

DENILCE MENESES LOPES

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES
DE *Melipona rufiventris* E *Melipona mondury*
(HYMENOPTERA: APIDAE) POR ANÁLISE DE
MICROSSATÉLITES**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2004**

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

T

L864d
2004

Lopes, Denilce Meneses, 1978-
Diversidade e estrutura genética em populações de
Melipona rufiventris e *Melipona mondury* (Hymenoptera :
Apidae) por análise de microssatélites / Denilce Meneses
Lopes. – Viçosa : UFV, 2004.
ii, 55f. : il. ; 29cm.

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

Referências bibliográficas: f. 46-55.

1. Abelha – Diversidade genética. 2. Melipona. 3.
Microssatélites (Genética). I. Universidade Federal de
Viçosa. II.Título.

CDD 20.ed. 596.7990415

DENILCE MENESES LOPES

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES
DE *Melipona rufiventris* E *Melipona mondury* (HYMENOPTERA:
APIDAE) POR ANÁLISE DE MICROSSATÉLITES**

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

Aprovada: 28 de julho de 2004

Prof. Lúcio Antônio de Oliveira Campos
(Conselheiro)

Prof^a. Tânia Maria Fernandes Salomão
(Conselheira)

Dr. Luiz Antônio dos Santos Dias

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros

Prof^a. Mara Garcia Tavares
(Orientadora)

“Interroga a beleza da terra, interroga a beleza do mar, interroga a beleza do ar que se dilata e se difunde... interroga todas essas realidades. Todas elas te respondem: olhe-nos somos belas. Sua beleza é um hino de louvor. Essas belezas sujeitas à mudança, quem as fez senão o Belo, não sujeito à mudança?”

(Sto. Agostinho)

A Deus, dedico este trabalho!

Agradecimentos

À Deus, meu Tudo e meu Mestre. Não encontro palavras que consigam expressar minha gratidão. Quero agradecer hoje não só pelo que Ele faz, mas pelo que Ele é em minha vida. *"Bendize oh minh'alma ao Senhor e jamais te esqueças de todos os seus benefícios."*

À professora Mara que tem me acompanhado nesses anos, pela paciência e por toda orientação. Sem sua ajuda talvez não teria chegado até aqui. Muito obrigada.

Ao professor Lúcio pelos conselhos, pela amizade e por tantas vezes ser um incentivo para mim.

À professora Tânia pelas sugestões e auxílio nas análises de sequenciamento.

Ao professor Everaldo pela contribuição na minha formação acadêmica e pelas sugestões.

Ao Dr. Luís Antônio, por toda atenção e ajuda nas análises estatísticas.

À Universidade Federal de Viçosa e ao programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de realização desse trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao PROBIO/BIRD/GEF/MMA/CNPq pelo apoio financeiro.

Aos colegas de Laboratório, Angélica, Andréia, Ana Maria, Livia, Marco Antônio, Daniela, Jefferson, Marília, Monteiro, pelas horas de descontração e por toda ajuda.

À Liliane e Rita pela colaboração nas análises de sequenciamento

Aos tesouros que o Senhor me concedeu Aline (MCR), Brunela, Soraya, Juscelino, Odilon, Claudete, Egnaldo, Eni, Ernandes, Marcinha, Janaína, todos do Cenáculo e tantos outros que são para mim sustento na caminhada e motivos de grande alegria.

A amiga e irmã Taís, pelas alegrias e lágrimas partilhadas, por ser para mim, concretamente, um sinal do amor de Deus. Obrigada por trazer o céu para mais perto.

À minha família, apesar de estarem longe posso experimentar o amor e cuidado de cada um. Pelas orações, pelo carinho e apoio, muito obrigada.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Peço ao Senhor, que, pelas mãos da Virgem Santa, dê a cada um conforme a necessidade de seu coração. E a Ti Maria, mais uma vez eu repito: "*Totus Tuus*".

Deus os abençoe.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Abelhas sem ferrão.....	1
I.2. Variabilidade genética x Tamanho populacional.....	2
I.3. <i>Melipona rufiventris</i> e <i>Melipona mondury</i>	4
I.4. Marcadores microssatélites.....	6
II. OBJETIVOS	11
III. METODOLOGIA.....	12
III.1. Material genético.....	12
III.2. Extração de DNA.....	14
III.3. Amplificação do DNA.....	14
III.4 Clonagem e sequenciamento.....	16
III.5. Análises de dados.....	17
IV. RESULTADOS.....	19
IV.1. Análise populacional.....	19
IV.2. Análises de sequenciamento.....	21
V. DISCUSSÃO.....	37
VI. CONCLUSÕES GERAIS.....	45
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

RESUMO

LOPES, Denilce Meneses, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2004. **Diversidade e estrutura genética em populações de *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae) por análise de microssatélites.** Orientadora: Mara Garcia Tavares. Conselheiros: Lúcio Antônio de Oliveira Campos e Tânia Maria Fernandes Salomão.

Melipona rufiventris é uma espécie de meliponíneo que encontra-se ameaçada de extinção no estado de Minas Gerais. Até recentemente, as “formas” encontradas tanto em regiões de mata Atlântica quanto em regiões de cerrado dentro deste estado eram, consideradas uma única espécie. No entanto, devido ao grande número de diferenças morfológicas encontradas entre espécimens provenientes de diferentes regiões, a “forma” encontrada em regiões de mata passou a ser considerada como *Melipona mondury* e a “forma” presente no cerrado como *M. rufiventris*. Com o objetivo de estimar a variabilidade genética em populações dessas duas espécies, foram feitas análises com nove “primers” microssatélites em 45 colônias coletadas em diferentes localidades do estado de Minas Gerais. O seqüenciamento de alguns dos locos demonstrou que os fragmentos amplificados realmente continham regiões microssatélites. Considerando todas as amostras analisadas, 7 locos foram polimórficos, sendo que alguns alelos estavam presentes somente em *M. rufiventris* e outros eram exclusivos de *M. mondury*. A análise de agrupamento permitiu a formação de dois grupos distintos: o primeiro constituído pelas colônias de *M. mondury* e o segundo pelas de *M. rufiventris*. Nesse último observou-se a formação de dois subgrupos, sendo que as colônias de Brasilândia de Minas e Dom Bosco encontraram-se separadas das demais colônias de cerrado. A porcentagem de locos polimórficos foi de 33,3% para as espécies *M. mondury* e *M. rufiventris* e 22,2% para as colônias de Brasilândia de Minas/Dom Bosco. A heterozigidade observada nessas populações foi de 0,1159 para *M. mondury*, 0,0684 para *M. rufiventris* e 0,0222 para as colônias de Brasilândia de Minas/ Dom Bosco. *M. mondury* e *M. rufiventris* apresentaram valores de F_{ST} próximo de 0,25, mostrando que essas espécies possuem uma elevada estruturação populacional, com grande diferenciação genética entre as subpopulações.

ABSTRACT

LOPES, Denilce Meneses, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July 2004.
Genetic diversity and structure in *Melipona rufiventris* and *Melipona mondury* populations (Hymenoptera: Apidae) by analysis of microsatellites. Adviser: Mara Garcia Tavares. Committee members: Lúcio Antônio de Oliveira Campos and Tânia Maria Fernandes Salomão.

Melipona rufiventris is one species of the stingless bee that is becoming very rare in Minas Gerais state. Therefore it was included on the endangered species' list of Minas Gerais. Until recently, the different "forms" of *M. rufiventris* founded in the Atlantic forest areas or in the cerrado areas of this state, were considered as a unique species. However, due to the high number of morphological differences founded among specimens from different geographic regions, the "form" found in forest areas passed to be called *Melipona mondury* while the "form" found in the cerrado was assumed to be *M. rufiventris*. Aiming to estimate the genetic variability in populations of these two species, we analysed samples from 45 colonies collected at different places of the Minas Gerais state with nine microsatellites primers. The sequencing of some of these loci revealed that the amplified fragments really corresponded to microsatellite areas. Considering all the samples, 7 loci were polymorphic, with some alleles presented only in *M. rufiventris* while others were exclusive to *M. mondury*. The Grouping Analysis allowed the establishment of two different groups: the first constituted by the *M. mondury*'s colonies and the second by the *M. rufiventris*' colonies. In the last one, the establishment of two subgroups was observed, being the colonies from Brasilândia de Minas/Dom Bosco separated from the others colonies from the cerrado. The percentage of polymorphic loci was 33.3% to the species *M. mondury* and *M. rufiventris* and 22.2% to the colonies from Brasilândia de Minas/Dom Bosco. The observed heterozygosity in these populations was of 0.1159 for *M. mondury*, 0.0684 for *M. rufiventris* and 0.0222 for the colonies from Brasilândia de Minas/ Dom Bosco. *M. mondury* and *M. rufiventris* presented F_{ST} close to 0.25, indicating that their subpopulations are well structured, with a great genetic differentiation among them.

I. INTRODUÇÃO

I.1. Abelhas sem ferrão

As abelhas têm sido criadas e associadas principalmente à produção de mel, cera, pólen e própolis. Entretanto, mais importante que a fabricação desses produtos é a polinização de várias espécies de plantas realizada por esses insetos, que é considerada a sua principal função em diversos ecossistemas (Kerr et al., 1996). As abelhas garantem a manutenção do ciclo de reprodução sexuada de grande número de espécies de plantas e, assim, garantem também a disponibilidade de alimento para outros animais que dependem dessas plantas (Campos, 1998). Como exemplo desta importante atuação das abelhas, pode-se citar o fato de que no Amazonas, dentre as árvores de médio porte, 8% são polinizadas por diversas espécies de abelhas e 14% são polinizadas por apenas uma espécie de abelha (Absy et al., 1984).

No Brasil, um grupo importante de polinizadores são as abelhas indígenas sem ferrão, pertencentes à subtribo Meliponina que é constituída por 55 gêneros e mais de 340 espécies distribuídas nas regiões tropicais do mundo, bem como em muitas regiões subtropicais do hemisfério sul, como América do Sul, África, Índia, Malásia e Austrália (Camargo e Pedro, 1992).

As abelhas brasileiras sem ferrão são responsáveis, juntamente com outras abelhas, borboletas, coleópteros, aves, água, vento, morcegos e outros mamíferos, pela polinização de grande parte das árvores nativas (Kerr et al., 1994). No cerrado, 75% das espécies vegetais estudadas por Silberbauer-Gottsberger e Gottsberger (1988) eram polinizadas, primária ou secundariamente, por abelhas. Esses autores verificaram também, por meio de estudos de polinização realizados em diferentes ambientes, que as abelhas, na maioria dos tipos de vegetações naturais, eram os polinizadores mais importantes.

No entanto, devido a desmatamento, ação predatória de meliívoros e queimadas, muitas espécies de meliponíneos têm tido suas populações reduzidas drasticamente e a perda da diversidade destas abelhas certamente

será acompanhada pela perda de muitas espécies de plantas que dependem delas para polinização (LaSalle e Gauld, 1993).

I.2. . Variabilidade genética x Tamanho populacional

Muitas espécies de meliponíneos têm sofrido uma grande redução populacional nos últimos anos, sendo que muitas se encontram em risco de extinção. A principal causa dessa redução populacional é a destruição dos ambientes naturais, pois, estes insetos formam um grupo isolado e muito especializado, cujos indivíduos dependem das características climáticas e florísticas de suas regiões de origem. Estes insetos são, por isso, muito sensíveis a perturbações ambientais, podendo assim serem utilizados como bioindicadores (LaSalle e Gauld, 1993).

A transformação de grandes áreas de floresta em pequenas capoeiras devido ao desmatamento, pode representar várias limitações ao desenvolvimento das populações como diminuição de locais para nidificação e redução na disponibilidade de alimentos (Viana e Melo, 1987). Além disso, com a degradação ambiental, o número de colônias de meliponíneos na mesma área de reprodução torna-se menor do que na área original e essas populações podem desaparecer com grande rapidez (Menezes et al., 1993; Kerr et al., 1994).

Os efeitos da fragmentação estão relacionados com o tamanho do fragmento e a distância entre eles (Viana e Melo, 1987), sendo que as espécies que apresentam dificuldades de dispersão são as mais prejudicadas.

