.(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* 44: 388-396.

Wilson E.O. (1971) *The Insect Societies*. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.

Zanella F.C.V. & Martins C.F. (2008) *Abelhas da Caatinga: Biogeografia, Ecologia e Conservação* "In" *Ecologia e Conservação da Caatinga*, UFPE ed.