

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – CAMPUS UFV FLORESTAL

BRUNA DIAS RIOS

**GENOTIPAGEM DE COLÔNIAS DE ABELHA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO INDICA
IMPORTÂNCIA GENÉTICA DE POPULAÇÕES MANEJADAS PARA A CONSERVAÇÃO
DE *Melipona capixaba***

**FLORESTAL
MINAS GERAIS – BRASIL
2018**

BRUNA DIAS RIOS

**GENOTIPAGEM DE COLÔNIAS DE ABELHA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO INDICA
IMPORTÂNCIA GENÉTICA DE POPULAÇÕES MANEJADAS PARA A CONSERVAÇÃO
DE *Melipona capixaba***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

FLORESTAL
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca da Universidade Federal
de Viçosa - Câmpus Florestal

T

595.799
2018 Rios, Bruna Dias, 1993-
Genotipagem de colônias de abelha ameaçada de extinção
indica importância genética de populações manejadas para a
conservação de *Melipona capixaba* : . / Bruna Dias Rios. –
Florestal, MG, 2018.

ix, 81f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Helder Canto Resende.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa -
campus UFV Florestal.

Inclui bibliografia.

1. Abelha sem ferrão. 2. Mata Atlântica. 3. Stingless bee.
4. SSR markers. 5. Meliponicultura. 6. Meliponídeos.

I. Universidade Federal de Viçosa - campus UFV Florestal.

Instituto de Ciências Agrárias. Mestrado em Manejo e

Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários. II. Título.

R586i

BRUNA DIAS RIOS

**GENOTIPAGEM DE COLÔNIAS DE ABELHA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO INDICA
IMPORTÂNCIA GENÉTICA DE POPULAÇÕES MANEJADAS PARA A CONSERVAÇÃO
DE *Melipona capixaba***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de junho de 2018.

José Eustáquio dos Santos Júnior

Renata Santiago de Oliveira Buzatti

Helder Canto Resende
(Orientador)

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver...”

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre guiar meus passos, por me dar sabedoria, entendimento e paciência.

À minha mãe, que em momento algum deixou de me apoiar, sempre me deu amor, carinho e teve paciência comigo nos momentos mais difíceis. Agradeço ao meu pai, que mesmo não estando mais presente entre nós, me deixou vários ensinamentos. Tenho certeza que está muito orgulhoso e que também caminhou ao meu lado, me apoiando e me dando força sempre que precisei.

Ao meu irmão Paulo Alberto, sou grata pela amizade, companheirismo e paciência. À minha sobrinha, mesmo tão pequenininha, sou grata pelos gestos de carinho.

À toda minha família sou grata por torcerem e acreditarem em mim. Ninguém se faz sozinho, sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor... Sem vocês eu jamais teria conseguido chegar até aqui.

Ao meu namorado Filipe, por todo apoio e compreensão. Você me deu força nos momentos em que mais precisei, escutou meus choros e lamentações, me deu amor, carinho, conselhos, foi paciente e às vezes até professor.

Agradeço também aos meus amigos (especialmente Pollyana, Diênny, Letícia e Flaviane) por todo apoio, companheirismo e torcida.

Ao professor e orientador Helder Canto Resende, que me acompanhou desde a graduação, pelo companheirismo, oportunidade, confiança e ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, José Eustáquio e Jean, pelo auxílio e ensinamentos durante as etapas de genotipagem.

Aos membros da banca examinadora, Renata Buzatti e José Eustáquio, por aceitarem prontamente o convite e pelas contribuições valiosas para este trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa - *campus* UFV Florestal e ao programa de Pós-graduação em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários pela oportunidade de realização deste trabalho. Agradeço especialmente a todos os professores pelos ensinamentos e conselhos.

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

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO 1. GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO DE <i>Melipona capixaba</i>: A IMPORTÂNCIA GENÉTICA DAS COLÔNIAS MANEJADAS.....	7
1. RESUMO.....	7
2. INTRODUÇÃO	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 Material Biológico	12
3.2 Extração de DNA Total	13
3.3 Amplificação do DNA e Marcadores Moleculares.....	14
3.4 Análises dos Dados.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Caracterização dos Loco Microsatélites.....	19
4.2 Diversidade Genética das Colônias de <i>Melipona capixaba</i> Amostradas na Natureza e em Meliponários	20
4.3 Influência do Manejo sobre a Diversidade Genética das Colônias Manejadas	29
4.4 Avaliação do Potencial Genético das Colônias Manejadas para a Conservação da espécie.....	31
4.5 Formação de Populações para a Conservação	34
5. CONCLUSÕES	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
CAPÍTULO 2. UTILIZAÇÃO DE <i>PRIMERS</i> MICROSSATÉLITES COMO AUXÍLIO NA DETECÇÃO DE HIBRIDIZAÇÃO ENTRE AS ABELHAS SEM FERRÃO <i>Melipona capixaba</i> E <i>Melipona scutellaris</i> (HYMENOPTERA: APIDAE).....	42

1. RESUMO.....	42
2. INTRODUÇÃO	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 Material Biológico	48
3.2 Amplificação do DNA e Marcadores Moleculares.....	49
3.3 Análises dos dados.....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 Análises Interespecíficas	52
4.2 Avaliação da Ocorrência de Hibridização entre Colônias de <i>M. capixaba</i> e <i>M. scutellaris</i> no estado de São Paulo, Brasil (RESENDE, 2012)	52
4.3 Avaliação da Ocorrência de Hibridização entre Colônias de <i>M. capixaba</i> e <i>M. scutellaris</i> no estado do Espírito Santo, Brasil (RAAD, 2017)	56
4.4 Consequências da Hibridização para a Conservação das Espécies <i>Melipona capixaba</i> e <i>Melipona scutellaris</i>	62
5. CONCLUSÕES	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
CONCLUSÕES GERAIS	68
ANEXOS	69

RESUMO

RIOS, Bruna Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa – *campus* UFV Florestal, junho de 2018. **Genotipagem de colônias de abelha ameaçada de extinção indica importância genética de populações manejadas para a conservação de *Melipona capixaba***. Orientador: Helder Canto Resende.

A abelha sem ferrão *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994, conhecida como “uruçu-preta” ou “uruçu capixaba”, é endêmica da Mata Atlântica brasileira, tendo distribuição restrita à regiões de altitude do Estado do Espírito Santo. A *M. capixaba* encontra-se na lista de espécies ameaçadas de extinção, na categoria em perigo (EN). A redução e a fragmentação do seu habitat natural constituem as principais ameaças à espécie, por ocasionar a redução das populações e o consequente aumento da endogamia, da deriva genética e a perda de diversidade genética. A maior parte das colônias remanescente de *M. capixaba* estão nas mãos de criadores de abelhas. Uma outra ameaça é a introdução da espécie *M. scutellaris* na área de distribuição natural da uruçu-capixaba, pois há relatos na literatura da ocorrência de hibridização entre as espécies. Diante desses fatos, este trabalho teve como objetivos: analisar a diversidade genética de colônias nativas e colônias manejadas de *M. capixaba* por meio de marcadores microssatélites, com o a finalidade avaliar o potencial genético das colônias manejadas e identificar genótipos prioritários para a formação de populações de conservação; identificar marcadores microssatélites com potencial para detectar híbridos entre as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris*; e melhorar o conhecimento sobre esse evento de hibridização. Os resultados obtidos indicaram que as populações naturais e manejadas possuem moderada diversidade genética, entretanto muitos alelos amostrados possuem baixa frequência e podem estar sendo perdidos devido aos efeitos da deriva genética. Muitos alelos que foram amostrados com baixa frequência nas colônias nativas, foram amostrados com maiores frequências em algumas populações manejadas. As populações manejadas podem representar um importante papel na conservação da espécie, podendo atuar como reservatórios genéticos e fornecer indivíduos para a formação de populações de conservação. Com os resultados obtidos por meio das análises de diversidade genética foi possível elaborar orientações de manejo para a conservar a diversidade genética das populações manejadas. A hibridização de fato ocorre entre as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris*. As análises moleculares realizadas com marcadores microssatélites associadas às análises do DNA mitocondrial e das características morfológicas permitiram identificar a ocorrência de hibridização e as possíveis vias de hibridização entre as espécies. A hibridização

pode ocorrer através da fecundação de fêmeas de *M. capixaba* por machos de *M. scutellaris* ou pela fecundação de fêmeas de *M. scutellaris* por machos *M. capixaba*. Os híbridos gerados são férteis e as fêmeas podem ser fecundadas por machos híbridos ou machos da espécie *M. scutellaris*. Os efeitos da hibridização para espécie *M. capixaba* são imprevisíveis, portanto deve-se impedir a introdução de *M. scutellaris* na área de ocorrência da urucu-capixaba.

ABSTRACT

RIOS, Bruna Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa – *campus* UFV Florestal, June, 2018. **Genotyping of bee colonies threatened of extinction indicates the genetic importance of managed populations for the conservation of *Melipona capixaba*.** Adviser: Helder Canto Resende.