As abelhas da subtribo Meliponina, durante o processo de dispersão, primeiro fazem o provisionamento de uma nova colônia e somente depois abandonam o antigo ninho (Michener, 2000). Assim, grandes áreas abertas pelo desmatamento, desprovidas de locais para nidificação, dificultam a migração entre os fragmentos remanescentes, fazendo com que a dispersão de uma colônia por centenas de metros seja quase impossível (Michener, 2000).

A redução do tamanho populacional está associada à perda da variabilidade genética, pois em populações pequenas, a segregação aleatória dos genes e a reprodução desigual entre os indivíduos, produzem mudanças nas freqüências alélicas (Lande e Barrowclough, 1987) podendo ocorrer a fixação e/ou perda de um alelo (Futuyma, 1992). Esta perda da variabilidade genética é proporcional ao tamanho efetivo da população, ou seja, ao número de indivíduos que de fato se reproduzem e contribuem para a geração seguinte (Beiguelman, 1994).

Outro fator que colabora para a diminuição da variabilidade genética em pequenas populações é a endogamia (cruzamento entre indivíduos aparentados), a qual tem maior probabilidade de ocorrer em populações pequenas (Amos, 1999). Uma das razões para isto é o fato de que, em muitas espécies a capacidade de dispersão é limitada. Assim, os acasalamentos têm maior chance de acontecer entre indivíduos que nasceram mais próximos e com maior probabilidade de serem aparentados (Futuyma, 1992).

O principal efeito da endogamia em uma população é o aumento da freqüência de homozigotos (Hartl, 1987). No caso dos Hymenoptera, devido ao processo de determinação de sexo, indivíduos homozigotos no loco sexual se desenvolvem em machos diplóides. Estes são menos viáveis que os machos haplóides normalmente produzidos. Além disso, em colônias de *Melipona* nas quais machos diplóides são produzidos em grande quantidade, as rainhas também são eliminadas pelas operárias, o que leva, primeiro, à redução das populações das colônias e, eventualmente à sua extinção (Kerr et al., 1996). Após um período de endogamia a recuperação da população pode ser muito lenta ou não ocorrer, levando a extinção da população por uma endogamia recorrente (Unruh e Messing, 1993).

Segundo Page et al. (1985), populações de abelhas com 35 a 50 colônias podem manter aceitável variabilidade durante o tempo de 20 a 40 anos seguidos e, Kerr e Vencovsky (1982) verificaram que uma população local de qualquer espécie de *Melipona*, para ser viável deve conter no mínimo 44 colônias na sua área de reprodução.

Em Minas Gerais, as espécies *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury* têm sofrido grande redução populacional, sendo consideradas

atualmente como ameaçadas de extinção. Assim, estudos sobre a variabilidade genética dessas duas espécies poderão fornecer dados essenciais para o conhecimento de sua estrutura populacional, do grau de parentesco entre colônias e do fluxo gênico entre suas populações que são dados, sobremaneira importantes para elaborar estratégias para sua conservação.

1.3. *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury*

Em Minas Gerais, estima-se que a fauna de abelhas silvestres some algo em torno de 1000 espécies (Costa et al., 1998). Entre essas, encontra-se a espécie *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836, que está descrita no “Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna de Minas Gerais” como ameaçada de extinção (Machado et al., 1998). As razões para a inclusão de *M. rufiventris* na lista de espécies ameaçadas da fauna de Minas Gerais foram a destruição de habitat e coleta predatória de mel (Campos, 1998).

Esta espécie, segundo Moure e Kerr (1950) pode ser subdividida em cinco subespécies: *Melipona rufiventris rufiventris*, *M. r. flavolineata*, *M. r. paraensis*, *M. r. brachychaeta* e *M. r. dubia*. Entretanto, atualmente essas subespécies foram elevadas ao nível de espécies (Silveira et al., 2002), sendo que, apenas a espécie *M. rufiventris* é registrada no estado de Minas Gerais.

Originalmente, *Melipona rufiventris* distribuía-se por todo o estado de Minas Gerais, sendo encontrada tanto na Mata Atlântica quanto no Cerrado (Moure e Kerr, 1950). Atualmente, suas populações têm diminuído drasticamente com a degradação ambiental, não sendo mais encontrada em áreas degradadas, dentro de sua região original de distribuição. Na região de mata Atlântica a espécie não tem sido encontrada em pastagens abandonadas, nem em pequenas reservas de floresta secundária (Cure et al., 1992; Cure et al., 1993; Silveira et al., 1993). Também no cerrado, a frequência de *M. rufiventris* foi afetada e já não é encontrada em áreas impactadas (Silveira e Campos, 1995). Mesmo nos locais onde ela tem sido

encontrada, sua abundância nas amostras é sempre baixa e menor que a de outras espécies congêneras. Damasceno (1998), amostrando abelhas visitantes de árvore *Pterodon emarginatus*, encontrou apenas sete indivíduos de *Melipona rufiventris* entre os 1896 exemplares num total de 83 espécies.

Moure e Kerr (1950) e Moure (1975) relataram variações morfológicas com relação ao padrão de coloração das cerdas corbiculares e tíbias para essa espécie quando indivíduos de diferentes regiões geográficas foram analisados. Apesar disso, as abelhas do grupo *rufiventris* presentes no sudeste do Brasil, sempre foram consideradas uma única espécie.

Costa (2003) realizou trabalhos com marcadores isoenzimáticos em populações de *Melipona rufiventris* de diversas regiões do estado de Minas Gerais, sendo algumas localizadas em regiões com vegetação típica de cerrado e outras com vegetação típica de mata. Ele observou uma distância genética muito grande entre as “formas” encontradas em regiões de mata e as de cerrado, sugerindo que as mesmas representam duas espécies. Além disso, observou que as populações da localidade de Brasilândia de Minas (cerrado) apresentavam um padrão eletroforético intermediário entre as populações de cerrado e as de mata, o que levou a sugerir a existência de uma zona híbrida ou de uma terceira espécie sendo chamada de *M. rufiventris*.

O mesmo foi observado por Busse et al. (2003), ao analisarem a variabilidade genética dessas populações utilizando marcadores RAPD. Com base no padrão de bandas RAPD observado, foi possível diferenciar os indivíduos originados de regiões de mata dos de cerrado, como também verificar a presença de um terceiro grupo formado pelas colônias de Brasilândia de Minas. Schetino et al. (2003) analisando essas mesmas populações por PCR/RFLP da região CO-I/CO-II (Citocromo Oxidase I e II) do DNA mitocondrial, encontrou três haplótipos mitocondriais, os quais confirmaram o padrão de distribuição geográfica encontrado por Busse et al. (2003) e Costa (2003).

Concomitantemente ao desenvolvimento desses trabalhos, Melo (2003) reconheceu que as diferenças morfológicas existentes entre a “forma” de *M. rufiventris* encontrada no cerrado e a “forma” encontrada em regiões de mata são muito evidentes e propôs que elas sejam consideradas espécies

diferentes. Assim, hoje o nome *M. rufiventris* Lepeletier, 1836 passou a ser utilizado apenas para a espécie encontrada no cerrado e a espécie encontrada nas regiões com vegetação típica de mata Atlântica passou a ser denominada *Melipona mondury* Smith 1863.

I.4. Marcadores microssatélites

Como o estudo de todos os alelos presentes em uma população é impossível, torna-se importante a busca de marcadores genéticos que produzam estimativas da diversidade genética dessa população (Tregenza e Butlin, 1999). Nesse sentido, a biologia molecular é uma ferramenta importante que vem sendo utilizada em diversos estudos na genética de populações, existindo atualmente grande quantidade de marcadores moleculares que são utilizados em vários tipos de estudos.

No início dos anos 80, diferentes experimentos demonstraram que os genomas de eucariotos possuem várias classes de seqüências repetitivas (Hamada et al., 1982; Tautz e Renz, 1984). Algumas dessas foram chamadas de minissatélites ou microssatélites, de acordo com o tamanho da seqüência repetitiva. Os microssatélites são as seqüências mais simples (Litt e Luty, 1989), possuem de 1 a 6 nucleotídeos de comprimento repetidos em tandem, são muito freqüentes e estão distribuídos ao acaso por todo o genoma do indivíduo.

Dentre as características dos microssatélites que os tornam úteis em vários tipos de estudos, destaca-se o fato de serem caracteres mendelianos, codominantes, seletivamente neutros (suas seqüências não são codificadoras) e altamente polimórficos, sendo considerados a classe mais polimórfica de marcadores moleculares disponível hoje.

Os microssatélites são considerados uma região “instável” do genoma, no sentido de que essas regiões possuem uma taxa de mutação muito maior do que outros locos no mesmo genoma (Eisen, 1999). Essa “instabilidade” tem conseqüências importantes. Uma delas é que produz alelos polimórficos os quais têm sido muito úteis em diversos estudos (Sia et al., 1997). Apesar de existirem diferentes tipos de mutação que possam ocorrer nos locos

microssatélites, a mutação mais comum é a alteração no seu tamanho, resultando em seqüências com diferentes números de elementos repetitivos (Eisen, 1999).

Existem dois mecanismos que são utilizados para explicar as mutações nos microssatélites (Hancock, 1999). Um modelo propõe que a instabilidade dos microssatélites seja causada por uma elevada taxa de crossing-over desigual, pois, a presença das seqüências repetitivas, aumenta a probabilidade de ocorrer um desalinhamento no pareamento dos cromossomos homólogos, acarretando, depois do crossing-over, alterações no número original de repetições em cada cromossomo. O segundo mecanismo é chamado "slippage" ("deslize") (Sia et al., 1997). Durante o processo de replicação, a DNA polimerase pode sofrer um deslize e a nova fita, por um instante, se dissocia da fita molde. Posteriormente, ocorre o reanelamento, sendo que um ou mais pares de bases ficam desemparelhados (Sia et al., 1997). A presença das unidades repetitivas, aumenta a probabilidade de acontecer um erro nesse processo e se essa distorção não for corrigida, esse mecanismo levará a um ganho ou perda de unidades de repetição, ou seja, a nova fita será sintetizada com um número maior ou menor de repetições (Sia et al., 1997).

Os microssatélites podem ser amplificados via PCR ("Reação da polimerase em cadeia"), utilizando-se "primers" que flanqueiam a região repetitiva. O polimorfismo encontrado em geral, será uma diferença no tamanho dos fragmentos. Dessa forma cada elemento amplificado que possua um tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Marcadores microssatélites já foram desenvolvidos para alguns insetos, tais como abelhas (Estoup et al., 1993; Estoup et al., 1994; Peters et al., 1998; Paxton et al., 1996; 1999b), vespas (Choudhary et al., 1993; Hughes e Queller, 1993), formigas (Evans, 1993; Gertsch et al., 1995) e thrips (Chapman e Crespi, 1998) possibilitando a realização de estudos sobre a poliandria, paternidade, utilização de espermatozoides quando ocorre acasalamento com mais de um macho e genética de populações (Paxton et al., 1999a; Peters et al., 1999; Paxton, 2000).

Choudhary et al. (1993) e Hughes e Queller (1993) verificaram que os microssatélites são marcadores que apresentam altos níveis de polimorfismo, até mesmo em insetos onde se havia observado baixos níveis de variabilidade utilizando-se outros marcadores, como as aloenzimas. Em um estudo com a vespa *Polistes annularis*, por exemplo, seis loci microssatélites apresentaram uma heterozigosidade de 0,62 ao passo que 33 aloenzimas apresentaram heterozigosidade de 0,035 (Hughes e Queller, 1993). Isso sugere que este tipo de marcador é uma poderosa ferramenta que pode ser utilizada em genética populacional.

Estoup et al. (1993) foram os primeiros a descreverem “primers” microssatélites para abelhas. Mas somente em 1995 os microssatélites começaram a ser utilizados para se verificar a estrutura genética de populações nestes organismos (Estoup et al., 1995). A partir disso, vários estudos têm sido feitos utilizando-se esse marcador molecular.

Marcadores microssatélites foram utilizados para análise de associações filogeográficas entre *Bombus terrestris*, presente no continente europeu e *B. canariensis* e *B. maderiensis* presentes nas ilhas Canárias e Madeira, respectivamente, as quais estão localizadas no continente africano (Widmer et al., 1998). Os dados obtidos com essas análises possibilitaram diferenciar *B. canariensis* de *B. maderiensis*, bem como verificar o grau de similaridade entre as três espécies. Os indivíduos das Ilhas Canárias e Madeira apresentaram um valor médio de $F_{ST} = 0,411$, mostrando uma forte diferenciação entre elas. Quando as três espécies foram comparadas em uma análise de agrupamento, as amostras procedentes das Ilhas Canárias formaram um grupo distinto de *B. terrestris* e *B. maderensis*. A heterozigosidade observada nessas espécies variou de 0,142 a 0,498 nas populações analisadas (Widmer et al., 1998). Estudos posteriores sobre estrutura genética de *Bombus pascuorum*, uma importante espécie de abelha polinizadora, utilizaram seis loci microssatélites, encontrando uma heterozigosidade observada variando de 0,402 a 0,715 (Widmer e Schmid-Hempel, 1999).

