

MARCÍLIA APARECIDA DO NASCIMENTO

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Melipona quadrifasciata*
(HYMENOPTERA: APIDAE) NO ESTADO DE MINAS
GERAIS COM MARCADORES ISSR**

**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**

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

T

N244v
2008

Nascimento, Marcília Aparecida do, 1971-
Variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata*
(Hymenoptera : Apidae) no Estado de Minas Gerais com
marcadores ISSR / Marcília Aparecida do Nascimento.
– Viçosa, MG, 2008.
viii, 33f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Tânia Maria Fernandes Salomão.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 27-33.

1. *Melipona quadrifasciata*. 2. Marcadores genéticos.
3. Diversidade genética. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22.ed. 595.799

MARCÍLIA APARECIDA DO NASCIMENTO

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Melipona quadrifasciata*
(HYMENOPTERA: APIDAE) NO ESTADO DE MINAS
GERAIS COM MARCADORES ISSR**

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: 14 de fevereiro de 2008

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

Prof. Luiz Orlando de Oliveira

Prof.^a Ana Maria Waldschmit

Márcia Flores da Silva Ferreira

Profa. Tânia Maria F. Salomão
(Orientadora)

Ao Ser Supremo dono de toda a sabedoria (Deus).

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha base, meu sustento, meu alento, meu amigo, meu tudo.

Ao Departamento de Biologia Geral e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa.

À Secretaria de Estado de Educação de Mato Grosso - SEDUC/MT pela concessão da licença remunerada para a minha qualificação profissional.

À Comissão de licença para a qualificação profissional - SEDUC/MT pelo parecer favorável à minha qualificação profissional.

À minha orientadora, Tânia Maria Fernandes Salomão, por todos os ensinamentos, pela paciência, dedicação e pela confiança em mim depositada.

Aos meus co-orientadores professora Mara Garcia Tavares e professor Lúcio Antonio de Oliveira Campos pelas sugestões.

À professora Ana Maria Waldschmith pelas sugestões e incentivo.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pelos ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora, professores Luiz Orlando de Oliveira, Ana Maria Waldschmith, Mara Garcia Tavares e a pesquisadora Márcia Flores da Silva Ferreira, pelas valiosas contribuições para este trabalho.

Ao pessoal da coleta das abelhas.

Às amigas Aline Rocha e Rejane Bezerra da Silva por todos os ensinamentos sobre extração de DNA.

Ao Henrique Batalha Filho pela colaboração nas análises estatísticas e pelas dicas.

Aos meus familiares pelo incentivo.

A todos os meus amigos do laboratório pela boa convivência.

Às amigas Cirlei, Mônica, Katiane e Claudinéia pela amizade e companheirismo no grupo de estudo.

Aos amigos Sandro e Renata pela acolhida, carinho e amizade.

Aos amigos José Martins Fernandes e Jaqueline Dias pelo companheirismo, incentivo pela inestimável ajuda.

Aos amigos e alunos da Escola Estadual Ariosto da Riva/ AF-MT pela torcida e incentivo.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Marcília Aparecida do Nascimento filha de Antonio Lopes do Nascimento e Tereza Bernardes do Nascimento nasceu em 10 de março de 1971, na cidade de Terra Roxa – PR.

Concluiu seus estudos de primeiro e segundo graus no ano de 1989 na modalidade supletivo pelo projeto Logos II, com habilitação em magistério. Em 1990 ingressou como docente no ensino público de Mato Grosso no qual mantém vínculo até o presente momento. Em 1994, ingressou-se na Universidade do Estado de Mato Grosso e graduou-se em licenciatura no curso de Ciências Biológicas em agosto de 1998. No período de 1999 a 2000, cursou especialização *Lato Sensu* em Biologia Geral na Universidade Federal de Lavras – MG.

Em fevereiro de 2006, iniciou o curso de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em 14 de fevereiro de 2008, sob orientação da Professora Tânia Maria Fernandes Salomão.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1. Material genético.....	9
3.2. Extração de DNA genômico.....	10
3.3. Reação por PCR-ISSR.....	10
3.3.1. Seleção de primers e otimização da reação de PCR.....	10
3.3.2. Amplificação de PCR.....	11
3.3.3. Análises dos dados.....	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
5. CONCLUSÕES.....	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

RESUMO

NASCIMENTO, Marcília Aparecida do, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) no Estado de Minas Gerais com marcadores ISSR.** Orientadora: Tânia Maria Fernandes Salomão. Co-orientadores: Lúcio Antonio de Oliveira Campos e Mara Garcia Tavares.

A subespécie *Melipona quadrifasciata* com faixas terciais contínuas e interrompidas foi estudada utilizando marcadores ISSR. Espécimes oriundos de 10 localidades do Estado de Minas Gerais foram analisados visando estimar a variabilidade genética. Para a reação de PCR foram utilizados 11 *primers* ISSR e um total de 147 bandas foram identificadas. A avaliação da diferenciação genética e estruturação populacional foram analisadas por meio dos programas NTSYS, ARLEQUIM 3.1, TFGA, HICKORY e AIS. A diversidade gênica foi de 0,20 e o percentual de locos polimórficos foi de 59,18%. O agrupamento pelo método UPGMA permitiu a formação de quatro grupos distintos. Os indivíduos de faixas terciais contínuas foram incluídos em um único grupo e os demais foram distribuídos nos outros três grupos. Tanto a análise de variância molecular (AMOVA) com índice de fixação (Φ_{st}) acima de 0,25 e a estimativa de θ^B pelo método Bayesianio mostraram alta estruturação de *M. quadrifasciata* dentro das localidades. Esta estruturação pode estar relacionada a fatores biológicos como limitação de vôo de *M. quadrifasciata* e fatores geográficos como relevo e destruição do habitat natural. O teste de Mantel com uma correlação positiva de $r = 0,28$, mostrou baixa correlação entre distância genética e distância geográfica. Estudos moleculares mais detalhados associados às características geográficas das localidades amostradas deverão ser realizados visando a compreensão desta alta estruturação de *M. quadrifasciata* em Minas Gerais.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Marcília Aparecida do, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2008. **Genetic variability of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) in the State of Minas Gerais with labels ISSR.** Adviser: Tânia Maria Fernandes Salomão. Co-advisers: Lúcio Antonio de Oliveira Campos e Mara Garcia Tavares.

The subspecies *Melipona quadrifasciata* with continuous and interrupted stripes on the terga was studied using markers ISSR. Specimens from 10 locations of the state of Minas Gerais were analyzed aiming to estimate the genetic variability. For the PCR reaction, 11 ISSR primers were used and a total of 147 bands were identified. The assessment of genetic differentiation and population structure have been reviewed by the NTSYS programs, ARLEQUIM 3.1, TFGA, HICKORY and AIS. The genetic diversity was of 0.20 and the percentage of polymorphic loci was of 59.18%. The grouping by UPGMA method allowed the formation of four distinct groups. Individuals with continuous stripes on the terga were included in one group and the others were distributed in the other three groups. Both the analysis of molecular variance (AMOVA) with index-fixing (Φ_{st}) above 0.25 and an estimate of θ^B by the method Bayesianio showed high-structuring of *M. qadrifasciata* built up areas. This structure may be related to biological factors as limitation of flight of *M. quadrifasciata* and geographical factors as topography and destruction of natural habitat. Mantel's test with a positive correlation of $r = 0.28$ showed low correlation between genetic distance and geographical distance. More detailed molecular studies associated with the geographical features of sites should be conducted aimed at understanding the high-structuring of *M. quadrifasciata* in Minas Gerais.

1. INTRODUÇÃO

Existem aproximadamente 20.000 espécies de abelhas habitando toda parte do mundo onde há angiospermas (Michener, 2000). Algumas espécies são solitárias como as mangangavas (*Xylocopa* sp), outras são sociais.

Entre as abelhas sociais, além da conhecida *Apis mellifera*, estão as de abelhas sem ferrão, nativas das Américas (Novo Mundo). Até 1838, antes da introdução da abelha europeia, as abelhas sem-ferrão foram as únicas espécies produtoras de mel (Kerr et al., 2005). No Brasil, o principal grupo de abelhas sociais pertence à subfamília Meliponinae, ou abelhas indígenas sem-ferrão.

De acordo com a classificação zoológica de Kerr et al. (1996), as abelhas sem ferrão pertencem ao **Reino** Animalia; **Filo** Arthropoda; **Classe** Insecta; **Ordem** Hymenoptera; **Subordem** Aprocrita; **Superfamília** Apoidea; **Família** Apidae; **Subfamília** Meliponinae; **Tribos** Meliponini e Trigonini. A tribo Meliponini agrupa vários gêneros de abelhas sem - ferrão.