Melipona capixaba Moure and Camargo, 1994, known as "uruçu-preta" or "uruçu-capixaba", is endemic to the Brazilian Atlantic Forest, with a restricted distribution to high altitude regions of the state of Espírito Santo. The *Melipona capixaba* is on the list of threatened Species in the endangered category (EN). The reduction and fragmentation of their natural habitat are the main threats to the species, as a result of the reduction of populations and the consequent increase in inbreeding, genetic drift and loss of genetic diversity. Most of the remaining colonies of *M. capixaba* are in the hands of beekeepers. Another threat is the introduction of the species *M. scutellaris* in the natural distribution area of uruçu-capixaba, as there are reports in the literature of the occurrence of hybridization between species. In view of these facts, this work had the following objectives: to analyze the genetic diversity of native colonies and colonies managed of *M. capixaba* by means of microsatellite markers, with the purpose of evaluating the genetic potential of the colonies managed and to identify priority genotypes for the formation of populations of conservation; identify microsatellite markers with potential to detect hybrids between the species *M. capixaba* and *M. scutellaris*; and improve knowledge about this hybridization event. The results indicated that the natural and managed populations have moderate genetic diversity, however, many sampled alleles have a low frequency and may be lost due to the effects of genetic drift. Many of the alleles that were sampled with low frequency in the native colonies were sampled with higher frequencies in some managed populations. The managed populations can play an important role in the conservation of the species, being able to act as genetic reservoirs and to provide individuals for the formation of conservation populations. With the results obtained through analyzes of genetic diversity it was possible to develop management guidelines to conserve the genetic diversity of the populations managed. Hybridization actually occurs between the species *M. capixaba* and *M. scutellaris*. Molecular analyzes performed with microsatellite markers associated to mitochondrial DNA analysis and morphological characteristics allowed to identify the occurrence of hybridization and possible hybridization pathways between species. Hybridization can occur through the fertilization of *M. capixaba* females by *M. scutellaris* males or by the fertilization of *M. scutellaris* females by

M. capixaba males. The hybrids generated are fertile, and females can be fertilized by hybrid males or males of *M. scutellaris* species. The effects of hybridization on *M. capixaba* species are unpredictable, therefore the introduction of *M. scutellaris* should be prevented in the area of occurrence of the Uruçu-capixaba.

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera: Apidae), é um diversificado grupo de abelhas pertencente a tribo Meliponini e ao grupo de abelhas conhecidas popularmente como “abelhas sem ferrão” (MICHENER, 2000). Suas espécies se distribuem por toda a região Neotropical (KERR et al., 2001; KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996; MICHENER, 2000).

As abelhas do gênero *Melipona* são importantes polinizadoras de uma diversidade de plantas, incluindo plantas nativas (RAMALHO, 2004) e cultivadas (HEARD, 1999). Por possuírem manejo relativamente fácil, podem ser utilizadas na polinização de culturas em áreas abertas ou em casas de vegetação (CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006; HEARD, 1999). Os produtos apícolas (mel, própolis, pólen) geram fonte de renda e são utilizados como alimentos e na medicina popular (CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006; KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997). Portanto, as espécies do gênero *Melipona* são indispensáveis para a manutenção dos ecossistemas terrestres e sua conservação é essencial tanto por questões ecológicas quanto econômicas (ZAYED, 2009).

O declínio de polinizadores, especialmente as abelhas, tem recebido grande ênfase como um fenômeno global. As atividades humanas têm elevado a destruição e a fragmentação dos habitats, contribuindo assim para a perda de uma diversidade de espécies de abelhas (POTTS et al., 2010). Apesar da sua importância, muitas espécies de meliponíneos estão sofrendo reduções drásticas em suas populações (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996). Atualmente três espécies do gênero *Melipona* estão incluídas na lista de espécies ameaçadas de extinção na categoria em perigo (BRASIL, 2014): *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994, *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, e *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836.

A espécie *M. capixaba*, popularmente conhecida como “uruçu-preta” ou “uruçu-capixaba,” é endêmica do domínio da Mata Atlântica, com ocorrência restrita às regiões com altitude entre 800 e 1.200 do Estado do Espírito Santo (RESENDE et al., 2014; SERRA et al., 2012). Sua área de distribuição geográfica está restrita a uma área com 3.453 Km² (RESENDE et al., 2014), o que pode representar a menor área de distribuição conhecida entre as abelhas sem ferrão (Melo, 1996). A uruçu-capixaba pode ser encontrada nos municípios de Afonso Cláudio, Alfredo Chaves, Brejetuba, Castelo, Conceição do Castelo, Domingos Martins, Marechal Floriano, Santa Maria de Jetibá, Vargem Alta e Venda Nova do Imigrante (RESENDE et al., 2014).

A *M. capixaba* é uma eficiente polinizadora das plantas nativas da Mata Atlântica brasileira (LUZ *et al.*, 2011). Resende e colaboradores (2008) relataram a visitação de orquídeas pela abelha *M. capixaba*, sendo algumas pertencentes a gêneros citados na Lista da flora ameaçada de extinção do Espírito Santo (PASSAMANI; MENDES, 2007). Em um estudo realizado por Luz e colaboradores (2011) foi evidenciado que a *M. capixaba* é visitante floral e potencial polinizador de plantas das famílias Fabaceae, Myrtaceae, Solanaceae, Arecaceae, Asteraceae, Combretaceae, Rubiaceae, e Sapindaceae.

Em 2003 a espécie *M. capixaba* foi incluída na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção, na categoria vulnerável (BRASIL, 2003). Atualmente a espécie encontra-se na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2014) na categoria em perigo (EN), critério: B1ab (i, ii, iii). Ou seja, a espécie enfrenta um risco muito alto de extinção na natureza: distribuição geográfica restrita e fragmentada, ocorrência estimada para uma área com menos de 5.000 km², seu habitat encontra-se severamente fragmentado e com declínio contínuo observado (IUCN, 2012). Considerando a vulnerabilidade destas espécies à extinção, os serviços ambientais prestados por elas estão atualmente ameaçados, o que pode causar prejuízos incalculáveis para a manutenção da biodiversidade da Mata Atlântica.

O desmatamento é a principal ameaça para a *M. capixaba*, pois além de ocasionar a destruição dos recursos florais e de nidificação, provoca fragmentação, redução e o isolamento das populações (SILVEIRA, MELO; CAMPOS, 2008). A redução e o isolamento das populações favorecem o aumento da endogamia e a perda de diversidade genética (ZAYED, 2009).

Uma outra ameaça é a introdução da espécie *M. scutellaris* na área de ocorrência natural de *M. capixaba*. Nascimento *et al* (2000), Resende (2012) e Raad (2017) evidenciaram que a ausência de mecanismos de isolamento anatômico ou comportamental entre as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* tornam possível o cruzamento entre elas quando ambas são colocadas em uma mesma área. As observações ainda sugeriram que as duas espécies são capazes de gerar híbridos férteis.

Diante do exposto, ficou evidenciado a necessidade de realizar estudos genéticos para traçar estratégias de conservação para a *M. capixaba*. O presente trabalho foi dividido em dois 2 capítulos. No primeiro capítulo, foram utilizados marcadores microssatélites para avaliar e caracterizar a diversidade e a estrutura das populações de *M. capixaba*. O estudo foi realizado com colônias presentes no seu habitat natural e em meliponários, com o propósito de identificar

o potencial genético destas colônias e sugerir genótipos prioritários para a conservação da espécie *in situ* e *ex situ*. O segundo capítulo teve como objetivo reavaliar dois casos de hibridização entre as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* e identificar possíveis marcadores microssatélites com potencial para detectar indivíduos híbridos entre as duas espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Lista Nacional de Espécies da Fauna Ameaçada de Extinção. Instrução Normativa nº3, de 27 de maio de 2003. **Ministério do Meio Ambiente**, p. 1-19, 2003.
- BRASIL. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçada de Extinção. Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014. Ministério do Meio Ambiente. **Diário Oficial da União**, v. 245, n. 1, p. 121–126, 2014.
- CORTOPASSI-LAURINO, M. et al. Global meliponiculture : challenges and opportunities To cite this version. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 275–292, 2006.
- HEARD, T. A. the Role of Stingless Bees in Crop Pollination. **Annual Review of Entomology**, v. 44, n. 1, p. 183–206, 1999.
- IUCN. IUCN Red list categories and criteria: version 3.1. Second edition. Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN. 32p. 2012.
- KERR, W. E. et al. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Mensagem Doce**, v. 80, p. 45–60, 2001.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação**. p. 157, 1996.
- LUZ, C. F. P. DA et al. Pollen sources for *Melipona capixaba* Moure & Camargo: an endangered Brazilian stingless bee. **Psyche**, v. 2011, 2011.
- MELO, G. A. R. Notes on the nesting biology of *Melipona capixaba* (Hymenoptera, Apidae). **Jornal of the Kansas Entomological Society**, v. 69, n. 2, p. 207–210, 1996. MOURE, J. S.; CAMARGO, J. M. F. *Melipona* (Michmelia) capixaba, uma nova espécie de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) do Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 11, n. 2, p. 289–296, 1994.
- MICHENER, C. D. **The bees of the world**. 2.ed. Baltimore, Johns Hopkins University Press, 953p. 2000.
- NASCIMENTO, V. A.; MATUSITA, S. H.; KERR, W. E. Evidence of hybridization between two species of *Melipona* bees. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 79–81, 2000.
- NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**. São Paulo: Nogueirapis. 445p. 1997.
- PASSAMANI, M.; MENDES, S. L. Espécies da fauna ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo. **Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica, Vitória**. 140 p., 2007.
- POTTS, S. G. et al. Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 25, n. 6, p. 345–353, 2010.
- RAAD, L. P. **Importância Genética de populações manejadas para a conservação de *Melipona capixaba* Moure & Camargo, 1994 e as consequências da hibridização com *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae)**. 2017. 60f. Dissertação (Mestrado em Entomologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