Paxton (2000) também utilizou marcadores microssatélites para verificar o tipo de reprodução em rainhas da abelha *Scaptotrigona postica*. Os genótipos das operárias analisadas foram consistentes com rainhas

acasalando-se uma única vez e, em outros casos, com rainhas acasalando-se com até seis machos diferentes, o que levou o autor a considerar que *S. postica* é uma abelha poliândrica facultativa.

Por outro lado, ao se estudar *Platythyrea punctata*, uma formiga telítoca, Schilder et al. (1999) encontraram baixo índice de heterozigosidade e pequeno número de alelos, sendo comum indivíduos que compartilhavam o mesmo genótipo. Os autores ressaltam que isto pode ser reflexo de seu tipo de reprodução, juntamente com efeitos do fundador e gargalo genético pelos quais passaram as populações estudadas.

Goodisman et al. (2001) utilizaram marcadores microssatélites no estudo de quatro populações da vespa *Vespula germanica* introduzidas na Austrália. Eles observaram significativa diferenciação alélica entre as populações e, diminuição da similaridade genética em uma mesma população com o aumento da distância entre as colônias.

Estudos com a formiga *Linepithema humile* utilizando marcadores microssatélites, por outro lado, indicaram similaridades entre as populações analisadas, o que permitiu elucidar a origem geográfica desta espécie invasiva (Tsutsui et al., 2001).

Shao et al. (2004) encontraram significativa diferenciação entre populações de *Bombus iginitus* no continente e ilhas asiáticas utilizando também microssatélites. Os resultados encontrados sugerem que um recente gargalo populacional e isolamento geográfico são as causas da divergência apresentada por essas populações.

A maior dificuldade no uso de microssatélites é a construção dos “primers”, sendo necessário uma biblioteca genômica. Entretanto, pelo menos, em genomas animais, ocorre a conservação de sítios microssatélites entre espécies relacionadas, sendo possível, em alguns casos, utilizar “primers” desenhados para espécies diferentes, até mesmo para gêneros diferentes, que são chamados de “primers” heterólogos (Moore et al., 1991; Pépin et al., 1995), o que facilita o uso desses marcadores.

“Primers” heterólogos (construídos para *Scaptotrigona postica* e *Melipona bicolor*) foram utilizados por Francisco (2002), para analisar a diversidade genética em populações da abelha sem ferrão *Plebeia remota*. Dos 25 “primers” testados, 12 produziram resultados satisfatórios, podendo

ser utilizados no cálculo da heterozigose e diferenciação entre as populações analisadas.

No presente trabalho, esta estratégia também será utilizada para se analisar a variabilidade genética de populações de *M. rufiventris* e *M. mondury*, pois não existem “primers” microssatélites desenhados especificamente para estas espécies.

O presente trabalho faz parte do projeto “Elaboração de plano de manejo para urucu amarela”, que está sendo desenvolvido no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia Geral da UFV. Ao iniciarmos este projeto, as diferentes “formas” de *M. rufiventris* presentes no estado de Minas Gerais eram consideradas uma única espécie e portanto, um dos objetivos do referido projeto era avaliar, através do uso de marcadores moleculares, o “status” taxonômico destas diferentes “formas” nos biomas de mata e cerrado em Minas Gerais. Hoje, entretanto, sabe-se tratar de duas espécies: *M. rufiventris*, presente em regiões de cerrado e *M. mondury*, presente em regiões de mata. Este trabalho vem, portanto, complementar resultados obtidos com o uso de outros marcadores moleculares a respeito da diferenciação dessas duas espécies nas regiões de mata e cerrado em Minas Gerais. Ele teve como finalidade obter dados que possam contribuir para o conhecimento da estrutura genética das populações, para o entendimento de como a variação genética se estrutura entre as populações de diferentes regiões do estado, bem como para o desenvolvimento de estratégias que visem a preservação e a exploração racional deste grupo de insetos.

II. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral estudar a estrutura genética de populações de *Melipona mondury* e *Melipona rufiventris* provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais, para se obter uma estimativa da variabilidade genética dessas espécies e subsídios para se estabelecer estratégias que permitam a preservação ou o restabelecimento da integridade genética das populações dessas espécies.

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- a) avaliar o “status taxonômico” das populações do grupo de espécies conhecidas como *M. rufiventris* no estado de Minas Gerais, visando a obtenção de dados que auxiliem planos de manejo das populações, com vistas à conservação.
- b) estimar a variabilidade genética intra e inter colonial de populações de *M. mondury* e *M. rufiventris* localizadas nos biomas de mata Atlântica e cerrado no Estado de Minas Gerais, com o intuito de comprovar a diferenciação genética existente entre elas.

III. METODOLOGIA

III.1. Material genético

Neste trabalho foram amostrados indivíduos de *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury* e de populações do complexo “rufiventris” ainda não identificadas especificamente, coletados no estado de Minas Gerais, em diferentes localidades nos biomas do cerrado e mata Atlântica. As amostras foram congeladas, no campo, em nitrogênio líquido ou, dependendo das possibilidades, transportadas vivas para o laboratório.

Foram coletadas amostras de 45 colônias no total. Das regiões de mata foram analisados 69 indivíduos de 14 colônias de *Melipona mondury*, enquanto das regiões de cerrado foram analisados 155 indivíduos de 31 colônias de *Melipona rufiventris* (Tabela 1 e Figura 1).

Para as análises moleculares foram utilizados cinco indivíduos de cada colônia, com exceção de uma colônia de *M. mondury*, da qual se analisou quatro indivíduos.

Tabela 1: Localidade, bioma e número de colônias analisadas.

LOCALIDADE	BIOMA	Nº COLÔNIAS
Coluna	Mata	2
Itamarandiba	Mata	5
Resende Costa	Mata	6
Marliéria	Mata	1
Subtotal		14
Guimarânia	Cerrado	9
Patos de Minas	Cerrado	4
Patrocínio	Cerrado	2
Arcos	Cerrado	2
Uberaba	Cerrado	2
Córrego Dantas	Cerrado	3
Pequi	Cerrado	2
Formiga	Cerrado	2
Dom Bosco	Cerrado	2
Brasilândia de Minas	Cerrado	3
Subtotal		31
Total		45

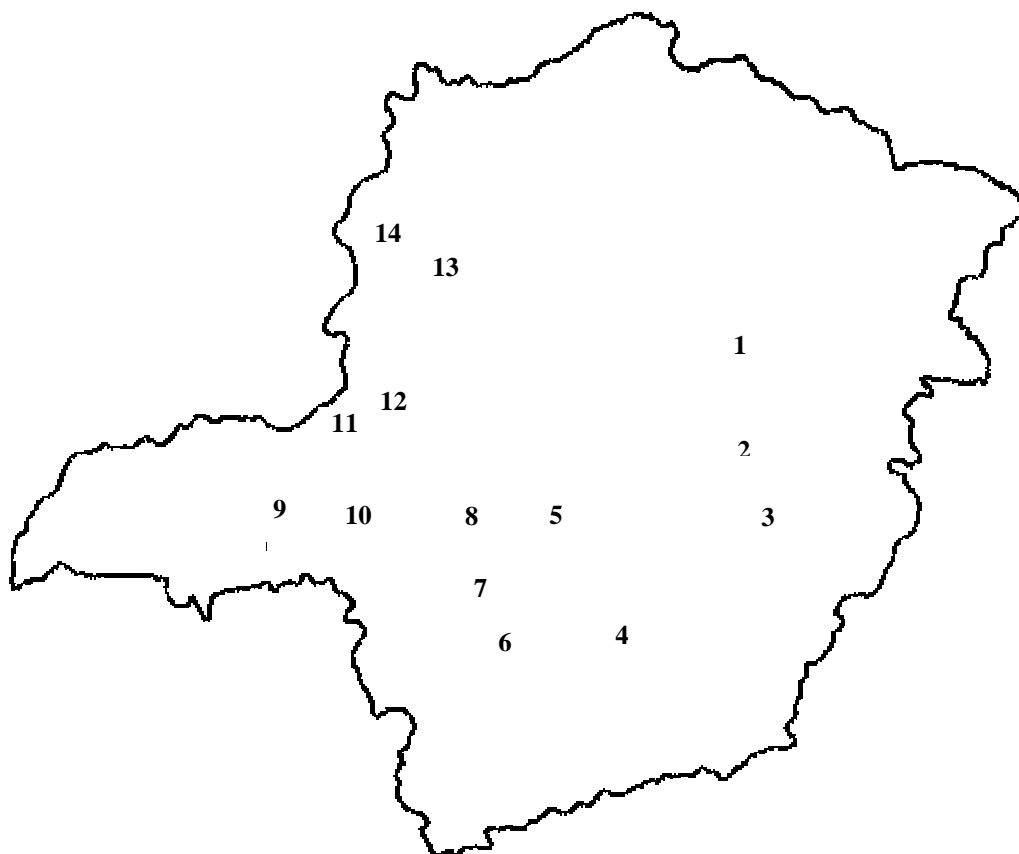


Figura 1: Localização geográfica das 15 localidades de Minas Gerais onde foram coletadas amostras de *Melipona rufiventris* () e *M. mondury* (). 1 - Itamarandiba, 2 - Coluna, 3 – Marliéria, 4 – Resende Costa, 5 - Pequi, 6 – Formiga, 7 – Arcos, 8 - Córrego Dantas, 9 – Uberaba, 10 - Patrocínio, 11 – Guimarães, 12 – Patos de Minas, 13 – Brasilândia de Minas, 14 – Dom Bosco.

III.2. Extração de DNA

A extração do DNA total das operárias foi realizada conforme o protocolo recomendado por Waldschmidt et al. (1997). A cabeça e o mesossoma de cada indivíduo foram macerados em gral de porcelana contendo 1 ml de tampão de extração gelado constituído de: CTAB 2% (Hexadecil Trimetil Brometo de Amônio); EDTA (Ácido Tetraacético Diamina Etileno) 20 mM (pH 8,0); NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM (pH 8,0) e 100 µg/ml de protease. O macerado foi incubado a 65 °C por 30 min. A desproteínização foi feita com 1 volume de clorofórmio por duas vezes. Após cada desproteínização o macerado foi centrifugado a 13.000 rpm por 8 min em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5415C. A precipitação do ácido nucléico foi feita com 1 volume de isopropanol seguida de incubação a -20°C por 2 a 24 hs. O material foi então submetido a centrifugação a 14.000 rpm por 30 min e o precipitado formado foi lavado duas vezes com etanol 70% e seco à temperatura ambiente. O ácido nucléico foi ressuscitado em 100 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0). Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0,2 µg/ml de brometo de etídio, para se verificar a integridade e pureza do DNA extraído.

III.3. Amplificação do DNA

O DNA extraído foi amplificado conforme metodologia descrita por Peters et al. (1998), com algumas modificações nas temperaturas de pareamento dos “primers” (Tabela 2). As seqüências dos nove “primers” microssatélites utilizados no presente estudo encontram-se descritas na literatura para a espécie *Melipona bicolor* (Peters et al., 1998).

A mistura de reação de 10 µL consistiu de: 0,1 mM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 2,5 µM de cada “primer”; 0,5 unidade de *Taq* polimerase em tampão 1x e 10 ng de DNA total. A mistura foi incubada em termociclador modelo PTC – 100 (MJ Research). O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial

a 94 °C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos (desnaturação a 92 °C por 30 segundos, pareamento com temperatura específica para cada “primer” por 1 minuto e alongação a 72 °C por 30 segundos). Foi feito ao final desses ciclos, um passo extra de alongação a 72 °C por 5 min.

Tabela 2: Descrição dos locos de microssatélites e seqüência dos “primers” utilizados.