Os meliponineos possuem uma constituição genética haplodiplóide. Nesse sistema, as fêmeas originam-se de ovos fecundados e são diplóides e os machos originam-se de ovos não fecundados e são haplóides;

Dentre os gêneros agrupados na tribo Meliponini está incluído o gênero *Melipona* (abelhas sem-ferrão). Este gênero agrupa aproximadamente 70 espécies de abelhas distribuídas nas regiões equatorial, tropical e subtropical do continente americano. *Melipona quadrifasciata* Lep que se encontra distribuída em diferentes ecossistemas brasileiros é uma das espécies deste gênero.

Até o momento, dois ecótipos adaptados a diferentes condições climáticas são reconhecidos (Kerr 1951, Moure 1975). A *M. q. anthidioides* adaptada a regiões de clima quente, e no Brasil, distribui-se desde o norte de SP até a PB e *M. q. quadrifasciata* encontrada em regiões mais frias do Brasil, nos estados do PR, SC, RS e sul de São Paulo. A diferença entre elas é a presença de três a cinco faixas terçais amarelas e contínuas do 3º ao 6º segmento em operárias e machos de *M. q. quadrifasciata* e duas a cinco faixas interrompidas em *M. q. anthidioides* (Schwarz, 1932).

Nos diferentes ecossistemas as diferentes condições climáticas permitem uma dispersão diversificada das abelhas. Assim, abelhas de uma região podem não ser encontradas em outras. A subespécie *M. q. anthidioides* é adaptada a regiões com climas de temperaturas mais elevada (Melo e Campos, 1987) e distribui-se mais ao norte, como Minas Gerais e Rio de Janeiro, enquanto *M. q. quadrifasciata* é encontrada principalmente em regiões com altitude mais elevada e fria como São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Além da diferenciação morfológica, diferenças moleculares entre essas duas subespécies também já foram detectadas.

Waldschmidt et al. (2000) estudaram essas abelhas empregando a técnica de PCR-RAPD. Os resultados mostraram um marcador RAPD presente em *M. q. quadrifasciata* e ausente em *M. q. anthidioides*.

Em um outro estudo, feito com base na análise de nove regiões do DNA mitocondrial por PCR-RFLP, um total de 13 enzimas de restrição foram utilizadas e dentre essas, três mostraram padrões de restrição diferentes entre as duas subespécies (Moretto e Arias, 2005).

Estes dados moleculares são, a princípio, congruentes com a morfologia de *M. q. quadrifasciata* e *M. q. anthidioides*. No entanto, Waldschmidt et al. (2000) relataram que o marcador RAPD presente em *M. q. quadrifasciata* e ausente em *M. q. anthidioides* estava ausente em indivíduos coletadas na região de Januária (norte do Estado de Minas Gerais). Estes indivíduos apresentavam um padrão de bandas terciais similar ao de *M. q. quadrifasciata* que é encontrada no sul do país. Este dado sugere, portanto, a necessidade de outros estudos que possam ampliar os conhecimentos genéticos de *M. q. quadrifasciata* de faixas terciais contínuas procedentes de Januária visando a definição do *status* de subespécie das mesmas.

Muitos fatores estão envolvidos na dispersão das espécies no ambiente. O relevo, por exemplo, pode constituir uma barreira e levar determinadas espécies a uma distribuição descontínua no espaço geográfico. Nunes et al. (2007) estudando a divergência genética em *Melipona scutellaris* Latreille com base em caracteres morfológicos, obtiveram a formação de três grupos de acordo com a altitude.

No estado de Minas Gerais, o relevo bastante acidentado e com a predominância de significativas elevações pode constituir um fator limitante para a dispersão de *M. quadrifasciata*. As terras mineiras estão situadas num planalto cuja altitude varia de 40 a 2.800 metros, em um território formado por grandes elevações e vales. Estas características da paisagem, provavelmente podem isolar as populações e levar as mesmas a uma diferenciação.

O isolamento das populações leva a redução do fluxo gênico e conseqüentemente à perda da variabilidade genética, visto que a existência de barreiras impede a migração de machos e rainhas virgens para o acasalamento (Aidar, 1996). Segundo Silveira et al. (2002), o confinamento pode levar a um eventual desaparecimento por escassez de recursos, endogamia por conseqüência da redução populacional, por competição ou por ação de organismos invasores.

A endogamia colabora para o aumento da similaridade genética entre indivíduos de uma mesma população, contribuindo para elevar a proporção de locos homozigotos (Hartl, 1981). Em uma população, o alto índice de homozigose pode levar a expressão de alelos recessivos deletérios o que diminui o valor adaptativo dos indivíduos, tornando-os suscetíveis às mudanças ambientais.

Outro fator que também contribui para a redução da variabilidade genética em pequenas populações é a deriva genética (mudanças aleatórias nas freqüências gênicas entre gerações). Este processo causa a perda de alelos raros em uma população, contribuindo para a redução da variabilidade genética intrapopulacional, e conseqüentemente, para a fixação ao acaso de alelos diferentes nas populações, resultando assim na diferenciação entre as populações. Em grandes populações ou em populações pequenas em que há troca de genes por meio de migração constante de indivíduos, os efeitos da deriva genética são irrelevantes, no entanto, em populações pequenas e isoladas são grandemente acentuados.

A fragmentação do habitat pela ação antropogênica pode, também, contribuir para a perda da diversidade genética dos diferentes organismos, pois, acarreta a redução do número de indivíduos de uma população. A população remanescente passa a ter um tamanho menor que o mínimo

adequado para que o mesmo possa ter sua normal continuidade e evolução. No estado de Minas Gerais, as populações de abelhas têm sido intensamente afetadas pelos desmatamentos, os quais isolam áreas que pertenciam anteriormente a ecossistemas contínuos, formando ilhas florestais. A redução de áreas de florestas, em geral, resulta na redução do tamanho das populações que vivem e dependem desses habitats.

Em um estudo para investigar a quantidade de espécies do gênero *Melipona* em áreas com variados graus de desmatamentos na Amazônia, Brown e Albrecht (2001) verificaram que as colônias não conseguem fugir de áreas em desmatamentos ou queimadas, uma vez que as rainhas fisiogástricas apresentam abdômen desenvolvido, o que as impossibilita de voar.

De acordo com estudos realizados por Fernandes et al. (2005), o Estado de Minas Gerais possui um índice de degradação (ID) médio de 86%. Algumas formações vegetais do estado foram drasticamente reduzidas, como é o caso da mata Atlântica, e os fragmentos remanescentes, geralmente muito pequenos, não apresentam condições de suportar um grande número de espécies com alto número populacional (Viana e Melo, 1987) e isso pode levar à perda da variabilidade genética.

Para um melhor entendimento da variabilidade genética, e principalmente, da sua importância, é necessário que se conheça a constituição genética da população em estudo. Para isso, existem atualmente várias técnicas que permitem estudos diretamente no DNA, por exemplo, as baseadas em marcadores moleculares. Estas técnicas têm sido empregadas para caracterização de material biológico em diversas áreas do conhecimento.

Existem vários tipos de marcadores moleculares e dentre esses, os baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) como RAPD, RFLP, microssatélites, AFLP e ISSR têm sido muito eficientes em estudos de genética de população.

Dentre as técnicas de marcadores moleculares baseadas em reação de PCR, a técnica de PCR-ISSR (*Inter simple sequence repeat amplification*) tem se destacado como uma alternativa eficiente para a caracterização de genomas complexos (Zieetkiewicz et al., 1994). Atualmente esta técnica vem

sendo utilizada em estudos de populações naturais de plantas, fungos, insetos e vertebrados (Wolfe, 2005).

A reação de PCR-ISSR utiliza um único *primer* geralmente longo e constituído por seqüências de di ou trinucleotídeos. Os *primers* ISSR são seqüências microssatélites que possuem geralmente de 16 a 25 pb de comprimento não ancorados (Gupta et al., 1994) ou ancorados na extremidade 5' ou 3' por dois ou três nucleotídeos (Wolfe, 2005). O produto da reação de PCR são seqüências de diferentes tamanhos localizadas entre duas regiões repetidas de microssatélite idênticas orientadas em direções opostas. Considerando que os *primers* ISSR são baseados em seqüências de microssatélites e que essas seqüências são conservadas em diversas classes de organismos, os mesmos podem ser utilizados sem necessidade de *primers* específicos para cada espécie (Luque et al., 2002; He et al., 2006).

ISSR é uma técnica simples, rápida, eficiente, de baixo custo e que não requer informação prévia da seqüência de DNA do organismo em estudo. O tamanho dos fragmentos amplificados varia de 200 a 2000 pb e apresentam alta reprodutibilidade, devido possivelmente, ao uso de *primers* longos o qual permitem um subsequente uso de altas temperaturas de pareamento do mesmo (Bornet e Branchard, 2001). Atualmente, os marcadores moleculares ISSR, tem sido utilizados para análise de insetos em estudos genéticos em nível intra e interespecífico.