- RAMALHO, M. Stingless bees and mass flowering trees in the canopy of Atlantic Forest: a tight relationship. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 1, p. 37–47, 2004.
- RESENDE, H. C. et al. Visitação de orquídea por *Melipona capixaba* Moure & Camargo (Hymenoptera: Apidae), abelha ameaçada de extinção. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 5, p. 609–611, 2008.
- RESENDE, H. C. **Filogeografia e conservação de *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994 e *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, e biogeografia do gênero *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera: Apidae)**. 2012. 155f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.
- RESENDE, H. C. et al. Geographic distribution, key challenges, and prospects for the conservation of threatened stingless bee *Melipona capixaba* Moure and Camargo (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 529–535, 2014.
- SERRA, B. D. V. et al. Modeling potential geographical distribution of the wild nests of *Melipona capixaba* Moure & Camargo, 1994 (Hymenoptera, apidae): Conserving isolated populations in mountain habitats. **Natureza e Conservação**, v. 10, n. 2, p. 199–206, 2012.
- SILVEIRA, F. A., MELO, G. A. R., CAMPOS, L.A.O. *Melipona capixaba* Moure & Camargo, 1995, in MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND G. M.; PAGLIA A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília, DF, MMA; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas. vol. 1. p. 381-382, 2008.
- BRASIL. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçada de Extinção. Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014. Ministério do Meio Ambiente. **Diário Oficial da União**, v. 245, n. 1, p. 121–126, 2014.
- CORTOPASSI-LAURINO, M. et al. Global meliponiculture : challenges and opportunities. **Apidologie**, v.37, n°2, p. 275-292, 2006.
- HEARD, T. A. the Role of Stingless Bees in Crop Pollination. **Annual Review of Entomology**, v. 44, n. 1, p. 183–206, 1999.
- IUCN. **IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1**. 2ª ed. IUCN. Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN. 32p.
- KERR, W. E. et al. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Mensagem Doce**, v. 80, p. 45–60, 2001.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. Abelha Uruçu: Biologia, Manejo E Conservação. p. 157, 1996.
- LUZ, C. F. P. DA et al. Pollen sources for *Melipona capixaba* Moure & Camargo: An endangered Brazilian stingless bee. **Psyche**, v. 2011, 2011.
- MICHENER, C. D. **The bees of the world**. 2.ed. Baltimore, Johns Hopkins University Press, 953p. 2000.
- MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 2000.

NASCIMENTO, V. A.; MATUSITA, S. H.; KERR, W. E. Evidence of hybridization between two species of *Melipona* bees. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 79–81, 2000.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**. São Paulo: Nogueirapis. 445p. 1997.

PASSAMANI, M.; MENDES, S. L. Espécies da fauna ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo. **Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica, Vitória**. 140 p., 2007.

POTTS, S. G. et al. Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 25, n. 6, p. 345–353, 2010.

RAAD, L. P. **Importância Genética de populações manejadas para a conservação de *Melipona capixaba* Moure & Camargo, 1994 e as consequências da hibridização com *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae)**. 2017. 60f. Dissertação (Mestrado em Entomologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

RAMALHO, M. Stingless bees and mass flowering trees in the canopy of Atlantic Forest: a tight relationship. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 1, p. 37–47, 2004.

RESENDE, H. C. et al. Visitação de orquídea por *Melipona capixaba* Moure & Camargo (Hymenoptera: Apidae), abelha ameaçada de extinção. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 5, p. 609–611, 2008.

RESENDE, H. C. **Filogeografia e conservação de *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994 e *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, e biogeografia do gênero *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera: Apidae)**. 2012. 155f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

RESENDE, H. C. et al. Geographic distribution, key challenges, and prospects for the conservation of threatened stingless bee *Melipona capixaba* Moure and Camargo (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 529–535, 2014.

SILVEIRA, F. A., MELO, G. A. R., CAMPOS, L.A.O. *Melipona capixaba* Moure & Camargo, 1995, in MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND G. M.; PAGLIA A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília, DF, MMA; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas. volume 1. p. 381-382, 2008.

ZAYED, A. Bee genetics and conservation. **Apidologie**, v. 40. p. 237-262, 2009.

CAPÍTULO 1. GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO DE *Melipona capixaba*: A IMPORTÂNCIA GENÉTICA DAS COLÔNIAS MANEJADAS

1. RESUMO

Melipona capixaba é uma espécie de abelha sem ferrão endêmica da Mata atlântica do Espírito Santo, Brasil, tendo distribuição restrita à regiões de altitude. Devido ao seu endemismo, a fragmentação e destruição do seu habitat natural e à redução das populações naturais, a *M. capixaba* encontra-se na Lista de espécies ameaçadas a extinção, na categoria em perigo (EN). Poucas colônias de *M. capixaba* foram amostradas na natureza desde a sua descrição, sendo que a maior parte das colônias conhecidas são mantidas por criadores. Os planos de manejo e conservação da espécie devem ter como objetivo manter o maior número de colônias possíveis e a máxima variabilidade genética. A multiplicação e a reintrodução de colônias na sua área de ocorrência natural constituem uma das estratégias para sua conservação. Neste trabalho realizamos a genotipagem de colônias naturais e colônias oriundas de meliponários, com o objetivo de caracterizar a diversidade genética e estrutura genética destas populações e identificar genótipos prioritários para a formação de populações de conservação. Nossos dados indicaram que a população natural e as populações manejadas possuem uma razoável diversidade genética, entretanto muitos alelos possuem baixa frequência ou são raros, o que indica a perda de diversidade genética por deriva genética. Os resultados mostraram que os meliponários podem atuar como reservatórios genéticos e podem fornecer indivíduos para a formação de populações de conservação. Foi observado que a localização do meliponário, a fundação do meliponário e as técnicas de manejo exercem influências diretas sobre a diversidade genética das colônias. Com os resultados obtido foi possível elaborar orientações de manejo com o objetivo de manter o potencial genético das populações manejadas e auxiliar na conservação da espécie.

2. INTRODUÇÃO

A meliponicultura, ou manejo de meliponíneos consiste na criação racional de abelhas sem ferrão (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996). Essa atividade foi inicialmente desenvolvida pelos índios, depois começou a ser utilizada por pequenos e médios produtores rurais e atualmente é uma atividade em crescente desenvolvimento, sendo difundida em quase todo o território brasileiro (JAFFÉ et al., 2015; KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996). A criação de abelhas sem ferrão representa uma importante fonte de renda devido a comercialização dos produtos apícolas (mel, própolis, cera), além da atividade servir também como fonte de lazer (CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006; KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996).

As abelhas sem ferrão compõem o principal grupo de abelhas eusociais nativas do Brasil e são responsáveis por realizar a polinização de uma diversidade de plantas nativas e cultivadas (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996; MICHENER, 2000). Apesar da importância ecológica e econômica, as populações de abelha sem ferrão têm sofrido drásticas reduções. Geralmente as espécies de abelha sem ferrão são dependentes das características climáticas e florísticas de suas regiões de origem e de substratos naturais para a nidificação (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996). Os principais fatores que contribuem para a redução nas populações destes polinizadores são: a destruição de seus habitats naturais provocadas pelo desmatamento e queimadas, o que ocasiona a destruição de substratos para nidificação e dos recursos para forrageamento, além da redução e o isolamento das populações; o uso de agrotóxicos; a exploração predatória das colônias; as mudanças climáticas; a introdução de espécies exóticas; e patógenos (BROWN; PAXTON, 2009; KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996; POTTS et al., 2010).

A criação e exploração racional de abelhas sem ferrão pode representar uma importante alternativa para a preservação dos ambientes naturais e conservação das espécies de abelhas. Quando realizadas corretamente, a criação e a exploração racional de abelhas sem ferrão podem inibir a exploração predatória de mel das colônias nativas e protegendo as espécies das ações antrópicas (CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006; KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996).

A abelha sem ferrão *M. capixaba*, conhecida popularmente como “uruçu-preta” ou “uruçu-capixaba”, é uma espécie endêmica da Mata Atlântica brasileira e sua distribuição geográfica está restrita às regiões do estado do Espírito Santo com altitude entre 800 e 1.200 m (RESENDE et al., 2014; SERRA et al., 2012). A *M. capixaba* está na Lista Nacional das

Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção na categoria em perigo (EN) (BRASIL, 2014).

A principal ameaça à urucu-capixaba é a destruição e a fragmentação do seu habitat natural (RESENDE et al, 2014; SILVEIRA, MELO; CAMPOS, 2008). A Mata Atlântica é um dos biomas mais ameaçados do planeta e é considerada um dos *hotspot* mundiais por abrigar uma alta diversidade de seres vivos e endemismo, sendo uma das prioridades para a conservação (MYERS et al., 2000). Os dados apresentados pelo Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2017), mostram que este bioma tem sofrido contínuo processo de desmatamento desde a sua colonização. Os dados apresentados para o período de 2015 a 2016 mostram que uma área total de 29.075 ha de remanescentes florestais foram desmatados, o que representou um aumento de 57,7% na taxa de desmatamento em comparação com os resultados apresentados para o período de 2014 a 2015 (18.433 ha). Conforme o relatório apresentado no mesmo atlas, para o estado do Espírito Santo estima-se que dos 4.609.503 ha, 100% da área do estado originalmente cobertas pelo bioma Mata Atlântica, restem apenas 483.541 ha, ou seja, 10,5% da cobertura original.

A redução populacional tem efeitos diretos sobre a diversidade genética da espécie. Estudos realizados por meio de marcadores mitocondriais e nucleares evidenciaram a baixa variabilidade genética nas populações de *M. capixaba* (RAMOS, 2009; RAAD, 2017). Análises moleculares realizadas por meio de marcadores microssatélites e haplótipos mitocondriais mostraram que *M. capixaba* possui baixa variabilidade genética quando comparada com outras espécies de insetos (NOGUEIRA et al., 2014).

A fragmentação, a redução e o isolamento do habitat natural de *M. capixaba* ocasiona a redução das populações e o consequente aumento da endogamia, da deriva genética e a perda de diversidade genética (ELLSTRAND; ELAM, 1993; FRANKHAM et al., 2008). As populações de *Melipona* podem ser particularmente sensíveis aos efeitos da endogamia e da deriva genética devido ao seu sistema de determinação do sexo (ARAÚJO; DINIZ-FILHO; OLIVEIRA, 2000; ZAYED, 2009).