Locos		“Primers” (5' ® 3')*	Ta¹ (°C)*	Ta² (°C)*
Mbi32	F	CTTTATCCGGTGCCTCGAA	57,5	57,5
	R	GAAGGCATTCCGGGTTGTT		
Mbi215	F	AGAGACGAAAAGTGGCGG	57,5	57,5
	R	GATAGCGGCGGAAGAGATT		
Mbi218	F	CTCGACTTAATTTCCATCGGC	60	63
	R	GCAATTTCAATCGCGACC		
Mbi232	F	TTTTTCTCTTAAATTTTCTTCT	50	50
	R	CTTACTCGACGACTTTATTT		
Mbi233	F	ACGAGCACGGGCCATAA	57,5	57,5
	R	GATCCATCGACCGCTTCTT		
Mbi254	F	CAATCGTTGGAAGGGAAC	55	64
	R	GGACCTATACCCAAGTCCAT		
Mbi256	F	GGATTCAAGCAGACGATA	57,5	57,5
	R	GATCAAAGTCCCCATCTT		
Mbi259	F	CGACGTTAACATTTTCGCTA	57,5	60
	R	CTGTTCGACTGTTCTCACTCT		
Mbi278	F	GTTTCGTGTTTCGTGGTGAAT	60	60
	R	GTTGCGGAGAACTCTGACGAT		

* F: “primer” Forward. R: “primer” Reverse. Ta¹: temperatura de pareamento sugerida em literatura. Ta²: Temperatura de pareamento utilizada nos experimentos.

Os produtos das ampliações foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 8%, e visualizados através de coloração com nitrato de prata 0,2%. Para isso, primeiramente o gel era fixado por 10 minutos (etanol absoluto 10% e ácido acético 0,5%). Em seguida o gel era colocado em solução de nitrato de prata 0,2% por 10 minutos. Após esse tempo era feita uma lavagem em água destilada por um minuto e o gel era submetido à revelação em solução reveladora 3% NaOH e 0,6 % formol até o aparecimento das bandas. O revelador era descartado e adicionava-se o fixador para interromper a revelação. Todas as etapas foram feitas sob leve agitação.

III.4 Clonagem e seqüenciamento

Considerando-se que no presente trabalho foram utilizados “primers” heterólogos, um indivíduo de *M. mondury* e um de *M. rufiventris* foram tomados, aleatoriamente, para ter seus locos seqüenciados para se ter certeza de que as regiões amplificadas correspondiam à regiões microssatélites.

As regiões microssatélites foram amplificadas e separadas em gel de agarose 2,0% (p/v) contendo brometo de etídio (0,2 µg/ml). O DNA foi visualizado sob luz ultravioleta, extraído do gel de agarose e purificado usando o “Kit Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System” (Promega). Os fragmentos de DNA purificados foram ligados no vetor pGEM®-T Easy (Promega), conforme recomendações do fabricante. Aliquotas de 200 µL de células competentes de *E. coli* DH5α (Inoue et al., 1990) foram incubadas com aproximadamente 50 ng de plasmídeo recombinante por 20 min no gelo. Após choque térmico a 42 °C por 50 segundos, a mistura foi incubada no gelo por 2 minutos. À temperatura ambiente, 800 µL de meio SOC foram acrescentados, seguindo-se uma incubação a 37 °C sob agitação por uma hora. O meio SOC é composto por meio SOB (20 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 0,5 g de NaCl para 1L de meio) acrescido de 10 mL de KCl 0,25M, 5 mL de MgSO₄ 2M, 100 mL de NaOH 5M e 20 mL de glicose 1M. As células transformadas foram inoculadas em meio LB-ágar/ampicilina/X-Gal e

incubadas durante a noite, a 37 °C. Colônias brancas, foram inoculadas em meio LB líquido contendo ampicilina (50 µg/mL) e incubadas durante a noite a 37°C. Os plasmídios recombinantes foram extraídos utilizando-se o método de lise alcalina, conforme Sambrook et al. (1989).

Para verificar se os plasmídios apresentavam o inserto, uma alíquota de plasmídios foi digerida com 10U da enzima *EcoR* I, a qual possui dois sítios de restrição que flanqueiam o inserto, de forma que após a digestão o inserto é liberado. As reações de digestão foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% (p/v). Os clones nos quais o fragmento excisado apresentou um tamanho semelhante ao do microssatélite correspondente, foram considerados positivos e sequenciados.

O sequenciamento foi feito com base na técnica de terminação em cadeia por dideoxinucleotídeos (ddNTPs) descrita por Sanger et al. (1977) utilizando um sequenciador automático modelo “ABI PRISM 310”.

III.5. Análises de dados

Inicialmente, as análises foram realizadas considerando-se dois grupos: o primeiro formado pelas colônias coletadas nas regiões de mata (*M. mondury*) e o segundo formado pelas colônias de cerrado (*M. rufiventris*).

O desvio dos locos microssatélites quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado pelo teste χ^2 . Os seguintes estimadores de diversidade foram calculados: freqüências alélicas, porcentagem de locos polimórficos (P), número médio de alelos por locos (A), heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade não-viesada de Nei (1978) (H_e). A heterozigosidade não-viesada é apropriada para análises, nas quais foram amostrados poucos indivíduos da população (Nei,1978). A distância genética entre pares de colônias foi calculada usando-se a distância genética de Nei (Nei, 1978). Na seqüência, as matrizes de distância genética foram submetidas a uma análise de cluster, utilizando-se o algoritmo UPGMA e a uma análise de escala multidimensional (MDS), pelo algoritmo de Coordenadas Principais (Dias, 1998).

Posteriormente, as colônias foram agrupadas por localidade e as estatísticas F de Wright (Wright, 1978) foram utilizadas para analisar a estrutura genética da população através de três parâmetros. Estes, medem os desvios das frequências alélicas entre subpopulações (F_{ST}), em nível de indivíduo dentro da subpopulação (F_{IS}) e em relação à população total (F_{IT}). F_{IS} e F_{IT} podem apresentar valores positivos ou negativos, o que indica uma deficiência ou excesso de heterozigotos, respectivamente. O mesmo não ocorre com F_{ST} que apresenta somente valores positivos.

Todas essas análises foram realizadas utilizando-se o programa Popgene versão 1.32 (Yeh et al., 1999) e Statistica 5.0 (StatSoft, 1997).

IV. RESULTADOS

IV.1. Análise populacional

O dendrograma obtido a partir das distâncias genéticas entre as colônias analisadas (Figura 2) demonstrou a existência de dois grupos distintos: o primeiro constituído pelas colônias provenientes de regiões de mata (*M. mondury*) e o segundo formado pelas colônias provenientes de regiões de cerrado (*M. rufiventris*). Verificou-se ainda, que o segundo grupo pode ser dividido em dois subgrupos, sendo um formado pelas colônias provenientes de Brasilândia de Minas/Dom Bosco e o outro pelas colônias das demais regiões de cerrado. A presença destes três grupos pode ser confirmada analisando-se o Biplot de MDS para as distâncias genéticas entre as 45 colônias analisadas (Figura 3).

Considerando-se esse resultado e outros dados obtidos em nosso laboratório por meio da análise de outros marcadores moleculares utilizando as mesmas colônias, os quais sugerem que a “forma” encontrada na região de Brasilândia de Minas/Dom Bosco seja possivelmente uma outra espécie que está sendo chamada de *Melipona rufiventris*, no presente trabalho optou-se por apresentar, em separado, os dados obtidos para este terceiro grupo. Na espécie *Melipona mondury*, dos nove locos microssatélites analisados, três (Mbi232, Mbi233 e Mbi254) foram polimórficos ($P = 33,3\%$), apresentando 2, 4 e 3 alelos, respectivamente (Tabela 3).

Melipona rufiventris também apresentou 33,3% de locos polimórficos. Nesta espécie, os locos polimórficos foram o Mbi218, Mbi 233 e Mbi 254. Os locos Mbi218 e Mbi254 apresentaram 4 alelos cada, enquanto o loco Mbi233 apresentou apenas 2 alelos (Tabela 3).

No grupo formado pelas colônias provenientes de Brasilândia de Minas/Dom Bosco verificou-se que, apenas dois (Mb215 e Mbi232) dentre os nove locos estudados apresentaram polimorfismo ($P = 22,22\%$) (Tabela 3). O teste de χ^2 realizado para verificar se as amostras dos três grupos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, revelou um desvio das frequências esperadas com probabilidade $P < 0,05$ em alguns locos (Tabela 4) quando forma analisados cinco indivíduos/colônia. Posteriormente, foi realizada uma

análise com apenas um indivíduo de cada colônia, para verificar se ocorria alguma alteração nos desvios encontrados. Pôde-se verificar, que somente o loco Mbi232 na população de Brasilândia de Minas/Dom Bosco apresentou desvios das proporções esperadas. Os demais estimadores não sofreram grandes variações, quando se analisou um indivíduo/colônia, porém, um alelo que apresentava baixa frequência não foi observado nessa situação (Tabela 5). Assim, os resultados apresentados serão para as análises com cinco indivíduos/colônia.

O número de alelos encontrado em *M. mondury* (15) foi muito próximo daquele observado em *M. rufiventris* (16). Já nas colônias provenientes de Brasilândia de Minas/Dom Bosco observaram-se 11 alelos. O número médio de alelos por loco (A) em *M. mondury* foi de 1,67 e em *M. rufiventris* foi de 1,78, enquanto nas colônias provenientes de Brasilândia de Minas/Dom Bosco o valor encontrado foi menor (A = 1,22). As frequências alélicas para os diferentes locos encontram-se na Tabela 3.

A combinação destes alelos permitiu o reconhecimento de 22, 20 e 11 genótipos diferentes em *M. mondury*, *M. rufiventris* e nas colônias provenientes de Brasilândia de Minas/Dom Bosco, respectivamente (Tabela 6). Foi possível observar a presença de indivíduos heterozigotos para nove genótipos em *M. mondury*, sete em *M. rufiventris* e apenas um nas colônias provenientes de Brasilândia de Minas/Dom Bosco. Alguns dos genótipos encontrados estão representados nas Figuras 4 a 7.

Com relação aos valores médios de H_o e H_e (Tabela 3), verificou-se que *M. mondury* apresentou valor de H_o (0,1159) maior do que os valores encontrados para *M. rufiventris* (0,0684) e para o terceiro grupo (0,0222). Da mesma forma, o valor de H_e foi maior para as colônias de *M. mondury* (0,1461) do que para as colônias de *M. rufiventris* (0,0770) e do terceiro grupo (0,0733).

Quando se analisou cada localidade individualmente pôde-se verificar que a proporção de locos polimórficos variou, de localidade para localidade, dentro de cada grupo (Tabelas 7 a 9). Três locos (Mbi232, Mbi233 e Mbi254) foram polimórficos nas localidades provenientes de mata (*M. mondury*). Porém, apenas em Marliéria, de onde se analisou uma única colônia, observou-se variação nos três locos ao mesmo tempo. As localidades de

Resende Costa e Coluna, por sua vez, apresentaram dois locos polimórficos cada, enquanto apenas um loco polimórfico foi observado em Itamarandiba. Já no grupo de cerrado (*M. rufiventris*) os locos polimórficos foram o Mbi218, Mbi233 e Mbi254 e somente a cidade de Uberaba apresentou polimorfismo nos três locos. A localidade de Formiga, por outro lado, foi monomórfica para todos os locos analisados. No grupo de Brasilândia de Minas/Dom Bosco, o loco Mbi232 foi polimórfico na localidade de Brasilândia de Minas e o loco Mbi215 em Dom Bosco.

Os valores de F_{st} encontrados para as espécies *Melipona mondury* e *Melipona rufiventris* (0,205 e 0,253, respectivamente) foram altos, mostrando que existem diferenças relevantes entre cada localidade. Foram encontrados valores negativos para F_{IS} tanto em *M. mondury* quanto em *M. rufiventris*, o que revela um excesso de heterozigotos em relação às subpopulações. Porém, em relação à toda população, verifica-se uma deficiência de heterozigotos pelos valores positivos de F_{IT} encontrados (Tabela 10). Esses índices não foram calculados para o grupo formado pelas colônias provenientes de Brasilândia de Minas/Dom Bosco, porque o número de colônias amostradas foi muito pequeno.