Kumar et al. (2001) utilizaram marcadores ISSR para estimar a diversidade genética dentro e entre 28 populações de *Scirpophaga incertulas* (Lepdoptera), praga que ataca as plantações de arroz. As populações foram analisadas, também, por RAPD e os dados foram comparados. As duas técnicas mostraram-se úteis na detecção de polimorfismos intra e interpopulacionais em *S. incertulas*, possibilitando assim a elaboração de uma estratégia efetiva de manejo.

Em um estudo para estimar o grau de variabilidade genética entre três famílias de Lepdoptera (Pyralidae, Sphingidae e Pieridae), Hundsdoerfer e Wink (2005) utilizaram o *primer* ISSR (GACA)₄ e os resultados mostraram que estas seqüências estão presentes no genoma destas borboletas em número suficiente para fornecer informações de diversidade genética neste

taxa. Foi detectada também alta taxa de variabilidade genética quando os dados foram comparados com de outros estudos.

Leon e Jones (2005) utilizaram a técnica de ISSR para estimar a variabilidade e a estrutura genética em seis populações de *Gonatocerus ashmead* (Mymaridae), vespa parasitóide de ovos de *Homalodisca coagulata* (Homoptera, Cicadelidae), causadora de grandes prejuízos em plantações de uva (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*). Os organismos utilizados para as análises foram coletados em diferentes regiões geográficas e os resultados obtidos mostraram divergência genética e baixo fluxo gênico entre as populações, mostrando assim a eficiência desses marcadores na detecção de polimorfismo e na estimativa de variações geográficas em populações de *G. ashmead*.

Em um estudo de dissimilaridade genética entre cinco linhagens de *Trichogramma* (parasitóides de ovos de outros insetos), os marcadores ISSR detectados permitiram estimar o nível de diferenciação genética neste gênero (Borba et al., 2005). Ao analisar as três espécies (*T. pretiosum*, *T. atopovirilia* e *T. bruni*) os resultados permitiram identificar aquelas que possuíam maior capacidade de parasitismo. Aproximadamente 96% dos fragmentos de DNA amplificados foram polimórficos, mostrando alto grau de polimorfismo nas populações analisadas. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a técnica de ISSR foi eficiente na detecção de polimorfismos genéticos entre indivíduos do gênero *Trichogramma*, facilitando o processo de diagnóstico de espécies em tempo reduzido e com baixo custo.

Recentemente, Sousa (2007) analisou 12 populações de *Zabrotes subfasciatus* (caruncho de feijão) procedentes de diferentes Estados brasileiros utilizando cinco *primers* ISSR. Os resultados mostraram maior variação genética dentro (66%) do que entre (34%) as populações, baixa correlação entre distância genética e geográfica e que as populações de *Z. subfasciatus* não se encontram estruturadas.

Em abelhas, os estudos utilizando marcadores ISSR são raros. Beresovskaia et al. (2002) realizaram um estudo para avaliar a possibilidade do uso desta técnica na obtenção de um marcador espécie específico no gênero *Bombus*. Cinco espécies (*B. sylvarum*, *B. pascuorum*, *B. lapidarius*, *B. terrestris* e *B. hortum*) foram analisadas e a variabilidade genética estimada.

Variações interespecíficas foram detectadas quando foram utilizados os *primers* ISSR (GTG)₇A e (AGC)₆G. Para as variações intra-específicas, 73 a 100% das marcas foram invariáveis, sendo o nível de variação diferente entre as espécies. Os resultados obtidos mostraram que os marcadores ISSR podem ser úteis para auxiliar na resolução de problemas relacionados à classificação taxonômica existentes neste gênero.

Outro gênero de abelhas investigado utilizando, também, polimorfismos ISSR foi o gênero *Apis*. Paplauskiené et al. (2006) detectaram polimorfismos ISSR entre duas subespécies de *Apis mellifera*. Marcadores ISSR específicos foram detectados para *A. m. carnica* e *A. m. caucasica* o que possibilitou a diferenciação genética entre elas.

Diante destes resultados que mostram a eficiência dos marcadores ISSR nos estudos com insetos, o presente trabalho propõe estudar populações de *M. quadrifasciata* de diferentes localidades do Estado de Minas Gerais com base em polimorfismos genéticos detectados por este tipo de marcador molecular.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estimar a variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata* procedente de diversas localidades do Estado de Minas Gerais com base em marcadores ISSR.

2.2. Objetivos específicos

- Estimar e caracterizar o nível de variação genética de *M. quadrifasciata* entre e dentro das localidades amostradas.
- Correlacionar a variabilidade genética e distribuição geográfica de *M. quadrifasciata*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material genético

Espécimes de 54 colônias de *Melipona quadrifasciata* foram coletados em 10 localidades no estado de Minas Gerais e um indivíduo de cada colônia foi analisado. Os indivíduos possuíam características morfológicas distintas em relação às faixas tergais no abdômen (Figura 1). A tabela 1 mostra as localidades, números de colônias por localidades, a altitude mínima e máxima de cada localidade e o padrão de faixas tergais dos indivíduos analisados.

Tabela 1. Localidade, número de colônia, altitude e padrão de faixas tergais de *M. quadrifasciata* coletadas em Minas Gerais/Brasil.

Localidade	Número de colônias	Altitude (mínima/máxima)	Padrão de faixas tergais
Januária	10	440/600	Contínua
Urucuia	5	500/600	Contínua
Poté	3	450/1070	Interrompida
Barbacena	4	900/1746	Interrompida
Ressaquinha	4	950/1350	Interrompida
Rio Vermelho	3	800/950	Interrompida
Diogo de Vasconcelos	2	600/1800	Interrompida
Cristiano Ottoni	7	900/1150	Interrompida
São João Del Rei	6	900/1300	Interrompida
Caeté	10	850/1746	Interrompida



Figura 1. Padrões de faixas tergais de *Melipona quadrifasciata* analisadas. A: faixas tergais contínuas. B: faixas tergais interrompidas.

3.2. Extração de DNA genômico

A extração do DNA total das operárias de *M. quadrifasciata* foi realizada de acordo com o protocolo recomendado por Waldschmidt et al. (1997). A cabeça e o mesossoma de cada indivíduo foram macerados com nitrogênio líquido em gral de porcelana contendo 1 ml de tampão de extração gelado constituído de: CTAB a 2% (Hexadecil Trimetil Brometo de Amônio); EDTA (Ácido Tetraacético Diamina Etileno) a 20 mM (pH 8,0); NaCl a 1,4 M; Tris-HCl a 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 micro 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 h. O material foi então submetido à 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 ressuspendido 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 quantificar e verificar a integridade e pureza do DNA extraído.

3.3. Reação por PCR-ISSR

3.3.1. Seleção de primers e otimização da reação de PCR

O conjunto de *primers* utilizados foi obtido na Wmed Representações LTDA. Um total de 93 *primers* ISSR foi testado para a amplificação de fragmentos de DNA de *M. quadrifasciata*. Com base no padrão de amplificação obtido, 20 *primers* foram selecionados e as reações de PCR otimizadas. Os efeitos da concentração de *primer* (0,05; 0,10 e 0,15 µM), DNA *template* (10 e 50 ng) e a influência da temperatura de pareamento (48

– 60 °C) na reprodutibilidade e melhor definição do padrão de bandas foram analisados. Dentre os 20 *primers*, testados 11 foram selecionados para as análises, considerando o número e a resolução das bandas identificadas. A seqüência e as características dos *primers* são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Seqüência dos *Primers* ISSR, número de bandas e temperatura de pareamento.

Primer/Código	Seqüência (5' - 3')	Nº. de bandas	Temperatura de pareamento (°C)
UBC 807	AGAGAGAGAGGAGAGT	19	54°
UBC 808	AGAGAGAGAGGAGGC	15	54°
UBC 811	GAGAGAGGAGAGAGAC	18	49°
UBC 834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	13	48°
UBC 836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	8	54°
UBC 840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	9	50°
UBC 842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	15	56°
UBC 848	CACACACACACACARG	10	56°
UBC 856	ACACACACACACACACYA	12	48°
UBC 857	ACACACACACACACACYG	15	50°
UBC 888	BDBCACACACACACA	13	49°
Total		147	

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

3.3.2. Amplificação por PCR-ISSR

As condições de amplificação foram ajustadas a partir da metodologia usada por Eiadthong et al. (1999) na identificação e avaliação da variação genética de cultivares de manga.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.). Cada reação constituiu de um volume total de 25 µL contendo: 10 ng de DNA, dNTPs a 100 µM, 0,5 unidade de *Taq* DNA polimerase, 50 pmoles de *primer*, 2,5 mL de tampão 10X e H₂O ultrapura. O programa de amplificação constituiu de uma desnaturação inicial de 3 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos de 1 minuto a 92°C, 2 minutos à temperatura de pareamento do *primer* (que varia de acordo com o *primer* utilizado), 2 minutos a 72 °C e um passo final de 7 minutos a 72 °C. As reações foram acompanhadas por controle negativo contendo todos os

componentes, exceto o DNA genômico. Os produtos das ampliações foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), visualizados por coloração com brometo de etídio (0,2 µg/ml) e fotodocumentados utilizando-se o sistema AlphaDigiDoc.