Nos Hymenopteras, o sistema de determinação do sexo é o haplodiplóide. Os machos são haploides (n), desenvolvem-se a partir de ovos não-fertilizados, já as fêmeas são diploides (2n) e desenvolvem-se a partir de ovos fertilizados (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996). Whiting (1933) propôs um mecanismo de determinação complementar do sexo (CSD) em Hymenopteras. Segundo o autor, existem múltiplos alelos em um único *loco* sexual que atuam como sinal primário no desenvolvimento do sexo dos Hymenopteras. As fêmeas

originam-se de ovos fertilizados e são sempre heterozigotas para o gene sexual. Os ovos não fecundados que possuem apenas uma cópia do alelo sexual, dá origem a machos viáveis. Entretanto, os ovos fertilizados que dão origem a indivíduos homozigotos no *loco* sexual se desenvolvem em machos diploides que são estéreis e menos viáveis que os machos haploides normalmente produzidos, ou são mortos pelas operárias (BEYE et al., 2004; KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996; WHITING, 1943). Em colônias em que machos diploides são produzidos em grandes quantidades as rainhas são eliminadas pelas operárias, o que pode causar o enfraquecimento e a morte da colônia (ARAÚJO; DINIZ-FILHO; OLIVEIRA, 2000; KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996; KERR e VENCOVSKY, 1982). Sendo assim, a redução das populações, com o conseqüente aumento da endogamia e da deriva genética, reduzem a diversidade de alelos sexuais, aumentando a frequência de homozigotos e a probabilidade de produzir machos diploides (ZAYED, 2009).

A exploração predatória do mel, também foi citada por Silveira e colaboradores (2008) como uma importante ameaça à conservação da *M. capixaba*. Segundo os autores, esta espécie é uma grande produtora de mel, sendo muito apreciada e visada pelos meliponicultores. Para a extração do mel, muitos ninhos são abertos e abandonados na mata, ficando expostos aos inimigos naturais (formigas, forídeos e patógenos) e às condições ambientais, ou são transferidos para as propriedades dos criadores, reduzindo as populações naturais.

A maioria das colônias de urucu-capixaba conhecidas são mantidas por meliponicultores, sendo assim a criação racional destas abelhas pode representar um importante papel na preservação da espécie (RESENDE et al. 2014; RESENDE, 2012). Entretanto, pouco se sabe sobre a diversidade genética e estruturação genética das populações de abelhas mantidas sobre criação racional (RAAD, 2017; RESENDE, 2012). Vários estudos têm demonstrado que a domesticação de animais ocasiona a redução da diversidade genética (BRUFORD; BRADLEY; LUIKART, 2003). A redução da diversidade genética pode ocorrer principalmente pela redução do tamanho populacional efetivo da população (BRUFORD; BRADLEY; LUIKART, 2003; WRIGHT, 2005; ZEDER et al., 2006). Meixner e colaboradores (2010) relataram a redução de diversidade genética em populações de *Apis mellifera* mantidas em apiários.

Estudos sobre a diversidade genética das populações manejadas de abelhas podem ajudar a identificar a viabilidade genética destas populações, fornecendo informações úteis para orientar o manejo das colônias e auxiliar na preservação das espécies (RAAD, 2017; RESENDE, 2012). Levando em consideração o endemismo e a difícil localização de colônias

de *M. capixaba* na natureza (RAAD, 2017; RESENDE et al., 2014), os planos de conservação devem ter como objetivo manter o maior número populacional e a máxima variabilidade genética da espécie. A reintrodução e o manejo das colônias em áreas naturais de preservação permanente pode ser uma alternativa viável para aumentar a população e auxiliar na conservação da espécie dentro da sua área geográfica de ocorrência natural (RESENDE et al., 2014). A reintrodução tem sido utilizada para a conservação de várias espécies ameaçadas de extinção e para restauração das espécies em áreas onde estas se tornaram localmente extintas (SEDDON et al., 2014).

Apesar dos impasses legais para a criação da *M. capixaba* em meliponários, a meliponicultura pode ser considerada uma alternativa viável para a conservação da espécie (RAAD, 2017; RESENDE, 2012). As populações manejadas de *M. capixaba* podem atuar como reservatórios genéticos e demográficos para reforçar as populações nativas e podem fornecer indivíduos para a formação de populações de conservação que podem ser reintroduzidas na área de ocorrência natural da espécie. As colônias manejadas podem conter variabilidade genética e genótipos prioritários para a conservação, fornecendo indivíduos para reintrodução ou translocação, diminuindo os riscos de endogamia. Sendo assim, o monitoramento das populações remanescentes de *M. capixaba* presentes na natureza e em meliponários por meio de marcadores moleculares pode fornecer informações importantes sobre a diversidade genética e estruturação das populações. Estudos de genética da conservação podem fornecer perspectivas interessantes para os planos de manejo e conservação da espécie *M. capixaba* (RAAD, 2017, RESENDE et al., 2014).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos estimar a diversidade genética e caracterizar a estrutura populacional das colônias de *M. capixaba* presentes nos habitats naturais e em meliponários e identificar genótipos prioritários para a formação de populações de conservação da espécie. Com os resultados obtidos, serão propostas orientações para os programas de manejo e conservação da urucu-capixaba e orientações para os meliponicultores quanto a reprodução das colônias, como as colônias-alvo para multiplicação, introdução e troca. O manejo adequado das colônias poderá aumentar a diversidade genética da espécie, diminuindo os riscos de endogamia, e, conseqüentemente, poderá garantir a manutenção de populações saudáveis e a conservação da espécie.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Biológico

As amostras de *M. capixaba* foram obtidas a partir de coletas realizadas por Resende (2012), Serra (2012), Raad (2017) e pela equipe do Laboratório de Genética e Conservação da Universidade Federal de Viçosa – *campus* UFV Florestal. Foram amostradas 121 colônias na área de ocorrência natural da espécie, sendo 30 colônias nativas e 91 colônias manejadas, amostradas em meliponários (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1 - Relação das amostras de *M. capixaba* analisadas.

ID	Voucher	Localidade	Município	Origem	Nº de Colônias
N1	Mcap3	São Bento de Urânia	Alfredo Chaves	Nativa	1
N2	Mcap4	São Roque de Maravilha	Alfredo Chaves	Nativa	3
N3	Mcap28	-	Venda Nova do Imigrante	Nativa	1
N4	Mcap43	Alto Caxixe	Venda Nova	Nativa	1
N5	Mcap60	Alto Parajú	Domingos Martins	Nativa	1
N6	Mcap67	Garrafão	Santa Maria do Jetibá	Nativa	1
N7	Mcap69	Alto Santa Maria	Santa Maria do Jetibá	Nativa	1
N8	Mcap70	Alto Santa Maria	Santa Maria do Jetibá	Nativa	3
N9	Mcap74	Pedra Azul	Domingos Martins	Nativa	1
N10	Mcap75	Pedra Azul	Domingos Martins	Nativa	1
N11	Mcap76	Pedra Azul	Domingos Martins	Nativa	1
N12	Mcap83	Pedra Azul	Domingos Martins	Nativa	1
N13	Mcap91	Pedra Azul	Domingos Martins	Nativa	2
N14	Mcap92	Pedra Azul	Domingos Martins	Nativa	1
N15	Mcap93	Pedra Azul	Domingos Martins	Nativa	1
N16	Mcap94	Pedra Azul	Domingos Martins	Nativa	1
N17	Mcap95	Pedra Azul	Domingos Martins	Nativa	1
N18	Mcap98	Pedra Azul	Domingos Martins	Nativa	1
N19	B01	Alto Tapira	Venda Nova do Imigrante	Nativa	1
N20	B05	Monte Santo	Brejetuba	Nativa	1
N21	B07	-	Brejetuba	Nativa	1
N22	B09	Alto Jucú	Domingos Martins	Nativa	1
N23	B10	Alto Castelinho	Vargem Alta	Nativa	1
N24	B12	Peçanha	Domingos Martins	Nativa	1
N25	B14	Alto Lavrinhas	Venda Nova do Imigrante	Nativa	1
M1	Mcap90	-	Conceição do Castelo	Meliponário 1	14
M2	Mcap80	Pedra Azul	Domingos Martins	Meliponário 2	13
M3	Mcap61	Alto Parajú	Domingos Martins	Meliponário 3	23
M4	Mcap5	Tijuco Preto	Domingos Martins	Meliponário 4	13
M5	Mcap64	Garrafão	Santa Maria do Jetibá	Meliponário 5	15
M6	Mcap86	-	Santa Maria do Jetibá	Meliponário 6	13
				Total	121