IV.2. Análises de sequenciamento

Um indivíduo de *M. mondury* e um de *M. rufiventris* foram tomados, ao acaso, para ter seus nove locos microssatélites sequenciados. No entanto, conseguimos sequenciar apenas quatro locos de *M. mondury* (Tabela 11) e quatro de *M. rufiventris* (Tabela 12). A análise das seqüências obtidas confirmou que os fragmentos de DNA amplificados continham regiões microssatélites descritas para *Melipona bicolor* (Peters et al., 1998) e a comparação de nossas seqüências com aquelas disponíveis no banco de dados do BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) confirmaram a alta similaridade com as seqüências publicadas de *M. bicolor*, sendo, portanto, mais uma confirmação de que realmente trabalhamos com microssatélites.

Em *M. mondury* e em *M. rufiventris*, o loco Mbi32 apresentou as repetições (GGA)₂(GGAGAA)₂. O loco Mbi215 foi sequenciado apenas em *M. rufiventris*, sendo constituído pelas repetições (TTC)₆. Já o loco Mbi232 foi sequenciado apenas em *M. mondury* apresentando 13 repetições (CTT) que são interrompidas por uma trinca de timina.

Em *M. mondury*, o loco Mbi254 é um microssatélite constituído pela repetição (AAG)₁₅, enquanto em *M. rufiventris*, ele é constituído pela repetição (AAG)₁₁.

O loco Mbi259, por sua vez, pode ser caracterizado como um microssatélite interrompido, apresentando, nas duas espécies, a mesma seqüência: (AGA)₃GG(AGA)₂A(GGA)₂.

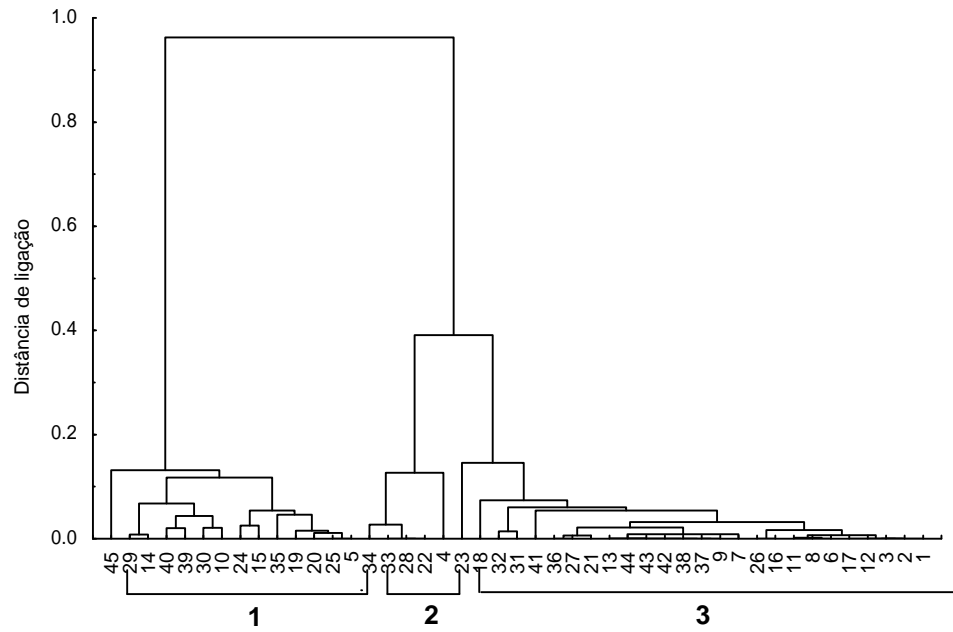


Figura 2. Dendrograma UPGMA construído com base nas distâncias genéticas de Nei (1978) entre as 45 colônias analisadas. 1 - *Melipona mondury*, 2 - Brasilândia de Minas/Dom Bosco e 3 - *Melipona rufiventris*.

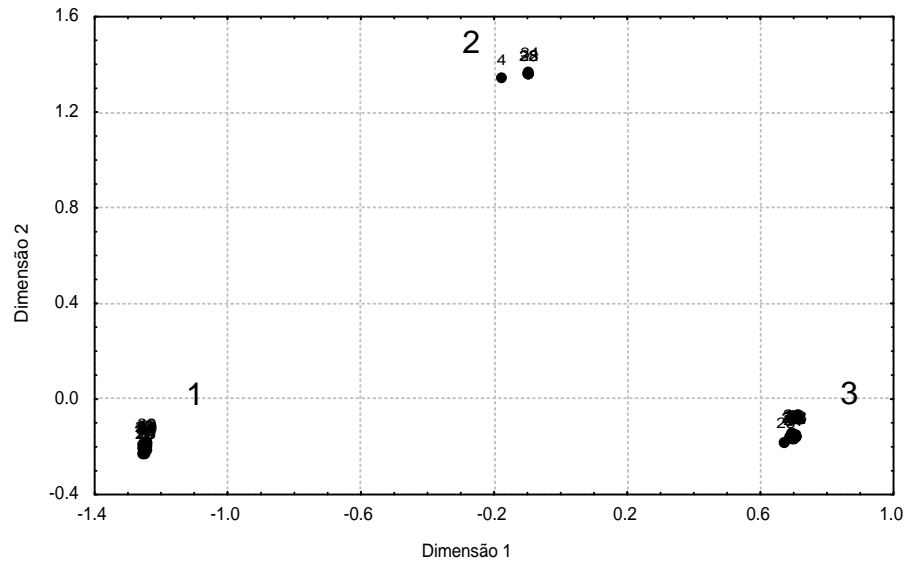


Figura 3: Biplot de MDS para as distâncias genéticas entre 45 colônias de *Melipona* analisadas, construído com base nas frequências alélicas de nove locos microssatélites. 1 – *Melipona mondury*, 2 - Brasilândia de Minas/Dom Bosco e 3 – *Melipona rufiventris*.

Tabela 3: Freqüências alélicas e heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e) para os nove locos microssatélites nas análises com cinco indivíduos por colônia. Entre parênteses são apresentados os valores de desvio padrão.

Loco	Alelo	<i>M. mondury</i>	<i>M. rufiventris</i>	Brasilândia de Minas/Dom Bosco
Mbi32	A		1,000	1,000
	B	1,000		
Mbi215	A			0,100
	B	1,000	1,000	0,900
Mbi218	A			1,000
	B		0,873	
	C		0,019	
	D		0,062	
	E	1,000	0,046	
Mbi232	A		1,000	0,600
	B	0,978		0,400
	C	0,022		
Mbi233	A		0,008	1,000
	B		0,992	
	C	0,123		
	D	0,058		
	E	0,500		
	F	0,319		
Mbi254	A		0,704	
	B		0,031	
	C	0,457	0,238	1,000
	D	0,246		
	E	0,297	0,027	
Mbi256	A	1,000	1,000	1,000
Mbi259	A	1,000	1,000	1,000
Mbi278	A		1,000	1,000
	B	1,000		
H_o		0,1159 (0,2336)	0,0684 (0,1393)	0,0222 (0,0667)
H_e		0,1461 (0,2782)	0,0770 (0,1579)	0,0733 (0,1637)

Tabela 4: Valores de χ^2 e probabilidade (P) para os nove locos microssatélites analisados em *Melipona mondury*, *Melipona rufiventris* e no grupo formado pelas colônias provenientes de Brasilândia de Minas/Dom Bosco.

Loco	<i>M. mondury</i>		<i>M. rufiventris</i>		Brasilândia/ Dom Bosco	
	χ^2	P	c^2	P	c^2	P
Mbi32	-	-	-	-	-	-
Mbi215	-	-	-	-	0,2424	0,6225
Mbi218	-	-	16,9232	0,0096	-	-
Mbi232	0,0225	0,8806	-	-	26,1343	0,0000
Mbi233	44,7818	0,0000	0,0039	0,9503	-	-
Mbi254	2,4714	0,4805	129,9270	0,0000	-	-
Mbi256	-	-	-	-	-	-
Mbi259	-	-	-	-	-	-
Mbi278	-	-	-	-	-	-

Tabela 5: Freqüências alélicas e heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e) para os nove locos microssatélites nas análises com um indivíduo por colônia. Entre parênteses são apresentados os valores de desvio padrão.

Loco	Alelo	<i>M. mondury</i>	<i>M. rufiventris</i>	Brasilândia de Minas/Dom Bosco
Mbi32	A		1,000	1,000
	B	1,000		
Mbi215	A			0,100
	B	1,000	1,000	0,900
Mbi218	A			1,000
	B		0,923	
	C		0,019	
	D		0,039	
	E	1,000	0,019	
Mbi232	A		1,000	0,600
	B	0,9643		0,400
	C	0,0357		
Mbi233	A			1,000
	B		1,000	
	C	0,178		
	D	0,036		
	E	0,500		
	F	0,286		
Mbi254	A		0,712	
	B		0,019	
	C	0,464	0,250	1,000
	D	0,214		
	E	0,322	0,019	
Mbi256	A	1,000	1,000	1,000
Mbi259	A	1,000	1,000	1,000
Mbi278	A		1,000	1,000
	B	1,000		
H_o		0,1270 (0,2390)	0,0556 (0,1203)	0,0222 (0,0667)
H_e		0,1488 (0,2767)	0,0640 (0,1456)	0,0733 (0,1637)

Tabela 6: Genótipos observados nos nove locos microssatélites analisados.

Loco	<i>M. mondury</i>	<i>M. rufiventris</i>	Brasilândia de Minas/Dom Bosco
Mbi32	BB	AA	AA
Mbi215	BB	BB	AB BB
Mbi218	EE	BB BC BD BE DD	AA
Mbi232	BB BC	AA	AA BB
Mbi233	CC CE CF DE DF EE EF FF	AB BB	AA
Mbi254	CC CD CE DD DE EE	AA AB AC AE BB CC EE	CC
Mbi256	AA	AA	AA
Mbi259	AA	AA	AA
Mbi278	BB	AA	AA

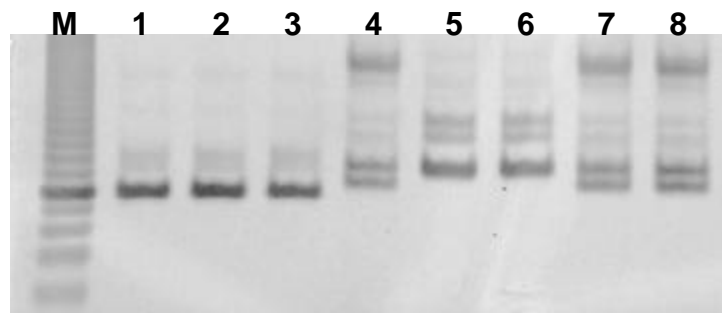


Figura 4: Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida 8% mostrando alguns dos genótipos observados para o loco Mbi233. M: marcador de peso molecular. 1-3: Operárias de *Melipona rufiventris*. 4-8: operárias de *M. mondury*.

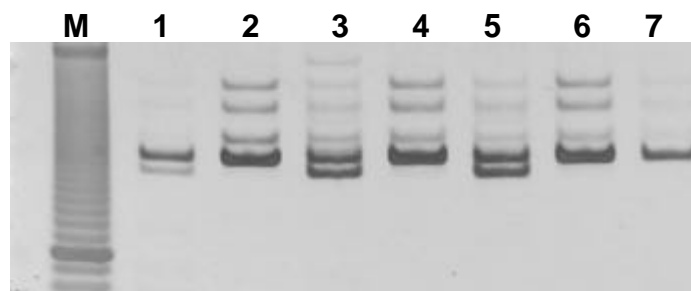


Figura 5: Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida 8% mostrando alguns dos genótipos para o loco Mbi254. M: marcador de peso molecular. 1-7: Operárias de *Melipona rufiventris*

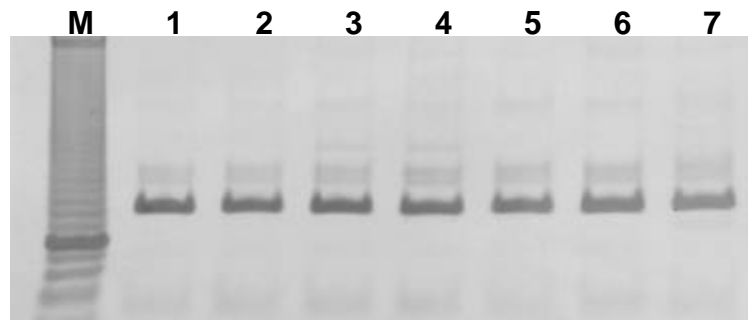


Figura 6: Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida 8% mostrando alguns dos genótipos para o loco Mbi256. M: marcador de peso molecular. 1-3: Operárias de *Melipona rufiventris*. 4-7: operárias de *M. mondury*.