3.3. 3. Análise dos dados

Os fragmentos ISSR foram codificados como caracteres binários, ou seja, presença ou ausência de bandas. Na contagem, foram consideradas apenas bandas legíveis e inequívocas. Para aumentar a precisão na contagem das bandas foi utilizado o aplicativo coreIDRAW 12, para o alinhamento das bandas e o recurso *Molecular Weight* do AlphaDigiDoc 1201 para comparar o tamanho dos fragmentos de DNA considerados. O tamanho dos fragmentos de DNA amplificado foi verificado por meio de padrão de peso molecular (1Kb DNA *ladder*). Foram considerados nas análises apenas os fragmentos de DNA amplificados com tamanhos entre 300 e 2000 pares de bases.

Foi construída uma matriz binária de acordo com a presença (1) ou ausência (0) de fragmentos amplificados. Por meio do programa TFPGA versão 1.3 (Miller 1997) os dados da matriz foram utilizados para estimar o percentual de locos polimórficos (P). O cálculo foi em função do número de locos polimórficos/número de locos analisados. O loco foi considerado polimórfico quando a frequência do alelo mais comum foi menor que 99%. Usa-se o critério 0,95 quando o tamanho amostral é menor que 50 indivíduos, e para amostras que excedem 50 indivíduos usa-se o critério 0,99 (Silva, 2006).

A diversidade gênica (H_e) foi estimada por meio do programa TFPGA. Este método assume que as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-w). Em análise com marcador dominante, a presença de bandas refere-se aos genótipos AA ou A- e ausência ao genótipo aa. O princípio H-W prediz que a frequência genotípica para o homocigoto **AA** será p^2 , para o heterocigoto **Aa** será $2pq$ e os outros homocigotos **aa** será de q^2 . A heterocigosidade é dada pela média da quantidade de h ($h = 1 - \sum p_i^2$), para todos os locos examinados em uma determinada amostra (Nei, 1987).

Em ISSR, os locos segregam como marcadores dominantes e não permitem uma estimativa direta das freqüências alélicas. Para o cálculo da diversidade gênica (H_e), porém foi assumido primeiramente que os locos analisados se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e, as freqüências alélicas foram calculadas com base na raiz quadrada do genótipo recessivo. A freqüência do alelo recessivo, nulo, q no loco i , foi estimada pela fórmula: $q_{(i)} = \sqrt{x_{(i)}}$ onde $x_{(i)}$ é a freqüência do homocigoto recessivo, nulo, no loco i e a freqüência do alelo dominante, presente, foi estimada utilizando a seguinte equação: $p(i) = [1 - q(i)]$, onde $q(i)$ é a freqüência do alelo recessivo, nulo, q no loco i .

Um agrupamento com base na média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA), empregando o índice Jaccard foi realizado pelo programa NTSYS de acordo com Rohlf (2005). O índice Jaccard é definido como $S_j = a/(a+b+c)$, onde a = nº de contagens de concordâncias (1;1), b = nº de contagens de discordância (1; 0), c = nº de contagens de discordância (0; 1).

A análise da variância molecular (AMOVA) foi usada para verificar a estruturação genética entre as localidades e dentro das localidades. Nesta análise a diversidade genética foi particionada em dois e em três níveis hierárquicos. Esta análise foi realizada de acordo com Excoffier et al. (1992) com o auxílio do programa Arlequin 3.01 (Excoffier et al., 2006). A significância da estruturação foi testada com 1.000 permutações, onde P denota a probabilidade de se observar um valor ao acaso igual ou maior ao valor observado. Um teste exato foi realizado para verificar a não diferenciação entre as localidades analisadas.

O grau de estruturação e a diversidade gênica também foram analisados pelo método Bayesiano utilizando o software Hickory. Esse aplicativo é um método idealizado para sanar limitações como a estimação de freqüência alélica não realizada na análise da AMOVA. Esse método não assume nenhum conhecimento a respeito do grau de endogamia intrapopulacional e, dessa forma, não se submete em teoria aos problemas analíticos encontrados nos métodos tradicionais utilizados para analisar dados obtidos com marcadores dominantes (Silva, 2007a). O programa

fornece quatro modelos diferentes para as análises da diversidade genética e a escolha do modelo é baseada no *deviance information criterion* (DIC) (Spiegelhalter et al., 2002). Modelos que apresentam menores DIC são preferidos, e diferenças maiores que seis unidades no DIC dos diferentes modelos são requeridas para indicar que há um favorecimento de um modelo sobre o outro (Holsinger e Lewis, 2005). Entretanto, o modelo utilizado no presente trabalho foi o “*f free model*” por ser o mais recomendado para análise com marcadores dominantes (Holsinger e Lewis, 2005). Nesse modelo, a medida θ^B é análoga ao Φ_{st} da AMOVA, o qual indica o nível de estruturação dos grupos analisados. A medida θ^B é mais eficiente para a diferenciação entre grupos quando não se sabe se entre esses está ocorrendo troca gênica (Holsinger e Lewis, 2005). Essa medida incorpora toda a incerteza de f (coeficiente de endogamia) a priori e parece não afetar grandemente o f posteriori quando há um número grande de locos polimórficos (Holsinger e Lewis, 2003).

Para verificar se a distância genética está associada à distância geográfica, foi realizado o teste de Mantel por meio do programa AIS de acordo com Miller (2005). O teste foi baseado nas coordenadas geográficas dos pontos amostrados.

Foi também utilizado um mapa de relevo do Estado de Minas Gerais (Figura 2) para averiguar se as barreiras geográficas interferem no agrupamento das localidades amostradas.