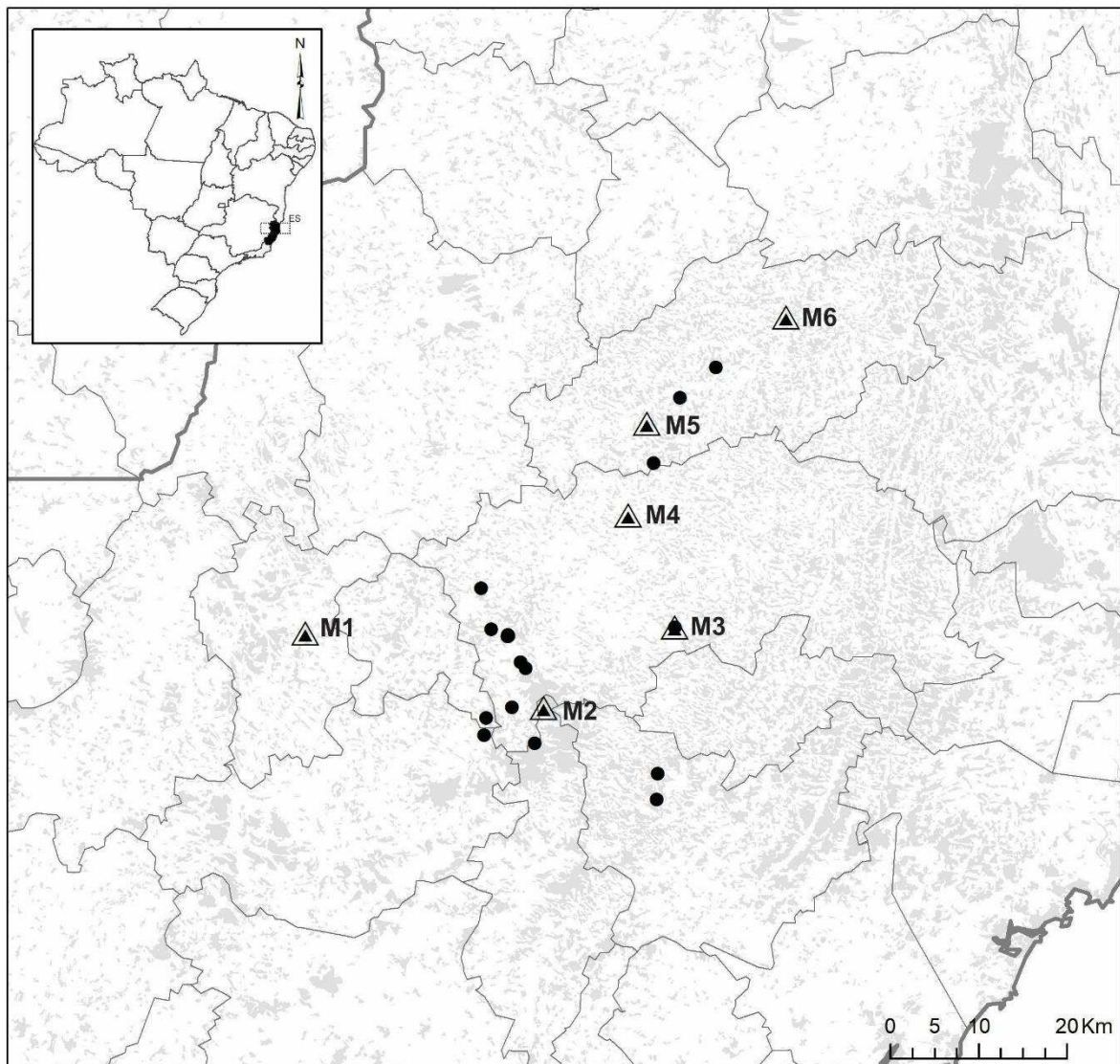


Figura 1 - Mapa da distribuição dos pontos de coleta de colônias nativas (círculos) e meliponários (triângulos) da espécie *M. capixaba*. Os fragmentos em cinza representam remanescentes florestais da Mata Atlântica, segundo mapa de Remanescentes da Fundação S.O.S Mata Atlântica e INPE (2016).

3.2 Extração de DNA Total

As extrações de DNA foram realizadas a partir de uma operária de cada colônia, seguindo o protocolo descrito por Fernandes-Salomão et al. (2005). Após a extração, a qualidade das amostras de DNA foi verificada em gel de agarose a 0,8% corado com GelRed® (Biotium, EUA) conforme instruções do fabricante, sendo visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. As amostras de DNA total foram mantidas sob refrigeração a -20°C até as etapas de amplificação.

3.3 Amplificação do DNA e Marcadores Moleculares

Inicialmente foram selecionados 17 pares de *primers* microssatélites (Tabela 2) desenhados pelo professor Helder Canto Resende (Universidade Federal de Viçosa – UFV *campus* Florestal) (dados não publicados). Dentre os 17 pares de primers, 5 pares foram desenhados para a espécie *M. scutellaris* e 12 pares para a espécie *M. capixaba*. Após esta seleção, os *primers* foram avaliados quanto à eficácia de amplificação em ambas espécies.

Tabela 2 – Descrição dos locos microssatélites e sequências de primers selecionados e testados inicialmente para as análises de diversidade genética em *M. capixaba*.

Loco	Repetição	Sequência (5'-3')	Espécie de Origem
SSR1	(GT) ₈	F: CACCGAAAGATACAAAGCCG R: GCGGGATTATTTTCATTACAGC	<i>M. scutellaris</i>
SSR2	(TG) ₂₃	F: AGAAAGAAGAAGGGTTGCGT R: GTTCGGGAGAGACTAAAT	<i>M. capixaba</i>
SSR3	(TG) ₁₃	F: TCGTAAGCGGACATGATCCC R: TCACCGATGTTCTCCACCAC	<i>M. scutellaris</i>
SSR4	(TC) ₁₆	F: CAATCCTCTTCCCACCCTCT R: TTGACGGAGCGAGACGAACG	<i>M. scutellaris</i>
SSR5	(AC) ₈	F: TAGTCTCGCTCCAGTAAGCG R: TTGGACTAGCGAAGAGGAAC	<i>M. scutellaris</i>
SSR6	(GA) ₂₁ (GT) ₉	F: TGACACCAGTAGAATGAGAG R: TTAGGAGAAACAGCAAGGC	<i>M. capixaba</i>
SSR7	(GA) ₁₅ (GA) ₉	F: CCGAACGAGGACAAAGAGG R: ACTCCTCTCGTCTTTCTTCC	<i>M. capixaba</i>
SSR8	(GT) ₁₁ (GA) ₁₄ (GT) ₇	F: TGCCTCCATCGAGGCAGAGG R: AGGCGAACGGAGAGAGTGGC	<i>M. capixaba</i>
SSR9	(CT) ₁₁ (GT) ₁₁	F: TGTTCTCAGCCGATCCCGC R: GATTCCCGCTCCCTTGACC	<i>M. capixaba</i>
SSR10	(CA) ₂₁	F: TGCAGCGAACTTCCTTCAACG R: CAGGACGTGCCGTGGATAT	<i>M. capixaba</i>
SSR11	(TG) ₁₄	F: CGAAGACGAAGGGAAGACCG R: ACTGAACCGTAAGCCACTGG	<i>M. capixaba</i>
SSR12	(TG) ₈ (TG) ₉	F: TAGCCAACAGATGAACTCGT R: GTGCTAAGCGTTTCGTTTCC	<i>M. capixaba</i>
SSR13	(CA) ₂₀	F: GCGAATCAGGTAATCAACG R: CGAACACAACGATCATAACG	<i>M. capixaba</i>
SSR14	(CA) ₁₆ (TCG) ₁₀	F: GTCGCACTGTCGTCGTTGT R: CGTTTCTCTGTTTCGTCGCCG	<i>M. capixaba</i>
SSR15	(TC) ₁₁ (AC) ₁₅ (TC) ₅ (GA) ₇	F: GCGAATGGAGAACTGCGTG R: AAGGACGACTATTTCCAACG	<i>M. capixaba</i>
SSR16	(GT) ₁₂	F: ACTCTGGCGACTTTCCTTGAAC R: CTCGTTACAGCATAATGCCCA	<i>M. capixaba</i>
SSR17	(CT) ₁₅	F: TGACCTATTCCTTTCTGTGC R: GGGATTCAGAAGGAGATACG	<i>M. scutellaris</i>

As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 10 μ L, sendo cada reação composta por 50ng/ μ L de DNA, 1X de tampão de reação, 2mM de MgCl₂, 200 μ M da mistura de dNTPs, 0,5 μ M de cada *primer* e 1u de Platinum® Taq Polimerase (Invitrogen™). As reações de amplificação foram incubadas em um termociclador a 94°C por 5 min para a completa desnaturação inicial das fitas de DNA, seguidos de 35 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por um passo de desnaturação a 94°C por 45s, um passo de recozimento dos *primers* de acordo com a temperatura específica de recozimento de cada *primer* por 1min e 30s e um passo de extensão a 72°C por 1min e 30s, e passo final de extensão a 72°C por 5min. Os produtos foram visualizados em gel de agarose a 2% e o tamanho dos fragmentos foram verificados de acordo com o marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™), sendo visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

Entre as amplificações positivas foram selecionados 13 pares de *primers* microssatélites (SSR1 à SSR13) considerando os critérios: eficácia na amplificação e diferença de tamanho de pares de bases (requisito para a utilização dos sistemas multiplex durante a genotipagem). Os marcadores microssatélites selecionados foram sintetizados com marcação fluorescente do tipo HEX, na cor verde, e do tipo 6-FAM, na cor azul. Somente a sequência *forward* de cada *primer* foi marcada com fluorescência.

Posteriormente, os *primers* foram testados quanto ao grau de polimorfismo e apenas 7 pares de *primers* apresentaram resultados satisfatórios (SSR1 à SSR7). Entretanto, durante a execução das PCRs, 2 dos 7 pares de *primers* selecionados apresentaram problemas na amplificação, sendo que algumas amostras, tanto de *M. capixaba* quanto de *M. scutellaris*, amplificaram e outras não, e o problema persistia mesmo sob diferentes condições de PCR. Assim, estes dois *primers* foram excluídos das análises e apenas 5 pares *primers* microssatélites foram utilizados (Tabela 3).

Dos 5 *primers* utilizados, 4 foram desenhados para a espécie *M. scutellaris* (SRR1, SRR3, SSR4, SSR5) e 1 para a espécie *M. capixaba* (SSR2) (Tabela 3). O emprego de *primers* heterólogos foi possível porque as espécies são filogeneticamente próximas (RESENDE 2012), o que permite o sucesso na transferência de marcadores devido a conservação das regiões flanqueadoras. A transferências de *primers* em espécies filogeneticamente próximas já foi utilizada com sucesso em outros trabalhos (CARVALHO-ZILSE e KERR, 2006; VIANA et al., 2011; WERNECK, 2008).

Para este estudo, os marcadores microssatélites foram sintetizados com marcação fluorescente com diferentes fluorófos. Os *primers* SRR1, SSR2 e SRR5 foram sintetizados com

marcação fluorescente do tipo HEX, na cor verde, e os *primers* SSR3 e SSR4 com marcação fluorescente do tipo 6-FAM, na cor azul (Tabela 3).

Tabela 3 - Descrição dos locos microssatélites e sequência de *primers* utilizados para a análise da diversidade genética em *Melipona capixaba*.