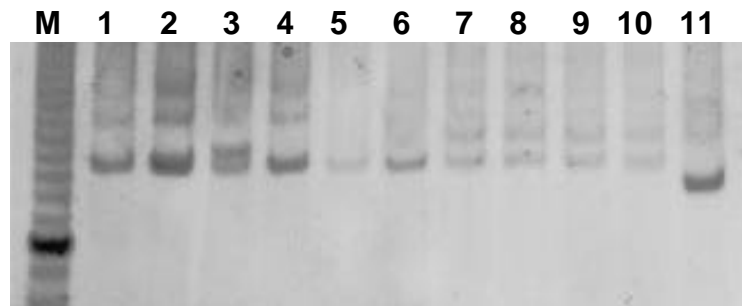


Figura 7: Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida 8% mostrando alguns dos genótipos para o loco Mbi218. M: marcador de peso molecular. 1-11: Operárias de *Melipona rufiventris*.

Tabela 7: Alelos observados em cada loco microsatélite nas localidades de mata.

Loco	Marliéria	Coluna	Itamarandiba	Resende Costa
Mbi32	B	B	B	B
Mbi215	B	B	B	B
Mbi218	E	E	E	E
Mbi232	B C	B	B	B
Mbi233	C D F	C E F	E	C D E F
Mbi254	C D	C D E	C D E	C D E
Mbi256	A	A	A	A
Mbi259	A	A	A	A
Mbi278	B	B	B	B

Tabela 9: Alelos observados em cada loco microssatélite nas localidades de Brasilândia de Minas/Dom Bosco.

Loco	Brasilândia de Minas	Dom Bosco
Mbi32	A	A
Mbi215	B	A B
Mbi218	A	A
Mbi232	A B	A
Mbi233	A	A
Mbi254	C	C
Mbi256	A	A
Mbi259	A	A
Mbi278	A	A

Tabela 10: Estimativa da estatística F de Wright para as colônias de *M. mondury* e *M. rufiventris* considerando-se cada localidade como uma subpopulação. N: Tamanho amostral.

Loco	<i>M. mondury</i> (N=138)			<i>M. rufiventris</i> (N=260)		
	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
Mbi32	-	-	0,000	-	-	0,000
Mbi215	-	-	0,000	-	-	0,000
Mbi218	-	-	0,000	-0,284	0,102	0,301
Mbi232	-0,429	-0,081	0,243	-	-	0,000
Mbi233	0,071	0,356	0,307	-0,111	-0,013	0,088
Mbi254	-0,270	-0,141	0,102	-0,033	0,207	0,233
Mbi256	-	-	0,000	-	-	0,000
Mbi259	-	-	0,000	-	-	0,000
Mbi278	-	-	0,000	-	-	0,000
Média	-0,1329	0,099	0,205	-0,114	0,167	0,253

V. DISCUSSÃO

A formação de dois grupos quando todas as amostras foram analisadas conjuntamente através da análise de UPGMA já era esperada, visto que estudos anteriores (Busse et al., 2003, Costa, 2003, Melo 2003 e Schetino et al., 2003) demonstraram que em Minas Gerais existem, pelo menos, duas espécies de *Melipona* sendo chamadas de *M. rufiventris*. A partir da publicação de Melo (2003), a espécie encontrada em regiões de mata Atlântica, de Santa Catarina a Bahia, passou a ser denominada de *M. mondury* e *M. rufiventris* é considerada a espécie encontrada em regiões de cerrado (noroeste de São Paulo, oeste de Minas Gerais, sul de Goiás e Mato Grosso do Sul).

Os resultados obtidos por Busse et al. (2003), Costa (2003) e Schetino et al. (2003) demonstraram ainda, que no cerrado, a “forma” encontrada na região de Brasilândia de Minas/Dom Bosco pode representar uma zona híbrida ou, alternativamente, que seja uma terceira espécie sendo chamada de *M. rufiventris* em Minas Gerais. No presente estudo, quando as colônias de Brasilândia de Minas/Dom Bosco foram colocadas juntas com as outras colônias de cerrado na análise de agrupamento, observou-se que elas formavam um grupo separado das demais colônias de cerrado. Enquanto, que no presente trabalho, as colônias provenientes de Brasilândia de Minas/Dom Bosco formaram um grupo mais próximo às colônias de cerrado, Costa (2003) e Busse et al. (2003) verificaram uma maior proximidade dessas colônias com a espécie encontrada em regiões de mata (*M. mondury*).

A análise de microssatélites demonstrou, também, alto grau de polimorfismo em comparação com outros marcadores moleculares. Costa (2003), por exemplo, trabalhando com marcadores enzimáticos analisou 17 locos em colônias de *Melipona rufiventris* e *M. mondury* do estado de Minas Gerais, encontrando polimorfismo em apenas seis deles ($P = 35,29\%$). Embora analisando um número diferente de colônias, o grau de polimorfismo encontrado na presente análise foi de 77,78%.

Com relação aos locos polimórficos, no presente trabalho verificou-se que alguns alelos foram encontrados exclusivamente em indivíduos de uma

determinada espécie (*M. rufiventris* ou *M. mondury*), o que evidencia a diferenciação genética existente entre elas. No loco Mbi32, por exemplo, o alelo A foi característico para as colônias de *M. rufiventris* e as de Brasilândia de Minas/Dom Bosco, enquanto o alelo B foi encontrado somente em indivíduos de *M. mondury*. O mesmo foi observado para alelos dos locos Mbi218, Mbi232, Mbi233, Mbi254 e Mbi278. Já no loco Mbi215 e Mbi218, o alelo A foi observado apenas em colônias oriundas de Brasilândia de Minas/Dom Bosco.

As colônias provenientes de Brasilândia de Minas/Dom Bosco apresentaram no loco Mbi232 alelos comuns ora aos indivíduos de *M. rufiventris* ora aos de *M. mondury*. Nos outros locos, os genótipos encontrados nas colônias dessa região eram semelhantes aos encontrados em *M. rufiventris*. Costa (2003) também encontrou um padrão intermediário para a *Est-4* nas colônias de Brasilândia de Minas. A presença desses genótipos intermediários reforça a hipótese dessa região ser uma zona híbrida ou a região de localização de uma outra espécie de *Melipona* que está sendo chamada de *M. rufiventris* em Minas Gerais.

O teste de χ^2 revelou um desvio das frequências genotípicas esperadas com probabilidade $P < 0,05$ para alguns locos nas populações. O pequeno tamanho amostral é um dos fatores que poderia estar causando esse desvio, pois, alguns alelos ou genótipos podem não ter sido detectados devido ao número de indivíduos analisados. A melhor maneira de aumentar o tamanho da amostra seria aumentando o número de colônias analisadas e não de indivíduos/colônia. Nos meliponíneos, os machos são haplóides e as fêmeas diplóides e, na grande maioria das espécies, a fêmea reprodutora acasala-se com apenas um macho (Strassmann, 2001). Assim, todas as operárias filhas desse cruzamento apresentam um alelo comum vindo do pai e um outro vindo da mãe. Dessa forma, no máximo três alelos poderão ser encontrados em cada colônia caso a rainha seja heterozigota (e o macho apresentar um alelo diferente ao da rainha) para o loco microssatélite em análise e se a rainha for homozigota para tal loco, todas as filhas apresentarão o mesmo genótipo. Portanto, não há necessidade de se analisar, via microssatélites, um grande número de indivíduos da mesma colônia.

No presente trabalho, entretanto, houve dificuldades para se coletar ou mesmo obter amostras de colônias de *M. mondury* (devido à grande redução de suas populações no estado de Minas Gerais) o que fez com que o número de colônias analisadas desta espécie fosse bem menor em comparação ao número de colônias de *M. rufiventris* analisadas. As análises realizadas, embora suficientes para diferenciar essas duas espécies devem ser ampliadas conforme novas amostras forem obtidas.

Adicionalmente, o tipo de reprodução apresentado pelos meliponíneos faz com que os indivíduos dentro da colônia sejam muito aparentados. Assim, amostras contendo vários indivíduos da mesma colônia, ou seja, indivíduos altamente aparentados, poderiam apresentar resultados semelhantes àqueles mostrados por populações endogâmicas, levando a alterações nas proporções genotípicas esperadas no equilíbrio. Como foram utilizados cinco indivíduos de cada colônia, esse grau de parentesco dentro da amostra poderia estar ocasionando os desvios nas proporções genotípicas encontradas.

No presente trabalho, uma análise com apenas um indivíduo/colônia também foi realizada a fim de verificar se ocorria alguma alteração nos desvios encontrados e foi observado que todos os locos estavam em equilíbrio nessa condição. Os resultados obtidos nessa análise mostram que o parentesco entre os indivíduos pode ser um fator importante para explicar as variações encontradas.

Francisco (2002) também encontrou desvios significantes em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg quando analisou cinco indivíduos/colônia de *Plebeia remota*, coletadas em quatro estados brasileiros. Entretanto, quando o referido autor analisou apenas um indivíduo/colônia, verificou que as populações estavam em equilíbrio e que os outros estimadores não variavam muito, apesar da redução no tamanho amostral.

De maneira geral, a porcentagem de locos polimórficos encontrada nesta análise ($P = 33,33\%$ para *M. rufiventris* e *M. mondury* e $P = 22,2\%$ para Brasilândia de Minas/Dom Bosco) foi pequena quando comparada com a de outros himenópteros. Peters et al. (1999), por exemplo, encontraram 76% de polimorfismo em *Melipona bicolor*. Strassmann et al. (1997) observaram polimorfismo nos 18 locos analisados na vespa *Polistes bellicosus* e somente

um loco entre 8 na espécie *Polistes annularis* foi monomórfico. O mesmo foi observado na formiga *Solenopsis invicta*, na qual os sete locos microssatélites estudados foram polimórficos (Ross et al., 1999). Nos trabalhos citados, entretanto, os “primers” utilizados foram construídos especificamente para a espécie estudada, sendo que no presente estudo, devido a inexistência de “primers” específicos para *M. mondury* ou *M. rufiventris*, foram utilizados “primers” heterólogos construídos para *M. bicolor*.

Segundo Pépin et al. (1995), o uso de “primers” heterólogos pode ocasionar uma perda de polimorfismo. Mutações nos sítios de ligação dos “primers” podem levar a uma não amplificação de alelos, ocasionando os chamados alelos nulos (Callen et al., 1993). Nesse caso um indivíduo heterozigoto que possua um alelo nulo seria erroneamente considerado homozigoto.

Verificou-se ainda, que um dos locos que apresentou alguns genótipos heterozigotos nas colônias provenientes de Brasilândia de Minas/Dom Bosco, apresentava alelos exclusivos e apenas genótipos homozigotos em *M. rufiventris* ou em *M. mondury*. Este fato reforça a hipótese de que, em Brasilândia de Minas/Dom Bosco, indivíduos das espécies *M. rufiventris* e *M. mondury* tenham se acasalado e formado uma zona híbrida entre as duas espécies. Por outro lado, nos locos Mbi215 e Mbi218, o alelo A só foi encontrado nas colônias provenientes de Brasilândia de Minas/Dom Bosco. Se, essas localidades representassem uma região híbrida, esse alelo deveria ser, a princípio, encontrado também nas colônias de *M. rufiventris* e nas de *M. mondury*, o que sugere, alternativamente, que a “forma” encontrada nessa região represente outra espécie e não um híbrido entre *M. rufiventris* e *M. mondury*.

Estudos realizados com marcadores RAPD (Borges, comunicação pessoal) demonstraram que as colônias provenientes de Brasilândia de Minas/Dom Bosco, juntamente com as colônias provenientes do estado do Maranhão formaram um grupo separado daqueles formados pelas espécies *M. rufiventris* e *M. mondury*, quando submetidas à análise de agrupamento. Esses dados reforçam a hipótese de que os indivíduos encontrados na região Brasilândia de Minas/Dom Bosco poderiam ser uma outra espécie de

Melipona. Porém estudos mais detalhados deverão ser feitos, a fim de verificar o verdadeiro “status” dessa população.