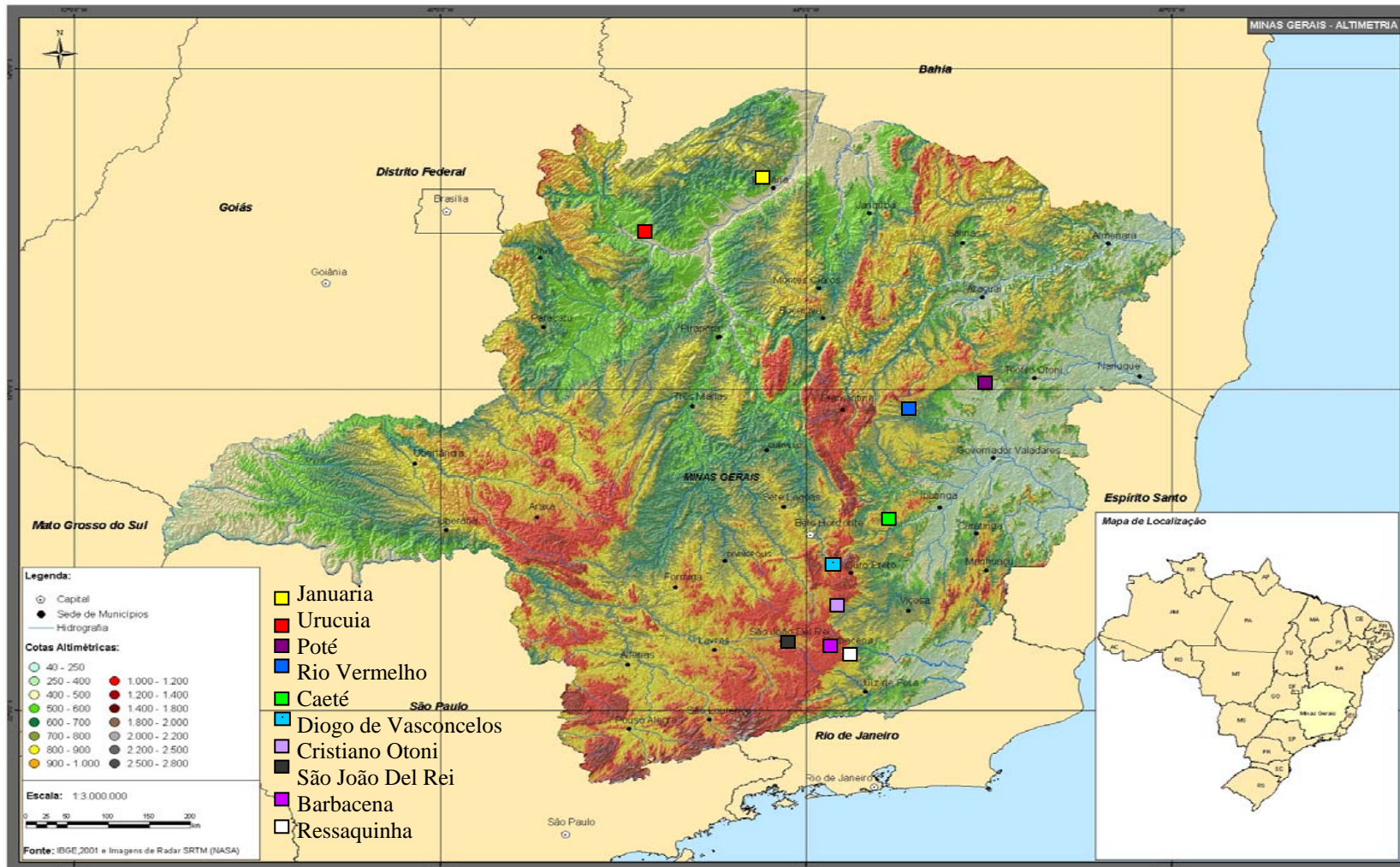


Figura 2. Mapa de relevo do Estado de Minas Gerais. Em destaque os pontos de coletas de *M. quadrifasciata*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As reações de amplificação utilizando 11 *primers* ISSR resultaram em 147 bandas. Os *primers* 807 e 811 produziram um maior número de bandas, 19 e 18 respectivamente, enquanto o menor número de bandas foi produzido quando utilizou-se os *primers* 836 (8 bandas) e 840 (9 bandas). O número médio de bandas por *primer* foi de 13,36. A figura 4 mostra o padrão de amplificação obtido com o *primer* UBC 807.

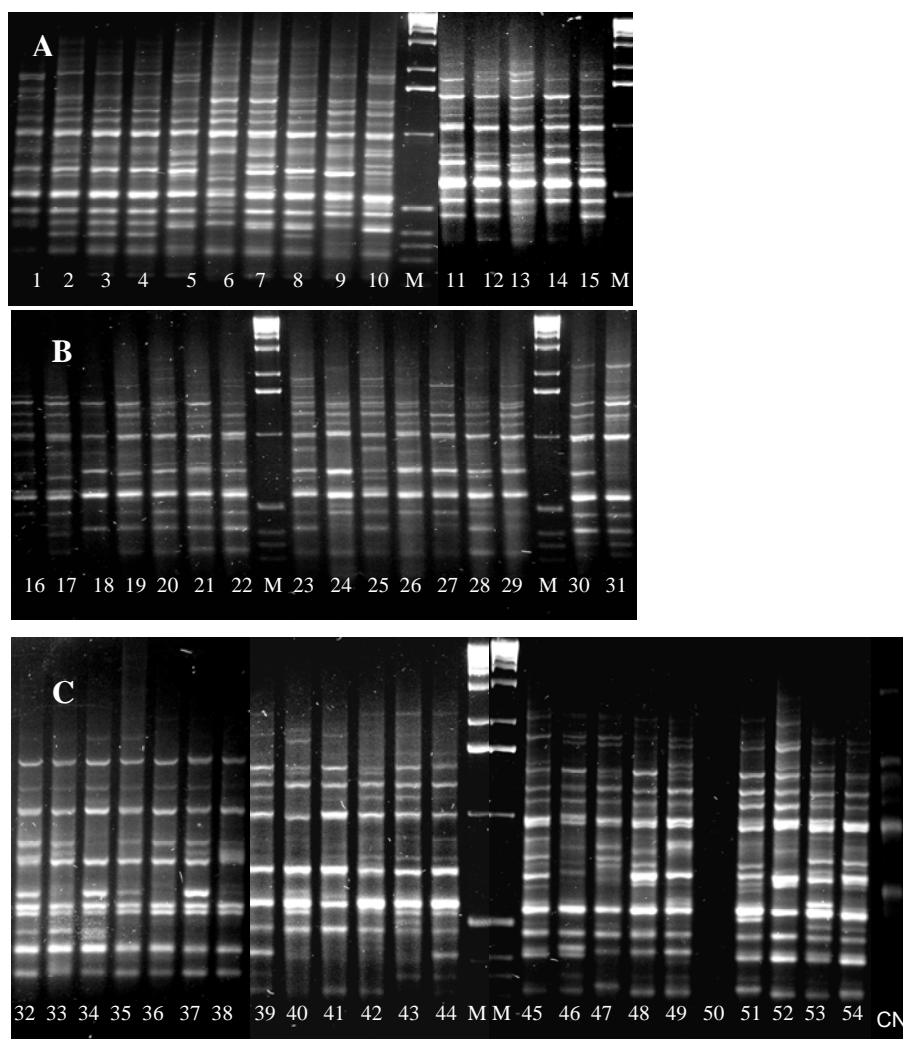


Figura 3. Perfil eletroforético obtido pela amplificação por PCR-ISSR do DNA de *M. quadrifasciata* utilizando o *primer* UBC 807. **A:** 1-10 (Januária), 11-15 (Urucuia). **B:** 16-18 (Poté), 19-22 (Barbacena), 23-26 (Ressaquinha), 27-30 (Rio Vermelho), 30-31 (Diogo de Vasconcelos). **C:** 32-38 (Cristiano Ottoni), 39-44 (São João Del Rei), 45-54 (Caeté). M = marcador 1Kb DNA ladder. CN = Controle Negativo.

Dos locos observados, 87 foram polimórficos (59,18%) e a diversidade gênica estimada (H_e) foi de 0,20. Por meio do programa Hickory que não assume o equilíbrio de H-W a H_e foi de 0,18, o que aumenta a consistência do resultado obtido no TFPGA. Silva (2007b) relatou valor de $H_e = 0,086$ para *M. quadrifasciata* utilizando marcadores microssatélites. Em himenópteros, tem se verificado que as espécies dessa ordem apresentam baixa variabilidade genética quando comparado a outros insetos (Berkelhamer, 1983; Graur, 1985; Packer e Owen, 1992; Packer *et al.* 1992). Borges (2007) utilizando marcadores microssatélites em estudo de diversidade genética em *Partamona heleri*, também relatou uma baixa diversidade gênica.

Os baixos níveis de variabilidade genética podem ser explicados pelo sistema de determinação do sexo, comportamento social e características ecológicas destes organismos. O sistema haplodiploide de determinação do sexo, de acordo com alguns autores, leva a produção de poucos locos polimórficos por causa da seleção contra genes recessivos deletérios expressos nos machos (Hartl, 1971; Kerr, 1976). A haplodiploidia poderia, entretanto, ocasionar a diminuição do tamanho efetivo da população, aumento da taxa de fixação de alelos e dificultando a produção de polimorfismos estáveis. Outra possível explicação para a baixa variabilidade genética nos himenópteros está relacionada com a estabilidade ambiental dentro da colônia. Segundo a hipótese de Van Valen (1965), há uma tendência ao aumento da heterozigosidade frente a variações ambientais. Considerando que as colônias de insetos sociais funcionam como um microhabitat parcialmente tamponado, baixa variabilidade é esperada para estas espécies.

Outros fatores também podem estar relacionados com os baixos níveis de diversidade genética detectados em *M. quadrifasciata* como, por exemplo, o relevo formado por grandes vales e elevações como o Vale do São Francisco, a Serra do Cabral, Maciço do Espinhaço e Serra do Cipó, localizados nas mediações das localidades amostradas. As barreiras geográficas podem dificultar ou até mesmo impedir fluxo gênico entre indivíduos de *M. quadrifasciata* e levar a um aumento de endogamia.

No dendrograma de agrupamento obtido (Figura 5), o coeficiente de similaridade genética entre as colônias analisadas variou de 0,69 a 0,98. Considerando a separação do agrupamento em nível de 0,71 de similaridade genética, quatro grupos distintos foram formados (Figura 5, Tabela 3).