Loco	Repetição	Sequência (5'-3')	T _A (°C)	MF	Espécie de Origem do Primer
SSR1	(GT) ₈	F: CACCGAAAGATACAAAGCCG R: GCGGGATTATTTTCATTACAGC	49	HEX	<i>M. scutellaris</i>
SSR2	(TG) ₂₃	F: AGAAAGAAGAAGGGTTGCGT R: GTTCGGGGAGACGACTAAAT	49	HEX	<i>M. capixaba</i>
SSR3	(TG) ₁₃	F: TCGTAAGCGGACATGATCCC R: TCACCGATGTTCTCCACCAC	53	6-FAM	<i>M. scutellaris</i>
SSR4	(TC) ₁₆	F: CAATCCTCTTCCCACCCTCT R: TTGACGGAGCGAGACGAACG	55	6-FAM	<i>M. scutellaris</i>
SSR5	(AC) ₈	F: TAGTCTCGCTCCAGTAAGCG R: TGGGACTAGCGAAGAGGAAC	53	HEX	<i>M. scutellaris</i>

TA: Temperatura de recozimento do *primer* (°C); MF: marcador de fluorescência do *primer*.

Após a seleção dos *primers*, as amostras foram amplificadas via PCR. As reações de PCR foram realizadas sob as mesmas condições descritas anteriormente. Os produtos de PCR foram genotipados no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) por meio do sequenciador automático ABI3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies).

Tabela 4 - Composição dos sistemas multiplex de *primers*, *amplicom* (pb) e cor do fluorocromo utilizado em cada marcador.

Multiplex 1	<i>Amplicon</i> (pb)	Cor do Fluoróforo
SRR1	204-208	verde
SRR2	276-300	verde
SRR3	324-332	azul
Multiplex 2	<i>Amplicon</i> (pb)	Cor do Fluoróforo
SRR4	189-197	azul
SRR5	265-273	verde

Em uma alíquota de 1µL de produto do PCR, foram adicionados 0,5µL de GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard e 8,5µL de Formamida HI-DI Applied biosystems. As reações foram

submetidas a desnaturação a 95°C por 3min em termociclador e, posteriormente, foram submetidas ao choque térmico no freezer. Após, as amostras foram aplicadas no sequenciador automático, conforme orientações do fabricante.

3.4 Análises dos Dados

Os dados gerados pelo sequenciador automático foram analisados com o auxílio do programa Geneious R7 (biomatters <http://www.geneious.com>). Este programa gera uma imagem de cada pico, que representa um alelo para cada indivíduo. Foi elaborada no Excel uma tabela dos genótipos das amostras, a qual foi utilizada, nas configurações adequadas, como arquivo de entrada para as análises estatísticas.

O programa Micro-Checker v.2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004) foi utilizado com a finalidade de examinar a existência de erros na determinação dos genótipos durante a análise dos dados. O Micro-Checker, realiza teste de verificação da presença de alelos nulos “*Null alleles*”, erros de anotação devido a “*Stuttering*” e redução de amplificação de alelos maiores “*Large allele dropout*” com o propósito de auxiliar na detecção de erros durante a interpretação dos dados. O programa realiza simulações Monte Carlo para comparar as frequências de homozigotos esperados e observados no conjunto de dados. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg é utilizado para calcular as frequências de alelos esperadas e estimar a detecção de alelos nulos. Alelos nulos são considerados como falhas na amplificação durante o PCR, são resultantes da não amplificação de alguns alelos devido a substituições, inserções ou deleções no sítio de anelamento do *primer*. *Stuttering* são ruídos nos picos de genotipagem, podem resultar em erros de anotações e *Large allele dropout* resulta da não amplificação de alelos maiores tão eficientemente quanto alelos menores. Foram realizadas 10.000 simulações da cadeia de Markov, com intervalo de confiança de 99%, para cada loco em cada população (Nativa e Meliponários).

As estimativas de diversidade genética foram calculadas com o auxílio do programa GenAlex versão 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). Foram calculados os seguintes estimadores de diversidade genética: número de alelos (N_a), número efetivo de alelos (N_e), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), índice de fixação (F), número de alelos privados (N_{AP}), frequências alélicas. Além disso, foram estimadas as distâncias genéticas de Nei (Nei, 1972) e os índices de fixação (F_{ST}) entre os pares de população.

A avaliação da existência de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizada de duas formas: para cada loco por população e global por população. Os testes de Equilíbrio de Hardy-

Weinberg foram realizados através do programa GenePop (versão online: <http://genepop.curtin.edu.au>). Neste mesmo programa também foi realizado o teste de desequilíbrio de ligação para todos os pares de loci por população. Os níveis de significância para os testes de Equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação foram de 5%.

A distribuição da variação entre e dentro das populações foi estimada pela Análise de Variância Molecular (AMOVA), realizada no programa Arlequin versão 3.5.2.2 (Excoffier; LISCHER, 2010). Para o cálculo da AMOVA foram considerados “*Loco by loco*”, com 10.000 permutações.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos Loco Microsatélites

As análises realizadas no Micro-Checker não identificaram nenhuma evidência de alelos nulos, nenhuma evidência de erros devido a *Stuttering* e nenhuma evidência de *Large allele dropout*, quando consideradas cada população. Não foi observado desequilíbrio de ligação significativo entre os pares de locos ($P > 0,05$).

No total, a genotipagem dos 121 indivíduos de *M. capixaba*, detectou 30 alelos. O número de alelos por loco (N_a) variou de 3 a 12, com uma média de 6 alelos por loco (Tabela 5). O maior número de alelos foi verificado para o loco SSR2 (12 alelos) e o SSR1 apresentou o menor número de alelos (3 alelos). O *primer* SSR2 é específico para a espécie *M. capixaba*, o que pode explicar o maior número de alelos observados para este loco. Apesar dos *primers* SSR 1, 3, 4 e 5 serem *primers* heterólogos, desenvolvidos para a espécie *M. scutellaris*, se mostraram eficientes para estudos genéticos na espécie *M. capixaba*. A transferência de marcadores é melhor entre grupos filogeneticamente próximos devido a conservação das regiões flanqueadoras no DNA das espécies (CARVALHO-ZILSE; KERR, 2006).

Nogueira e colaboradores (2014), utilizaram quatro marcadores microsatélites para analisar populações de *M. capixaba* de diferentes localidades. Os autores amostraram de 2 a 10 alelos por loco, com uma média de 4,75 alelos por loco. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados neste trabalho, a pequena diferença observada pode ter sido devido ao número maior de amostras e marcadores utilizados no presente trabalho.

Tabela 5 - Características dos 5 loco microsatélites analisados para *M. capixaba*, considerando os 121 indivíduos de *M. capixaba* amostrados.

Loco	Repetição	Número de indivíduos	Número de alelos	Tamanho Observado (pb)
SSR1	(GT) ₈	121	3	204 – 208
SSR2	(TG) ₂₃	121	12	276 – 300
SSR3	(TG) ₁₃	121	5	324 - 332
SSR4	(TC) ₁₆	121	5	189 - 197
SSR5	(AC) ₈	121	5	265 - 273
Média			6	

4.2 Diversidade Genética das Colônias de *Melipona capixaba* Amostradas na Natureza e em Meliponários

Os parâmetros de diversidade genética analisados para a caracterização da variabilidade genética das populações de *M. capixaba* amostrada na natureza (população nativa) e em meliponários, com base nos cinco marcadores microssatélites analisados, foram demonstrados na Tabela 6. A matriz de genótipos e os parâmetros de diversidade genética para cada loco por população (número de alelos, número de alelos efetivos, heterozigotidade observada, heterozigotidade esperada, índice de Fixação e teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg) foram sumarizados nos Anexo I, e Anexo II, respectivamente.

A população nativa apresentou um número total de 29 alelos e uma média de 5,8 alelos por loco (Tabela 6). Os meliponários, quando foram analisados considerando todas populações manejadas como uma única população, apresentaram o mesmo número total de alelos ($Nt= 29$) e a mesma média de número de alelos por loco ($Na= 5,8$) em comparação à população nativa. Entretanto, o número total de alelos e o número médio de alelos por loco em cada meliponário variou e foram menores que os da população nativa (Tabela 6).

Um menor número de alelos era esperado para as populações manejadas, pois a criação de abelhas tende a reduzir a variabilidade genética, o que se deve principalmente à redução do tamanho efetivo da população e as consequências do efeito fundador (WRIGHT et al., 2005; ZEDER et al., 2006). Baixa diversidade genética foi relatada para populações de *Apis mellifera* presentes em apiários (DELANEY et al., 2010; JAFFÉ et al., 2010; MIXNER et al., 2010).

Tabela 6 - Médias das estimativas de diversidade genética para as populações de *M. capixaba* amostradas na natureza (nativa) e em meliponários.

Populações	N	Nt	N_{AP}	N_a	N_e	H_o	H_e	F	EHW
Nativa	30	29	1	5,800±1,356	3,610±0,777	0,853±0,073	0,678±0,054	-0,280±0,135	AS
Meliponários	91	29	1	5,800±1,356	3,668±0,603	0,789±0,079	0,695±0,051	-0,164±0,145	AS
Meliponário 1	14	22	0	4,400±0,510	3,319±0,394	0,814±0,062	0,679±0,044	-0,230±0,144	0,0119*
Meliponário 2	13	25	0	5,000±0,837	3,470±0,462	0,831±0,115	0,692±0,038	-0,219±0,190	0,0019*
Meliponário 3	23	24	1	4,800±1,114	3,380±0,561	0,800±0,074	0,674±0,048	-0,208±0,133	0,0015*
Meliponário 4	13	23	0	4,600±0,980	3,186±0,643	0,631±0,138	0,634±0,069	-0,025±0,216	AS
Meliponário 5	15	23	0	4,600±0,812	3,355±0,401	0,880±0,061	0,679±0,049	-0,323±0,130	0,0069*
Meliponário 6	13	19	0	3,800±0,663	2,856±0,338	0,754±0,078	0,627±0,048	-0,240±0,169	0,0528

N: Número amostral; Nt : Número total de alelos; N_{AP} : número de alelos privados; N_a : Número médio de alelos por loco; N_e : Número médio de alelos efetivos por loco; H_o : Heterozigotidade média observada; H_e : Heterozigotidade média esperada; F : Coeficiente de endogamia; EHW : Valor P obtidos no teste exato de Equilíbrio de Hardy-Weinberg global por população. AS= altamente significativo, * $P<0,05$.