O número de alelos encontrado por loco, no presente trabalho, variou de 1 a 6, sendo o loco Mbi233 o que apresentou um maior número de alelos. Segundo Pépin et al. (1995) microssatélites perfeitos possuem mais alelos do que microssatélites interrompidos com o mesmo número de repetições, pois as interrupções parecem dar maior estabilidade às regiões microssatélites resultando em nível mais baixo de polimorfismo. Schilder et al. (1999), entretanto, não encontraram relação entre polimorfismo e presença/ausência de interrupções nos microssatélites.

Nos microssatélites sequenciados, no presente trabalho, pode-se observar essa relação entre interrupções e números de alelos. Por exemplo, o loco Mbi254 constituído de um microssatélite perfeito apresentou 5 alelos considerando *Melipona mondury* e *M. rufiventris*, enquanto que no loco Mbi259, que apresenta interrupções, foi observado apenas um alelo nas duas espécies. O mesmo foi observado em relação ao loco Mbi232, que apresenta uma interrupção na região microssatélite em *M. mondury*, sendo observados dois alelos nessa espécie, enquanto em *M. bicolor*, na qual ele não apresenta interrupções, foram encontrados quatro alelos.

Com relação aos demais locos sequenciados, verificou-se que, o polimorfismo apresentado pelo loco Mbi254 nas duas espécies estava relacionado com variações no número de repetições do microssatélite, diferente do que foi visto no loco Mbi32. Este apresentou dois alelos, sendo um característico de mata e o outro de cerrado. Porém, a diferença entre os alelos foi causada por uma inserção ou deleção de bases em uma região fora do microssatélite. O loco Mbi215 constituído pela repetição (TTC)₆, por sua vez, foi idêntico ao de *M. bicolor* (Peters et al., 1998) e também ao de *Plebeia remota* (Francisco, 2002). Já o loco Mbi32 apresentou variação com uma diminuição do número de repetições em relação à *M. bicolor* (Peters et al., 1998).

O número de alelos encontrados em cada loco nesse trabalho foi diferente de *Melipona bicolor*, sendo que, com exceção do loco Mbi254, nos outros locos foram encontrados um menor número de alelos.

O número médio de alelos por loco (A) nos três grupos foi próximo ao encontrado em *Plebeia remota* (1,6 – 2,6) (Francisco, 2002). Esses valores, entretanto, diferem daqueles encontrados por Widmer e Schmid-Hempel (1999) em populações de *Bombus pascuorum* presentes no continente europeu, as quais apresentaram uma média de 4,3 – 6,7 alelos por loco. Nos dois estudos mencionados acima, semelhantemente ao que foi feito no presente estudo, foram utilizados “primers” heterólogos. Mais do que o uso de “primers” heterólogos, entretanto, o tamanho amostral pode ter interferido nesta estimativa, pois o número médio de alelo por loco depende do tamanho da amostra, sendo que valores maiores são encontrados em estudos onde uma grande quantidade de indivíduos são analisados (Nei, 1987). Assim, observou-se que, *Melipona rufiventris*, espécie que teve maior número de colônias analisadas, apresentou o maior número médio de alelos por loco ($A = 1,78$) enquanto o grupo formado pelas colônias provenientes de Brasilândia de Minas/Dom Bosco, que teve pequeno número de indivíduos amostrados, apresentou o menor número médio de alelos por loco ($A = 1,22$).

Os valores encontrados para a heterozigosidade média observada (H_o) nos três grupos foram, comparativamente, menor do que o verificado em outras espécies de abelhas (Estoup et al., 1995; Widmer et al., 1998; Widmer e Schmid-Hempel, 1999; Francisco, 2002). Essa baixa heterozigosidade resulta da presença de muitos locos monomórficos nos três grupos analisados. Essa grande quantidade de locos monomórficos pode estar relacionada com a utilização de “primers” heterólogos, como já foi comentado anteriormente, sendo que estudos com “primers” espécie-específicos poderiam mostrar se, realmente, essas populações apresentam uma baixa heterozigosidade ou se os valores encontrados são causados por outros fatores. Alternativamente, como as populações analisadas no presente trabalho são consideradas ameaçadas de extinção no estado de Minas Gerais (Campos, 1998), apresentando-se constituída por pequenas populações locais, a redução populacional poderia estar levando a uma redução na variabilidade genética por endogamia e/ou deriva genética. Comparações com regiões onde estas espécies são encontradas em maior abundância poderiam ser úteis para esclarecer se essa baixa variabilidade é causada pela redução no tamanho populacional.

Ao se analisar cada cidade individualmente, nem sempre foi observada a mesma proporção de locos polimórficos encontrada na análise de cada região (mata e cerrado) como um todo. A princípio poderia ser considerado que o tamanho da amostra em cada cidade era pequeno, e por isso nem todos os alelos foram detectados. Porém, em alguns casos as populações nas quais se observou maior porcentagem de locos polimórficos, apresentavam tamanho amostral menor do que outras com baixo polimorfismo. Por exemplo, em apenas uma colônia de Marliéria, que está localizada em região de mata, três locos foram polimórficos, ao passo que cinco colônias de Itamarandiba foram polimórficas apenas para o loco Mbi254. Da mesma forma no cerrado, três locos foram polimórficos, em duas colônias de Uberaba, enquanto Guimarânia, onde nove colônias foram amostradas, foram encontrados apenas dois locos polimórficos. Isso mostra também que em certas populações alguns alelos já estão fixados como é o caso do loco Mbi232. Esse loco apresentou dois alelos (B e C) nas colônias de mata. O alelo C foi encontrado apenas na cidade de Marliéria, enquanto nas outras localidades esse loco estava em homozigose para o alelo B. Portanto, nessa população aparentemente, está ocorrendo uma fixação do alelo B. Por outro lado, o alelo C, pode ter surgido recentemente, na subpopulação de Marliéria e ainda não se expandiu por toda população.

Adicionalmente, o alelo A do loco Mbi215 foi observado somente na cidade de Dom Bosco. Não se sabe se esse alelo já existia na população como um todo e está sendo perdido, ou se é um novo alelo que apareceu nessa localidade. De qualquer forma, as localidades de Dom Bosco e Brasilândia de Minas apresentam características distintas e, portanto, são importantes para a manutenção da estrutura genética da população.

Variações nas frequências alélicas de uma geração para a outra, ocasionando, inclusive a perda ou fixação de um alelo podem ser causadas por deriva genética, a qual está intimamente ligada ao tamanho da população (Futuyma, 1992). Assim, a presença de determinados alelos apenas em uma localidade, reflete a importância de se tentar preservar o maior número possível de colônias dessas abelhas em Minas Gerais.

Nas duas espécies analisadas, os valores de F_{ST} foram altos mostrando que existe uma forte estruturação dentro das subpopulações.

Segundo Wrigth (1978) valores de F_{ST} abaixo de 0,05 indicam baixa estruturação entre as subpopulações; valores de 0,05 a 0,25 indicam que já existe uma alta estruturação e F_{ST} acima de 0,25 revelam que a estruturação existente é muita alta.

A implicação dessa estruturação é muito importante em trabalhos de conservação. Se uma espécie que ocupa uma determinada área encontra-se estruturada, a estratégia de conservação deve procurar preservar a diversidade da área total, pois podem existir adaptações locais que se perderiam caso as subpopulações fossem misturadas com outras. Por outro lado, se a espécie é homogênea dentro de toda sua área de ocupação, as estratégias de conservação podem se concentrar em um determinado local e os indivíduos dessa região serem utilizados para recolonizar outras áreas. Porém, aspectos da biologia da espécie devem também ser considerados a fim de planejar estratégias eficazes para a conservação da espécie.

Um dos objetivos desse trabalho foi a obtenção de dados que possam ser utilizados para estabelecer estratégias que permitam a preservação ou o restabelecimento da integridade genética das populações das espécies analisadas. Assim, a forte estruturação encontrada deve ser levada em consideração na elaboração de planos de conservação. Para essas espécies seria interessante não só a preservação de uma região, como é feita com alguns animais, mas considerar toda sua área de ocupação, pois alelos que são encontrados apenas em uma determinada região poderiam ser perdidos caso essa estruturação não for observada (Solé-Cava, 2001).

VI. CONCLUSÕES GERAIS

- Os microssatélites são marcadores moleculares altamente polimórficos e foram capazes de diferenciar *Melipona mondury* de *M. rufiventris*, apresentando em muitos casos alelos distintos para as duas espécies.
- As populações analisadas apresentam um baixo nível de variabilidade que pode ser consequência da redução populacional, ou devido ao tipo de “primer” utilizado.
- Os altos valores de F_{ST} revelam uma grande estruturação genética entre as subpopulações dessas espécies, fator importante a ser considerado nas estratégias de conservação.
- Os resultados obtidos na análise de agrupamento e alelos encontradas na região de Brasilândia de Minas/Dom Bosco, reforçam a hipótese que a “forma” encontrada nessas localidades seja outra espécie, diferente de *M. rufiventris*.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABSY, M.L.; CAMARGO, J.M.F.; KERR, W.E. & MIRANDA, I.P.A. Espécies de plantas visitadas por Meliponinae (Hym., Apoidea) para coleta de pólen na região do médio Amazonas. **Rev.Brasil.Biol.** **44**(2): 227-237, 1984.
- AMOS,W. Two problems with the measurement of genetic diversity and genetic distance. *In* **Genetics and the extinction of species** (L.F. Landweber e A.P. Dobson,eds.), pp 75-100. Princeton University Press, Princeton, EUA, 1999.
- BEIGUELMAN, B. **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações.** Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 1994.
- BUSSE, A. H. P.; BORGES, A. A., TAVARES, M. G.; CAMPOS, L. A. O. Variabilidade genética em populações de *Melipona rufiventris* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae) no estado de Minas Gerais – Brasil. *In: Anais do 49º Congresso Nacional de Genética.* CD-Rom, 2003.
- CALLEN, D.F., THOMPSON, A.D., SHEN, Y., PHILLIPS, H.A., RICHARDS, R.I., MULLEY, J.C. & SUTHERLAND, G.R. Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers. **American Journal of Human Genetics** **52**: 922-927, 1993.
- CAMARGO, J.M.F. & PEDRO, S.R.M. Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hym., Apidae):a mini review. **Apidologie**, **23**:1-32, 1992.
- CAMPOS, L.A.O. *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836. *In: Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna de Minas Gerais* (Machado, A.B.M.; Fonseca, G.A.B.; Machado, R.B.; Aguiar, L.M.S.; Lins, L.V. ed.). Belo Horizonte, **Biodiversitas**. pp. 560-561, 1998.

- CHAPMAN, T.W. & CRESPI, B. J.. High relatedness and inbreeding in two species of haplodiploid eusocial thrips (Insecta: Thysanoptera) revealed by microsatellite analysis. **Behav Ecol Sociobiol** **43**: 301-306, 1998.
- CHODHARY, M., STRASSMANN, J.E., SOLÍS, C.R. & QUELLER, D.C. Microsatellite variation in a social insect. **Biochem.Genet.** **31(1/2)**, 1993.
- COSTA, C.M.R.; HERRMANN, G.; MARTINS, C.S.; LINS, L.V. & LAMA, I.R. Biodiversidade em Minas Gerais. Um Atlas para sua Conservação. Belo Horizonte, **Biodiversitas**, 1998.
- COSTA, R. G. **Variabilidade genética em populações de *Melipona rufiventris* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) no estado de Minas Gerais – Brasil.** (Dissertação de Mestrado). Viçosa, 2003.
- CURE, J.R.; BASTOS G.S.; OLIVEIRA M.J.F. & SILVEIRA, F.A. Levantamento de abelhas silvestres na Zona da Mata de Minas Gerais. I – Pastagem na região de Viçosa (Hymenoptera, Apoidea). **Revista. Ceres** **40(228)**:131-161, 1993.
- CURE, J.R.; THIENGO, M. & SILVEIRA, F.A. Levantamento da fauna de abelhas silvestres na “Zona da Mata” de Minas Gerais. III. Mata secundária na região de Viçosa (Hymenoptera, Apoidea). **Rev.Brasil.Zool.** **9(3/4)**: 223-239, 1992.
- DAMASCENO, A.G. **Abelhas (Hymenoptera, Apoidea) visitantes das inflorescências da sucupira-branca, *Pterodon emarginatus* Vogel (Leguminosae: Papilionoideae) e do baru, *Dipteyx alata* Vogel (Leguminosae: Papilionidae) em áreas de Cerrado em Brasilândia de Minas – MG.** (Dissertação de Mestrado). Lavras, 1998.
- DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. *In*: **Eletoforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e**

- microrganismos** (Alfenas, A.C. ed.). Editora UFV, Viçosa. p. 405-475, 1998.
- EISEN, J.A. Mechanistic basis for microsatellite instability. *In* **Microsatellites: Evolution and Applications** (Goldstein, D.B. e Schlötterer C. eds.), pp. 34-48, Oxford University Press, New York, 1999.
- ESTOUP A., GARNERY, L., SOLIGNAC, M. & CORNUMUET, J. –M. 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, 1995.
- ESTOUP, A., SOLIGNAC, M. & CORNUET, J.M. Precise assessment of the number of patrines and of genetic relatedness in honeybee colonies. **Proc. R. Soc. Lond. B** **258**: 1-7, 1994.
- ESTOUP, A., SOLIGNAC, M., HARRY, M. & CORNUET, J.M. Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. **Nucleic Acids Res.** **21**: 1427-1431, 1993.
- EVANS, J. Parentage analysis in ant colonies using simple sequence repeat loci. **Mol. Ecol.** **2**:393-397, 1993.
- FERREIRA, M. E. & GRATAPAGLIA, D.. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEM. p.220, 1998.
- FRANCISCO, F.O. **Diversidade genética de populações da abelha sem ferrão *Plebeia remota*: análise do DNA mitocondrial e microssatélites**. (Dissertação de Mestrado). São Paulo, 2002.
- FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. 2^a ed. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 1992.