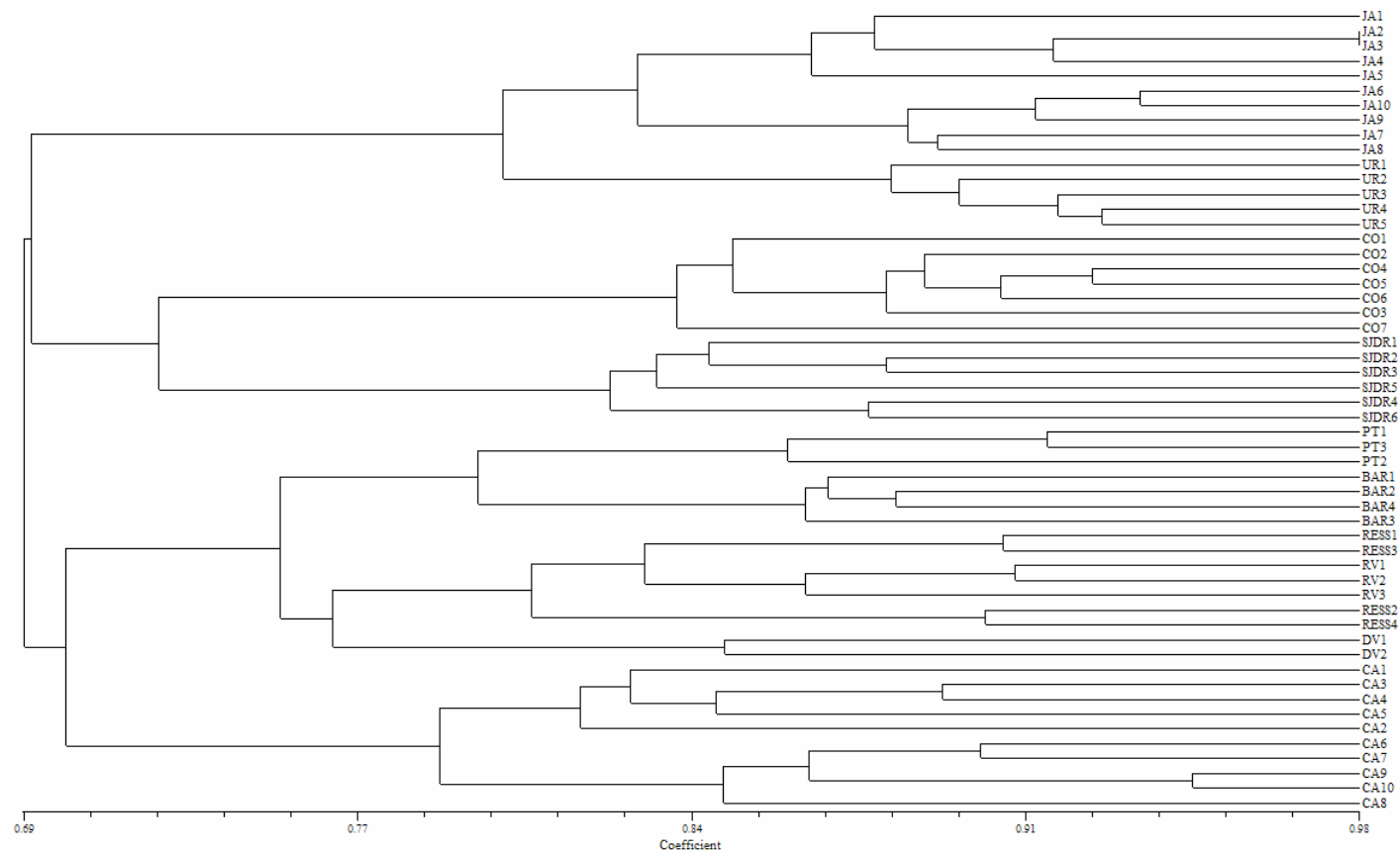


Figura 4. Dendrograma de similaridade genética obtido pelo método UPGMA utilizando o índice Jaccard

Legenda: JA= Januária; UR= Uruçuaia; CO=Cristiano Ottoni; SJDR= São João Del Rei; PT= Pote; BAR= Barbacena; RV= Rio Vermelho; RESS= Ressaquinha; CA=Caeté.

Tabela 3. Agrupamento das localidades de coleta de *M. quadrifasciata* discriminados em nível de 70% de similaridade genética.

Grupos	Localidades
I	Cristiano Ottoni e São João Del Rei
II	Poté, Barbacena, Ressaquina, Rio Vermelho e Diogo de Vasconcelos.
III	Caeté
IV	Januária e Uruçuaia

Os grupos I, II e III contêm indivíduos de *M. q.* de faixas interrompidas e procedentes de localidades de altitude elevada (500 a 1.400 metros) enquanto o grupo IV contém *M. q.* de faixas contínuas e procedentes de localidades do vale do São Francisco com altitude baixa (500-600 metros). A altitude pode desta forma, estar contribuindo para a separação entre populações de Januária e Uruçuaia das demais.

Os grupos formados não refletem em sua totalidade uma correlação entre distância genética e distância geográfica. Os grupos I e IV, por exemplo, incluem indivíduos de localidades geograficamente próximas. O grupo II, no entanto, foi formado por indivíduos de localidades próximas como Barbacena e Ressaquinha e localidades distantes destas como Diogo de Vasconcelos, Rio Vermelho e Poté.

A AMOVA realizada com dois níveis hierárquicos (entre localidades e dentro das localidades) mostrou um percentual de variação maior entre as localidades do que dentro de localidades e o Φ_{st} nestas condições foi de 0,53 (Tabela 4). Na análise realizada com três níveis hierárquicos (entre grupos, entre localidades dentro dos grupos e dentro de localidades) considerando tanto o agrupamento obtido pelo método UPGMA quanto o formado pelo padrão de faixas terçais, o percentual de variação entre os grupos foi menor do que entre localidades dentro dos grupos. Para os grupos formados pelo UPGMA, o Φ_{st} foi 0,54 e para os grupos formados com base nas faixas terçais foi de 0,56 (Tabela 4).

Na análise realizada por meio do programa Hickory, o índice de fixação representado por θ^B (análogo ao F_{st}) para o modelo utilizado foi de 0,52.

Na AMOVA particionada em dois níveis, a diferença no percentual de variação entre localidades (52,79%) e dentro de localidades (47,21%) foi pequena. Quando a análise foi particionada em três níveis hierárquicos, o percentual de variação foi maior dentro de localidades. Um dos fatores que determina a distribuição da diversidade genética entre e dentro das populações é o fluxo gênico. A maior concentração da variabilidade genética dentro das localidades está possivelmente relacionada com um fluxo gênico restrito ou ausente entre indivíduos das diferentes localidades, podendo acarretar um alto índice de endogamia dentro das localidades.

O percentual de variação dentro das localidades e os valores de Φ_{st} acima de 0,50 (Tabela 4) obtidos tanto para dois quanto para três níveis hierárquicos, mostram que *M. quadrifasciata* está altamente estruturada dentro das localidades analisadas. A matriz de Φ_{st} par a par entre as localidades confirma a alta diferenciação de *M. quadrifasciata* entre as regiões amostradas (Tabela 5).

Na análise da estruturação genética pelo método Bayesiano, cada um dos quatro modelos obtidos revelou DIC, θ^B e f diferentes (Tabela 6). O modelo “*f free model*”, o escolhido para a análise do presente trabalho por ter o θ^B análogo ao Φ_{st} da AMOVA, revelou DIC de 1561,17 no qual o valor de θ^B , estimador de Φ_{st} , foi de 0,52 (SD = 0,021; intervalo de confiança 2,5% = 0,4773; intervalo de confiança 50% = 0,52; intervalo de confiança 97,5% = 0,56). O valor de θ^B que corrobora com o resultado da AMOVA ($\Phi_{st} > 0,50$) confirma a alta estruturação genética dentro das localidades analisadas.

Os resultados obtidos pelo método Bayesiano em consonância com os resultados da AMOVA sugerem uma alta estruturação genética de *M. quadrifasciata* nas localidades analisadas.

Resultados semelhantes utilizando esses dois aplicativos foram obtidos em estudos com plantas utilizando polimorfismos ISSR. Sica et al. (2005) estudando a diferenciação entre populações italianas de *Asparagus acutifolius* L., e Rossi (2007) ao comparar diversidade genética e

diferenciação geográfica entre populações naturais de *Psychotria ipecacuanha* (Rubiaceae) nas florestas Atlântica e Amazônica verificaram, também, coerência entre esses aplicativos.

Tabela 4. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para diferentes níveis hierárquicos em grupos de *Melipona quadrifasciata*.

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Varição (%)	Valor de P*
Dois níveis hierárquicos:				
Entre localidades	9	507,98	52,79	<0,001
Dentro de localidades	44	361,44	47,21	<0,001
Total	53	869,42		
Índice de fixação $\Phi_{st}=0,53$				
Três níveis hierárquicos considerando análise de agrupamento:				
Entre grupos	3	307,64	21,74	<0,001
Entre localidades dentro dos grupos	6	200,34	32,60	<0,001
Dentro de localidades	44	361,44	45,66	<0,001
Total	53	869,42		
Índice de fixação $\Phi_{st}= 0,54$				
Três níveis hierárquicos considerando faixas terciais				
Entre grupos	1	130,86	15,07	<0,001
Entre localidades dentro dos grupos	8	377,11	41,57	<0,001
Dentro de localidades	44	361,44	43,36	<0,001
Total	53	869,42		
Índice de Fixação $\Phi_{st}= 0,56$				

*Valores de P são as probabilidades de ter um componente da variância maior que os valores observados ao acaso. As probabilidades foram calculadas por 1000 permutações ao acaso.

GL= grau de liberdade.

Tabela 5. Φ_{st} par a par entre as localidades amostradas.