Comparando a população nativa com a população presente em cada meliponário, foi possível observar que a população do meliponário 6 (Mcap86) apresentou o menor número total de alelos ($N_t= 19$) e o menor número médio de alelos por loco ($N_a= 3,8$) em relação a população nativa ($N_t= 29$ e $N_a= 5,8$). O meliponário 2 (Mcap80) apresentou o maior número total de alelos ($N_t= 25$) e maior número médio de alelos por loco ($N_a= 5,0$) em comparação a população nativa (Tabela 6).

O número de alelos não pode ser utilizado como o único índice de diversidade. As espécies podem apresentar um alto número de alelos, entretanto os alelos podem ter uma distribuição desigual na população. Se a população apresentar alelos raros ou com baixa frequência, a probabilidade destes alelos serem perdidos por deriva genética é maior em comparação a uma população com alelos distribuídos uniformemente (RIDLEY et al., 2006). Desta forma, o número médio de alelos efetivos (N_e) também foi utilizado como índice de diversidade genética. Kimura e Crow (1964) propôs inicialmente que este índice mede a probabilidade de dois alelos retirados aleatoriamente da população serem idênticos por descendência. Neste trabalho foi utilizado este conceito com algumas modificações (PEAKALL; SMOUSE, 2012). Neste caso, quanto maior o número de alelos raros, menor será a probabilidade de amostrar dois alelos relacionados, portanto o valor do número de alelos efetivos será baixo, indicando a distribuição desigual dos alelos na população.

Apesar das populações de *M. capixaba* terem apresentado um moderado número médio de alelos por loco (5,8 a 3,8), todos os meliponários e a população nativa apresentaram o número médio de alelos efetivos menores que o número médio de alelos por loco (Tabela 6), o que indica a presença de alelos raros ($P \leq 0,05$) ou com baixa frequência ($0,20 \geq P \geq 0,05$) (KIMURA; CROW, 1964). As frequências alélicas foram bem variadas entre os loco e populações. É possível observar que todas as populações apresentaram alelos raros ou com baixa frequência (Tabela 7 e Figura 2).

O número médio de alelos efetivos (N_e) da população presente nos meliponários (3,668), quando foram analisados considerando todas populações manejadas como uma única população, foi maior que o N_e da população nativa (3,610) (Tabela 6), ou seja, alguns alelos da população manejada possuem maior frequência alélica em relação a população nativa (Tabela 7). Desta forma, as populações manejadas podem atuar como fonte de indivíduos para formação de populações de conservação com a finalidade de aumentar a frequência dos alelos raros ou com baixa frequência, garantindo a manutenção da diversidade genética da espécie e evitando a perda de alelos devido aos efeitos da deriva genética.

Os valores de heterozigozidade média observada (H_o) foram altos e maiores que o valor de heterozigozidade média esperada (H_e) para a população nativa e para as populações dos meliponários 1, 2, 3, 5 e 6, o que indica um excesso de heterozigotos. Apenas a população do meliponário 4 apresentou valores de H_o (0,631) e H_e (0,634) próximos (Tabela 6). Apesar de ter sido observada uma alta heterozigozidade nas populações, os planos de manejo e conservação devem levar em consideração a alta amostragem de alelos raros ou com baixa frequência, o que pode indicar a perda de alelos pela ação da deriva genética.

Os coeficientes de endogamia (F) foram negativos em todas as populações (Tabela 6). Os valores negativos dos índices de fixação para as populações revelam que há mais indivíduos heterozigotos do que o esperado (HEDRICK, 2011), o que pode ser confirmado pelos valores de H_o e H_e , sendo que a maior diferença foi observada para a população do meliponário 5 ($F = -0,323$). Todas as populações, exceto o meliponário 6, apresentaram desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 6). Não foi observado desequilíbrio de ligação significativo entre pares de locos em nenhuma população ($P > 0,05$).

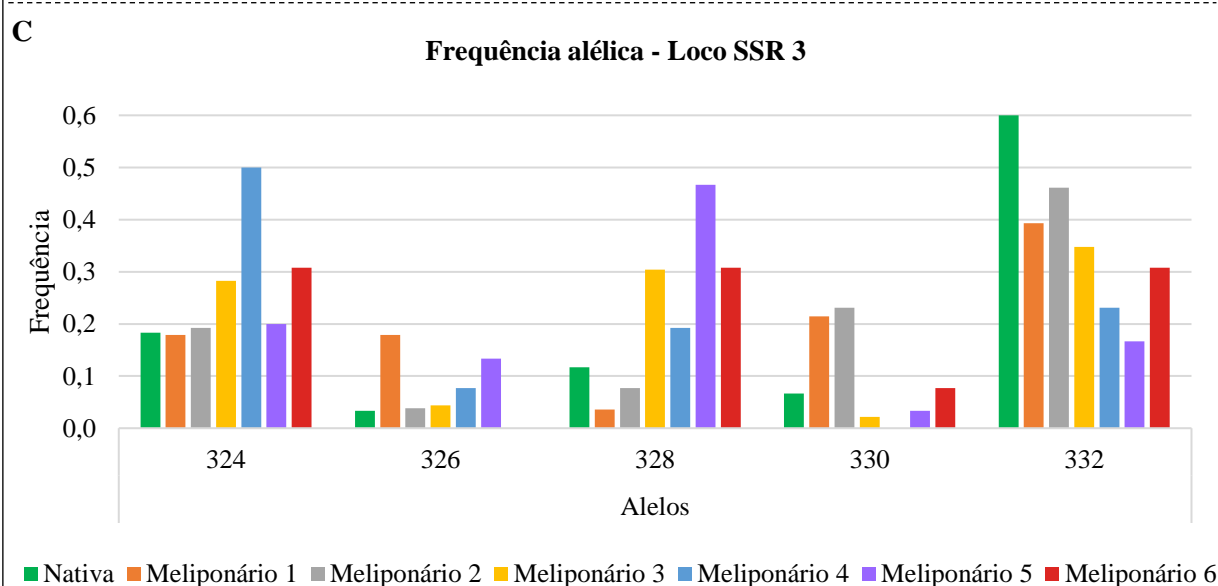
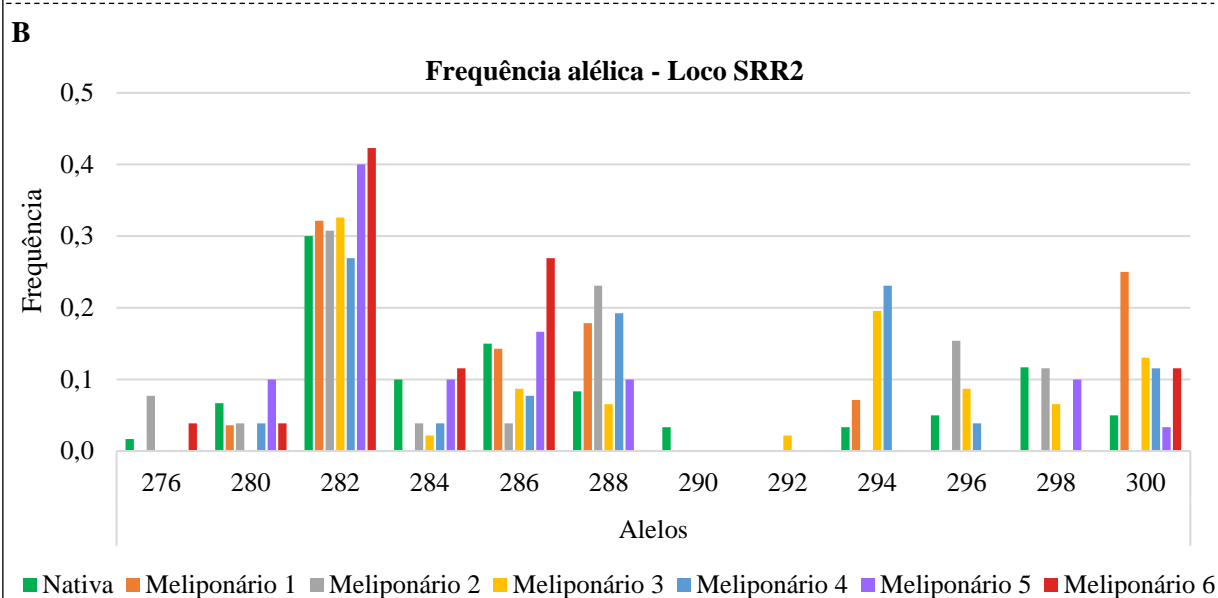
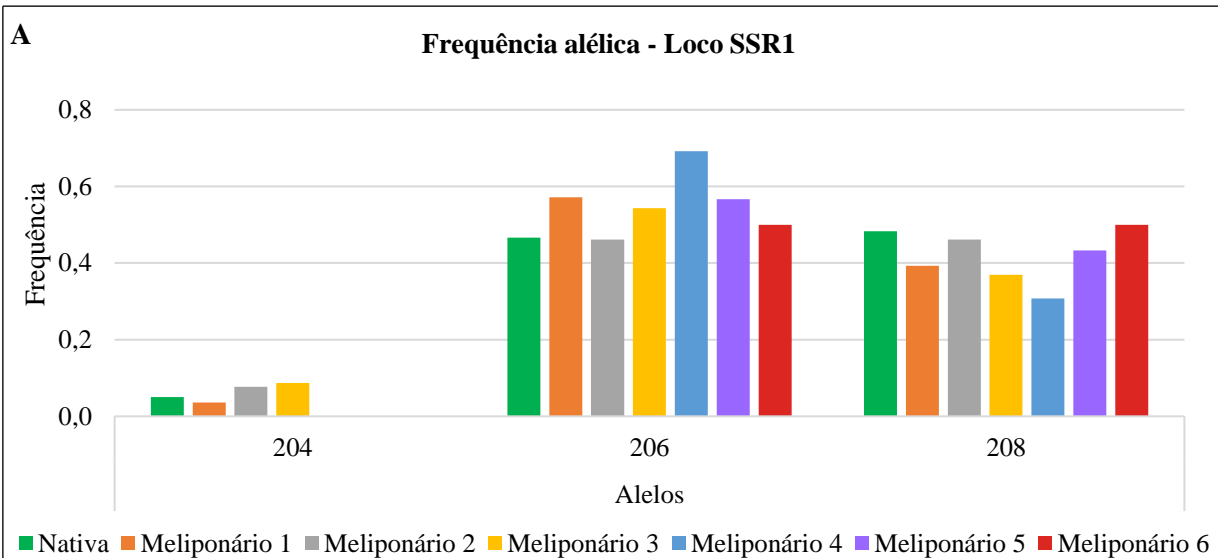
O excesso de heterozigotos pode ser um efeito da degradação do habitat natural da *M. capixaba*, o bioma Mata Atlântica, e da drástica redução populacional. É comum populações que passaram por um processo recente de gargalo genético (*bottleneck*) apresentarem um excesso temporário de heterozigozidade ($H_o > H_e$). Segundo Luikart e Cornuet (1998), as populações que sofreram deriva recentemente apresentarão um excesso de heterozigozidade na maioria dos locos. Isto ocorre porque após a redução do tamanho efetivo da população, tanto o número de alelos quanto suas heterozigozidades sofrem redução, mas a diversidade de alelos diminui mais rapidamente porque os alelos raros são rapidamente perdidos, já heterozigozidade é calculada com base nas frequências alélicas (NEI, 1987). O excesso de heterozigotos pode persistir por várias gerações até que um novo equilíbrio seja estabelecido (CORNUET; LUIKART, 1996; LUIKART et al., 1996). De fato, o número de alelos efetivos e as frequências alélicas evidenciaram a ocorrência de uma alta porcentagem de alelos raros ou com baixa frequência, o que pode indicar a ocorrência de deriva genética nas populações de *M. capixaba* e explicar o excesso de heterozigotos.