- GERTSCH, P., PAMILO, P. & VARVIO, S. L. Microsatellites reveal high genetic diversity within colonies of *Camponotus* ants. **Mol. Ecol.** **4**, pp.257-260,1995.
- GOODISMAN, M.A.D., MATTHEWS, R.W. & CROZIER, R.H. Hierarchical genetic of the introduced wasp *Vespa germanica* in Australia. **Mol. Ecol.** **10**: 1423-1432, 2001.
- HAMADA, H., PETRINO, M.G. & KAKUNAGA, T. A novel repeat element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **79**: 6465, 1982.
- HANCOCK, J. M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. *In* **Microsatellites: Evolution and Applications** (Goldstein, D.B. e Schlötterer C. eds), pp. 1-9, Oxford University Press, New York, 1999.
- HARTL, D.L. **A primer of population genetics**. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, 1987.
- HUGHES, C.R. & QUELLER, D.C. Detection of highly polymorphic microsatellite loci a species with little allozyme polymorphism. **Mol. Ecol.** **2**, 1993.
- INOUE, H., NOJIMA, J. & OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, **96**: 23-28, 1990.
- KERR, W.E. & VENCOVSKY, R. Melhoramento genético em abelhas. I. Efeito do número de colônias sobre o melhoramento. **Rev. Brasil. Genet.** **5**: 279-285, 1982.
- KERR, W.E.; CARVALHO, G.A. & NASCIMENTO, V.M. **Abelha Uruçu. Biologia, Manejo e Conservação**. Coleção Manejo da Vida Silvestre, no. 2. Belo Horizonte, Acangaú, 1996.

- KERR, W.E.; NASCIMENTO, V.A. & CARVALHO, G.A. Há salvação para os meliponíneos? **Anais II Encontro sobre abelhas**. Ribeirão Preto (2 a 4 de julho/94). P. 60-65, 1994.
- LA SALLE, J., GAULD, I.D. **Hymenoptera and Biodiversity**. Leaper and Gard Ltda, Bristol, 1993
- LANDE, R. & BARROWCLOUGH, G.F. Effective population size, genetic variation, and their use in population management. *In* **Viable population for Conservation** (Soulé, M.E. ed.) pp. 87-123. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1987.
- LITT M. & LUTY J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.** **44**: 397-401, 1989.
- MACHADO, A.B.M., FONSECA, G.A.B., MACHADO, R.B., AGUIAR, L.M.S. & LINS, L.V. **Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna de Minas Gerais**. Belo Horizonte, Biodiversitas, 1998.
- MELO, G. A. R. Notas sobre meliponíneos neotropicais (Hymenoptera, Apidae), com a descrição de três novas espécies. p. 85-92. *In*: **Apoidea Neotropica. Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. UNESCO, Santa Catarina, Brasil. 2003.
- MENEZES, A. M. L., CARVALHO, G. A., NASCIMENTO, V. A., AIDAR, D. S., KERR, W. E. Transporte de rainhas fisogástricas – novo método para seleção e aumento da população geneticamente ativa de Meliponíneos. **Rev. Bras. Genet.**, **16**(3): 322, 1993.
- MICHENER, C.D. **The bees of the world**. The Jhon Hopkins University Press, Baltimore, 2000.

- MOORE, S.S., SARGEANT, L.L., KING, T.J., MATTINCK, J.S., GEORGES, M. & HETZEL, D.J.S. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics** **10**: 654-660, 1991.
- MOURE, J.S. & KERR, W.E. Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymen. – Apoidea). **Dusenía** **1(2)**:105-129 + 2 estampas, 1950.
- MOURE, J.S. Notas sobre as espécies de *Melipona* descritas por Lepeletier em 1836 (Hymenoptera: Apidae). **Rev. Brasil. Biol.** **35(4)**:615-623, 1975.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics** **89**: 583-590, 1978.
- NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press, New York, 1987.
- PAGE, R.E.; LAIDLAW, H.H. & ERICKSON, E.H. Closed population honey bee breeding: The distribution of sex alleles with top crossing. **J.Apic.Res.** **24(1)**: 38-42, 1985.
- PAXTON, R. J. WEIBSCHUH, N.; ENGELS, W.; HARTFELDER, K. & QUEZADA-EUÁN, J. J. G. Not only single mating in stingless bees. **Naturwissenschaften** **86**: 143-146, 1999 a.
- PAXTON, R. J. WEIBSCHUH, N. & QUEZADA-EUÁN, J. J. G. Characterization of dinucleotide microsatellite locos for stingless bees. **Mol. Ecol.**, **8**: 685-702, 1999b.
- PAXTON, R. J., Genetic structure of colonies and a male aggregation in the stingless bee *Scaptotrigona postica*, as revealed by microsatellites analysis. **Insectes Soc.**, **47**:63-69, 2000.

- PAXTON, R.J., THORÉN, P.A., TENGO, J., ESTOUP, A. & PAMILO, P. Mating structure and nestmate relatedness in a communal bee, *Andrena jacobi* (Hymenoptera, Andrenidae), using microsatellites. **Mol. Ecol.** **5**: 511-519, 1996.
- PÉPIN, L.; AMIGUES, Y.; LEPINGLE, A.; BERTHIER, J.L.; BENSALD, A. & VAIMAN, D. Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. **Hereditary** **74**: 53-61, 1995.
- PETERS, J.M.; QUELLER, D.C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. & STRASSMANN J.E. Microsatellite locos for stingless bees. **Mol. Ecol.**, **7**: 783-792, 1998.
- PETERS, J.M.; QUELLER, D.C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; ROUBIK, D. W. & STRASSMANN J.E. Mate number, kin selection and social conflicts in stingless bees and honeybees. **Proc. R. Soc. London B** **266**: 379-384, 1999.
- ROSS, K.G., SHOEMAKER, D.D., KRIEGER, M.J.B., DEHERR, C.J. & KELLER, L. Assessing genetic structure with multiple classes of molecular markers: a case study involving the introduce fire ant *Solenopsis invicta*. **Mol. Biol. Evol.**: **16(4)**: 525-543, 1999.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratoty manual**. Vol. 1. Cold SPRING Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANGER F., NICKLEN S. AND COULSON A.R. DNA sequencing with chain-terminating inibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463-5467, 1977.
- SCHETINO, M.A.A; SOUZA, T.C; SALOMÃO, T.M.F; CAMPOS, L.A.O. Distinção entre populações de *M. rufiventris rufiventris* de Minas Gerais

- por meio de marcadores RFLP da região CO-I/CO-II do DNA mitocondrial. *In: Anais do 49º Congresso Nacional de Genética*. CD-ROM, 2003.
- SCHILDER, K., HEINZE, J., GROSS, R. & HOLLDÖBLER, B. Microsatellites reveal clonal structure of populations of the thelytokous ant *Platythyrea punctata* (F. Smith) (Hymenoptera; Formicidae). **Mol. Ecol.** **8**: 1497-1507, 1999.
- SHAO, Z.Y., MAO, H.X., FU, W.J., ONO, M, WANG, D.S., BONIZZONI, M. & ZHANG YP. Genetic structure of Asian populations of *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae). **J. Hered.** **95(1)**: 46-52, 2004.
- SIA, E.A., JINKS-ROBERTSON, S. & PETES, T.D. Genetic control of microsatellite stability. **Mutation Research** **383**: 61-70, 1997.
- SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. & GOTTSBERGER, G. A polinização de plantas do cerrado. **Rev. Bras. Biol**, **48**: 651-663, 1988.
- SILVEIRA, F.A. & CAMPOS, M.J.O. A melissofauna de Corumbataí (SP) e Paraopeba (MG) e uma análise da biogeografia das abelhas do cerrado brasileiro (Hymenoptera, Apoidea). **Rev. Bras. Entomol.** **39(2)**: 371-401, 1995.
- SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R. & ALMEIDA, E.A.B. **Abelhas Brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte, 2002.
- SILVEIRA, F.A.; ROCHA, L.B.; CURE, J.R. & OLIVEIRA, M.J.F. Abelhas silvestres (Hymenoptera, Apoidea) da Zona da Mata de Minas Gerais. II. Diversidade, abundância e fontes de alimento em uma pastagem abandonada em Ponte Nova. **Rev. Bras. Entomol.** **37(3)**:595-610, 1993.

- SOLÉ-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. *In* **Biologia Molecular e Evolução** (ed. S. R. MATIOLI), pp. 172-192, Holos Editora, Ribeirão Preto, 2001.
- STATSOFT. **Statistica for Windows**. <http://www.statsoft.com>, 1997.
- STRASSMANN, J. The rarity of multiple mating by females in the social Hymenoptera. **Ins. Soc.** **48**: 1-13, 2001.
- STRASSMANN, K., BAREFIELD, K., SOLÍS, C.R., HUGHES, C.R. & QUELLER, D.C. Trinucleotide microsatellite loci for a wasp, *Polistes*. **Mol. Ecol.** **6**: 97-100, 1997.
- TAUTZ, D., RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Res.** **12**: 4127, 1984.
- TREGENZA, T. & BUTLIN, R.K. Genetic diversity: do marker genes tell us the whole story? *In* **Evolution of Biological Diversity** (A.E. Magurran e R.M.May, eds.), pp. 37-55. Oxford University Press, Oxford, UK, 1999.
- TSUTSUI, N.D., SUAREZ, A.V., HOLWAY, D.A. & CASE, T.J. Relationships among native and introduced populations of the Argentine ant (*Linepithema humile*) and the source of introduced populations. **Mol. Ecol.** **10**: 2151-2161, 2001.
- UNRUH, T.R. & MESSING, H. Intraspecific biodiversity in Hymenoptera: implications for conservation and biological control. *In* **Hymenoptera and diversity** (J. LaSalle e I.D. Gauld, eds.), pp. 27-52. CAB International, Oxon, UK, 1993.
- VIANA, B. V. & MELO G. A. R.. Conservação de Abelhas. **Informativo Agropecuário**, 13(149), 1987

- WALDSCHMIDT, A.M.; SALOMÃO, T.M.F; BARROS, E.G. & CAMPOS, L.A.O. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Braz. J. Genetics**, **20**, p. 421-423, 1997.
- WIDMER, A. & SCHMID-HEMPEL, P. The population genetic structure of a large temperate pollinator species, *Bombus pascuorum* (Scopoli) (Hymenoptera:Apidae). **Mol. Ecol.** **8**: 387-398, 1999.
- WIDMER, A., SCHMID-HEMPEL, P., ESTOUP, A. & SCHOLL, A. Population genetic structure and colonization history of *Bombus terrestris* s.l. (Hymenoptera: Apidae) from the Canary Islands and Madeira. **Hereditary** **81**: 563-572, 1998.
- WRIGHT, S. **Variability within and among natural populations**. Vol. 4. The University of Chicago Press, Chicago, 1978.
- YEH, F.C.; YANG, R., BOYLE, T. **POPGENE version 1.32: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis**. Quick User Guide. 1999.