	JA	UR	PT	BAR	RESS	RV	DV	CO	SJDR	CA
JA	0,00000									
UR	0,38858	0,00000								
PT	0,57683	0,63173	0,00000							
BAR	0,56708	0,62467	0,40642	0,00000						
RESS	0,57815	0,63062	0,38381	0,41857	0,00000					
RV	0,62481	0,67932	0,51220	0,56787	0,23377	0,00000				
DV	0,56707	0,63651	0,49744	0,54188	0,39006	0,42308	0,00000			
CO	0,59669	0,65509	0,58559	0,57700	0,55960	0,58675	0,57660	0,00000		
SJDR	0,51041	0,54262	0,55236	0,51874	0,52078	0,58054	0,42481	0,49162	0,00000	
CA	0,48986	0,51261	0,45990	0,42777	0,44668	0,50279	0,36626	0,52062	0,44521	0,00000

Tabela 6. Modelos testados, estimativas de f e θ^B , e DIC fornecidos pelo software HICKORY versão 1.1 na análise da estruturação e diversidade gênica em *M. quadrifasciata* pelo método Bayesiano.

Model	f	θ^B	DIC
full	0.478794	0.507576	1493.15
$f = 0$	-	0.463838	1553.87
θ^B	0.915769	-	3811.43
f free	0.494465	0.519349	1561.17

O teste de Mantel (Figura 6) realizado para verificar a existência de correlação entre distância genética e distância geográfica mostrou uma correlação positiva, porém baixa ($r = 0,28$).

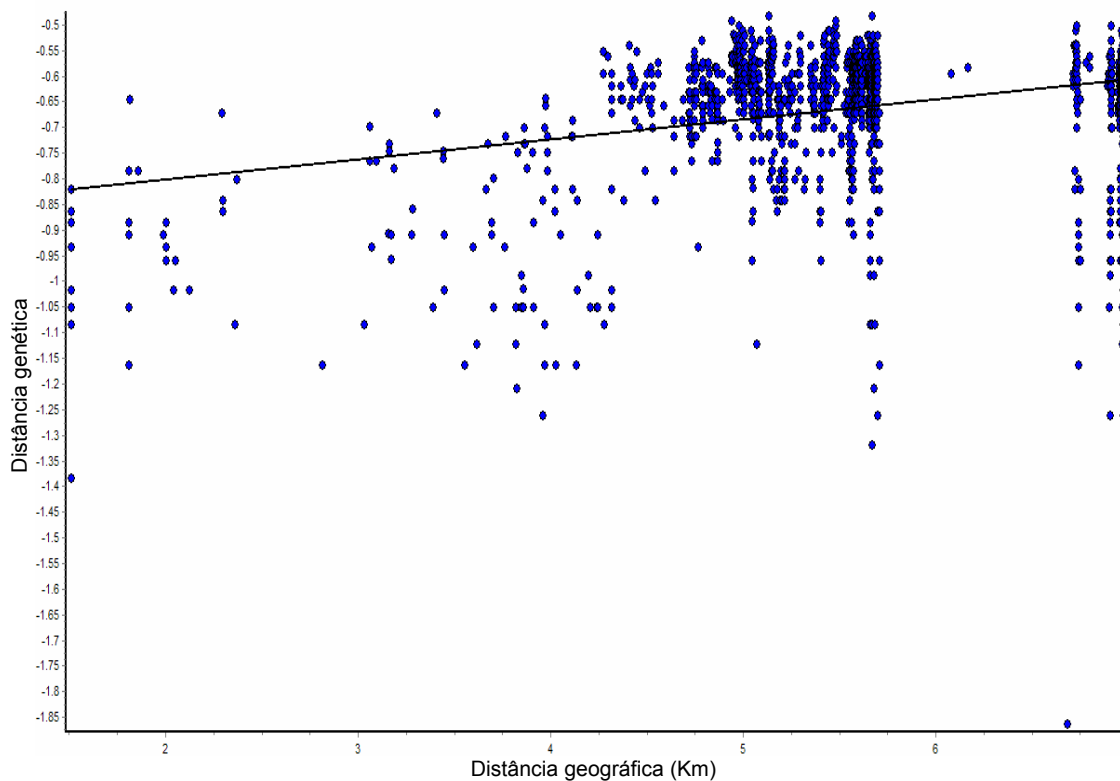


Figura 5. Correlação entre distância genética e distância geográfica (em km) obtida pelo teste de Mantel. $r=0,28$; $p=0,001$.

A alta estruturação genética de *M. quadrifasciata* dentro das localidades analisadas sugere que esta espécie não se distribui de forma contínua no espaço geográfico e que a ocorrência de fluxo gênico entre os indivíduos das diferentes localidades é baixa ou inexistente.

O fluxo gênico é o fator evolutivo responsável pela homogeneização das populações, restringindo os efeitos da deriva genética e da seleção e, portanto, a divergência entre as populações (Valva e Coelho, 1998).

Uma outra possível explicação para a alta estruturação genética dentro das localidades, é a limitação de vôo nos meliponíneos. Araújo et al. (2004), em um estudo sobre as implicações espaciais da distância máxima de vôo para algumas espécies de meliponíneos, verificaram que a capacidade de vôo de *M. quadrifasciata* não é superior a 2.000 m; e

sugerem que espécies como *M. compressipes* e *M. quadrifasciata* seriam efetivamente isoladas se as distâncias entre os fragmentos de floresta fossem maiores que 2 km. As distâncias mínimas e máximas entre as localidades onde foram realizadas as coletas de *M. quadrifasciata* são, respectivamente de 50 e 500 km sugerindo que estruturação dos indivíduos nas localidades amostradas pode ser em função da distância geográfica entre elas.

Um outro fator que pode estar contribuindo para a alta estruturação e consequentemente baixa diversidade genética nesta espécie é a redução do habitat natural. Segundo Michener (2000), a degradação ambiental vem provocando nos últimos anos a diminuição nas populações de abelhas em todo o mundo. Dentre os fatores de degradação ambiental destaca-se o desmatamento. Esta atividade reduz áreas florestais e leva à diminuição das populações que habitam esses locais. A diminuição das populações pode acarretar aumento na endogamia, e consequentemente redução da diversidade genética devido à redução populacional que as mesmas sofreram.

No estado de Minas Gerais, as populações de abelhas têm sido intensamente afetadas pelos desmatamentos, os quais isolam áreas que pertenciam anteriormente a ecossistemas contínuos, formando ilhas florestais. A diminuição de áreas de florestas, em geral, resulta na redução do tamanho das populações que vivem e dependem desses habitats. De acordo com estudos realizados por Fernandes et al. (2005), o Estado de Minas Gerais possui um índice de degradação (ID) médio de 86%. Algumas formações vegetais do estado foram drasticamente reduzidas, como é o caso da mata Atlântica, e os fragmentos remanescentes, geralmente, muito pequenos, não apresentam condições de suportar um grande número de espécies com alto número populacional (Viana e Melo, 1987) e isso pode levar à perda da variabilidade genética.

Apesar de o marcador ISSR estar sendo utilizado em diversos estudos em nível de DNA, os estudos de diversidade genética em abelhas são raros. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o marcador ISSR permitiu a detecção de polimorfismos genéticos possibilitando a obtenção de informações importantes sobre a diversidade e estruturação

genética desta espécie de abelha. No entanto, estudos moleculares mais detalhados, aumentando a amostragem e utilizando número maior de *primers* ISSR poderão esclarecer melhor a dinâmica populacional de *M. quadrifasciata*.

5. CONCLUSÕES

O estudo da variabilidade genética de *M. quadrifasciata* por meio de dados com marcadores ISSR possibilitou chegar às seguintes conclusões:

- Há baixo nível de variabilidade dentro da subespécie e uma alta estrutura genética dos indivíduos dentro das localidades analisadas.
- Há indício de fluxo gênico restrito ou até mesmo ausente entre indivíduos de *M. quadrifasciata*.
- A maior parte da variabilidade genética estimada para *M. quadrifasciata* é encontrada dentro das localidades.
- A correlação entre distância genética e geográfica é baixa em *M. quadrifasciata*.
- Embora exista evidente variação morfológica entre os indivíduos de *M. quadrifasciata* analisados (indivíduos com faixas terçais contínuas e indivíduos com faixas terçais interrompidas) a divergência genética entre estes dois grupos é baixa.
- Fatores biológicos e geográficos podem estar influenciando na dinâmica populacional de *M. quadrifasciata* no Estado de Minas Gerais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDAR, D. S. (1996). A mandaçaia: Biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Série Monografias, n. 4. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto – SP, 9 -10.

ARAÚJO, E.D., COSTA, M., CHAUD-NETTO, J., FOWLER, H.G. (2004) Tamanho do corpo em Meliponini (Hymenoptera: Apidae): inferência do raio de vôo e possíveis implicações ecológicas. Braz. J. Biol., 64(3B): 563-568.

BEREZOVSKAYA, O.P., MOROZ, O.Y., SIDORENKO, A.P. (2002). Intra- and interspecific differences in ISSR-PCR characteristics of *Bumble* bees (Hymenoptera: Bombinae). Cytol. Gen., 36(3): 25-31.

BERKELHAMER, R.C. (1983). Intraspecific genetic variation and haplodiploidy, eusociality, and polygyny in the Hymenoptera. Evolution 37: 540-545.

BORBA, R.S., GARCIA, S.M., KOVALESKI, A., OLIVEIRA, A.C., ZIMMER, P.D., BRANCO, J.S.C., MALONE, G. (2005). Dissimilaridade Genética de Linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Através de Marcadores Moleculares ISSR. Neotrop. Entomol., 34: 565 -569.

BORGES, A.A. (2007). Variabilidade genética de *Partamona heleri* Friese, 1990 (Hymenoptera, Apidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG. 48p.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. (2001). Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat SSR Markers; reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Mol. Biology Rep., 19: 209-215.

BROWN, J.C., ALBRECHT, C. (2001). The effect of tropical deforestation on stingless bees of the genus *Melipona* (Insecta: Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in central Rondônia, Brazil. *J. Biogeography*, 28: 623-634.

EIADTHONG, W., YONEMORI, K., SUGIURA, A., UTSUNOMIYA, N., SUBHADRABANDHU, S. (1999). Identification of mango cultivars of Thailand and evaluation of their genetic variation using the amplified fragments by simple sequence repeat-(SSR-) anchored primers. *Sci. Horticult.*, 82: 57-66.

EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E., QUATTRO, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.

EXCOFFIER, L., LAVAL, G., SCHNEIDER, S. (2006). Arlequin ver 3.01. An integrated software package for population genetics data analysis. Computational and molecular population genetics lab (CMPG). Institute of Zoologia. University of Berne.

FERNANDES, E.A., CUNHA, N.R., SILVEIRA, S., GOMES, R. (2005). Degradação Ambiental no Estado de Minas Gerais. *RER.*, 43(1): 179-198.

GRAUR, D. (1985). Gene diversity in Hymenoptera. *Evolution* 39(1): 190-199.

GUPTA, M., CHYI, Y-S., ROMERO-SEVERSON, J., OWEN, J.L. (1994). Amplification of DNA from evolutionarily diverse using single primers of simple-sequence repeats. *Teor. Appl. Gen.*, 89: 998-1006.

HARTL, D. L. (1971). Some aspects of natural selection in arrhenotokous populations. *Amer. Zool.*, 11: 305-325.

HARTL, D.L. (1981). A primer of population genetics. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 191p.

HE, L., WANG, S., MIAO, X., WU, H., HUANG, Y. (2006). Identification of necrophagous fly species using ISSR and SCAR markers. *Forensic Sci. Intern.*, doi:10.1016/forsciint.2006.07.006.

HOLSINGER, K.E., LEWIS, P.O. (2005). A Package for Analysis of Population Genetic Data Department of Ecology & Evolutionary Biology, University of Connecticut Storrs, USA.

HOLSINGER, K.E.; LEWIS, P.O.; DEY, D.K. (2003). A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. *Molecular Ecology*, 12: 2649-2659.

HUNDSDOERFER, A.K., WINK, M. (2005). New Source of polymorphisms in Lepidoptera). *Z. Naturf.*, 60: 618-624.

KERR, W. E. (1976). Population genetics studies in bees. II. Sex-linked genes. *Evolution*, 30: 94-99.

KERR, W.E. (1950). Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. *Genetics* 35:143-152.

KERR, W.E. (2005). Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Mensagem Doce*, n.80.

KERR, W.E., CARVALHO, G.A., NASCIMENTO, V.A. (1996). *Abelha Uruçu. Biologia, Manejo e Conservação. Coleção Manejo da vida Silvestre. nº. 2. Belo Horizonte, Acangaú.*

KUMAR, L.S., SAWANT, A.S., GUPTA, V.S., RANJEKAR, P.K. (2001). Comparative analysis of genetic diversity among Indian populations of *Scirpophaga incertulas* by ISSR-PCR. *Biochem. Genet.*, 38: 9-10.

LEON, J.H., JONES, W.A. (2005). Genetic differentiation among geographic populations of *Gonatocerus ashmeadi*, the predominant egg parasitoid of the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca coagulata*. J. Insect Sci., 5(2): 1-9.

LUQUE, C., LEGAL, L., STAUDTER, H., GERS, C., WINK, M. (2002). ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepdoptera). Hereditas, 136: 251-253.

MELLO. G.A.R., CAMPOS, L.A.O. (1987). Variação do padrão de faixas tergais na população de *M. quadrifasciata* Lepeletier, 1936, no Estado de Minas Gerais (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). XIV Congresso Brasileiro de Zoologia. Juiz de Fora, MG. 1 a 6 de Fevereiro.

MICHENER, C.D. (2000). The bees of the world. The Jonh Hopkins University Press. 913p.

MILLER. M.P. (1997). Tools for population genetic analysis (TFPGA), version 1.3: A Windows program for analysis of allozyme and molecular population genetic data. Flagstaff, University of Northem Arizona.

MILLER. M.P. (2005). Alleles in space: computer software for the joint analysis of interdividual spatial and genetic information. J. of heredity, 96: 722-724.

MORETTO, G., ARIAS, M.C. (2005). Detection of Mitochondrial DNA Restriction Site Differences Between the Subspecies of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Neotropical Entomology. 34(3): 381-385.

NEI, M. (1987) Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press, 512p.

NUNES, L.A., PINTO, M. F.F.C., CARNEIRO, P., PEREIRA, D.G., WALDSCHMIDT, A.M. (2007). Divergência genética em *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera: Apidae) com base em caracteres morfológicos. Biosc. J., 23: 1-9.

PACKER, L., OLATEAUX-QUÉNU, C., OWEN, R.E. (1992). Electrophoretic evidence that *Lasioglossum (Evyllaes) mediterraneum* (Blüthgen) is a species distinct from *L. (E.) laticeps* (Schenck) (Hymenoptera, Halictidae) with notes on its phylogenetic position. Can. Ent. 124: 371-380.

PACKER, L., OWEN, R.E. (1992). Variable enzyme systems in the Hymenoptera. Biochem. Syst. Ecol. 20: 1-7.

PAPLAUSKIENÉ, V., CEKSTERYTE, V., PAPLAUSKIENÉ, I., TAMASAUSKIENE, D., RACYS, J. (2006). The use of ISSR for the assessment of genetic diversity. Biologija, 3: 16-20.

ROHLF, F.J. (2005). NTSYS- pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter, Software.

ROSSI, A.A.B. (2007). Avaliação comparativa da diversidade genética e diferenciação geográfica entre populações naturais de *Psycitria ipecacuanha* (Rubiaceae) nas florestas Atlântica e Amazônica. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG. 122p.

SCHWARZ, H. (1948). Stingless bees (Meliponidae) of the Western Hemisphere. New York. Bulletin of the American Museum of Natural history, New York, 167p.

SICA, M., GAMBA, G., MONTIERI, S., GAUDIO, L., ACETO, S. (2005). ISSR markers show differentiation among Italian populations of *Asparagus acutifolius* L BMC Genet., 6, (17): 1-7.

SILVA, M.M. (2007b). Caracterização da variabilidade genética do camarão *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 em fazendas de produção da região da canavieira BA. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus-BA. 74p.

SILVA, MS. (2006). Diversidade e estrutura genética em populações naturais de *geonoma schottiana* Mart. no parque florestal Quedas Do Rio Bonito. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal Lavras. Minas Gerais. 51p.

SILVA, R.B. (2007a). Variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) no Estado de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG. 41p.

SILVEIRA, F.A., MELO, G.A.R., ALMEIDA, E.A.B. (2002). Abelhas Brasileiras: sistemática e identificação. Belo Horizonte, p. 41-42.

SOUSA, G. A. (2007). Diversidade genética de *Zabrotes subfasciatus* Boheman (Coleoptera: Bruchidae) avaliada com marcadores ISSR. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG. 42p.

SPIEGELHALTER, D.J., BEST N.G., CARLIN. B.P., VAN DER LINDE A. (2002). Bayesian measures of complexity and fit. J.R. Statist. Soc. Séries B, 64: 483-639.

VALVA, F. A., COELHO, A. S. G. (1998). Estrutura genética de populações vegetais: estratégias adaptativas do cerrado. *In* Congresso Nacional de Genética, 44. Goiânia, Goiás. Resumos.

VAN VALEN, L. (1965). Morphological variation and width of ecological niche. Am. Nat. 99: 377-390.

VIANA, B.V., MELO, G.A.R. (1987). Conservação de abelhas. Informativo Agropecuário, 13 (149).

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

WALDSCHMIDT, A.M., BARROS, E.G., CAMPOS, L.A.O. (2000). A molecular marker distinguishes the subspecies *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae. Gen. Mol. Biol., 3: 609-611.

WOLFE, A.D. (2005). ISSR techniques for evolutionary biology. Meth. Enzimol., 395: 134-144.

ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A., LABUDA, D. (1994). Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20: 173-183.