O “gargalo populacional”, redução do tamanho da população, pode resultar na perda de diversidade genética (NEI et al., 1975; TAJIMA, 1996), o que pode comprometer a capacidade da espécie de se adaptar às mudanças ambientais (REUSCH; WOOD, 2007; FRANKHAM et al. 2008) e aumentar a sua probabilidade de extinção devido à fatores demográficos e genéticos (CAUGHLEY, 1994; KELLER; WALLER, 2002).

Tabela 7 - Alelos e frequência alélica para cada loco por população.

LOCO	ALELO	NATIVA	M1	M2	M3	M4	M5	M6
SSR1	204	0,050	0,036	0,077	0,087	0,000	0,000	0,000
	206	0,467	0,571	0,462	0,543	0,692	0,567	0,500
	208	0,483	0,393	0,462	0,370	0,308	0,433	0,500
SSR2	276	0,017	0,000	0,077	0,000	0,000	0,000	0,038
	280	0,067	0,036	0,038	0,000	0,038	0,100	0,038
	282	0,300	0,321	0,308	0,326	0,269	0,400	0,423
	284	0,100	0,000	0,038	0,022	0,038	0,100	0,115
	286	0,150	0,143	0,038	0,087	0,077	0,167	0,269
	288	0,083	0,179	0,231	0,065	0,192	0,100	0,000
	290	0,033*	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	292	0,000	0,000	0,000	0,022*	0,000	0,000	0,000
	294	0,033	0,071	0,000	0,196	0,231	0,000	0,000
	296	0,050	0,000	0,154	0,087	0,038	0,000	0,000
	298	0,117	0,000	0,115	0,065	0,000	0,100	0,000
300	0,050	0,250	0,000	0,130	0,115	0,033	0,115	
SSR3	324	0,183	0,179	0,192	0,283	0,500	0,200	0,308
	326	0,033	0,179	0,038	0,043	0,077	0,133	0,000
	328	0,117	0,036	0,077	0,304	0,192	0,467	0,308
	330	0,067	0,214	0,231	0,022	0,000	0,033	0,077
	332	0,600	0,393	0,462	0,348	0,231	0,167	0,308
SSR4	189	0,050	0,000	0,000	0,000	0,038	0,000	0,000
	191	0,167	0,036	0,038	0,130	0,346	0,167	0,231
	193	0,300	0,321	0,385	0,326	0,308	0,267	0,462
	195	0,167	0,250	0,231	0,196	0,192	0,267	0,154
	197	0,317	0,393	0,346	0,348	0,115	0,300	0,154
SSR5	265	0,133	0,214	0,192	0,109	0,269	0,233	0,308
	267	0,317	0,179	0,192	0,348	0,077	0,233	0,077
	269	0,467	0,464	0,423	0,543	0,615	0,433	0,615
	271	0,033	0,143	0,154	0,000	0,038	0,067	0,000
	273	0,050	0,000	0,038	0,000	0,000	0,033	0,000

Nativa: população amostrada na natureza; M1: Meliponário 1; M2: Meliponário 2; M3: Meliponário 3; M4: Meliponário 4; M5: Meliponário 5; M6: Meliponário 6. As frequências alélicas em negrito apresentam valores menores que 0,20. *Alelos privados.



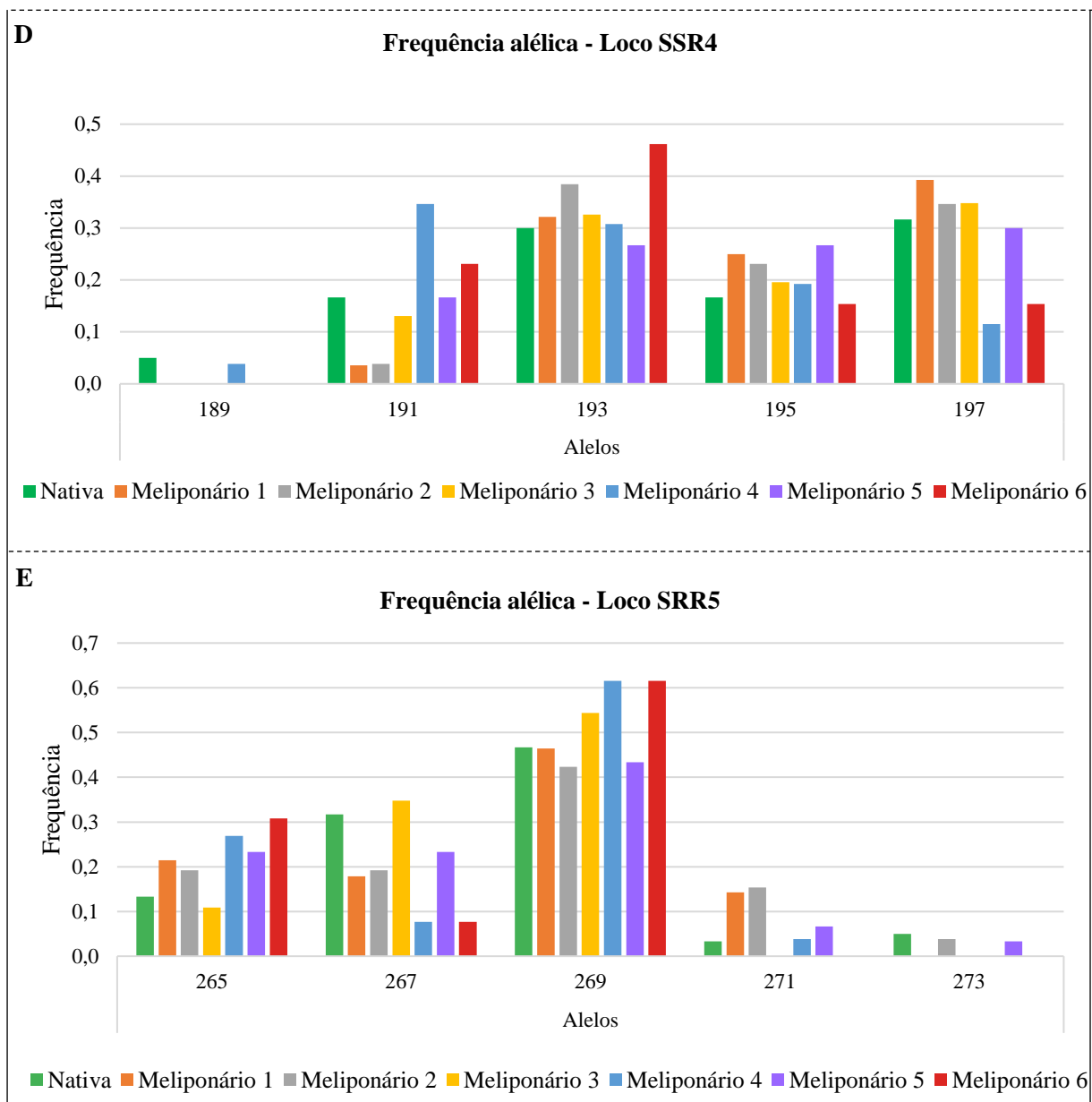


Figura 2 – Frequências alélicas de cada loco por população. A) Alelos e frequências alélicas do loco SSR1 para cada população; B) Alelos e frequências alélicas do loco SSR2 para cada população; C) Alelos e frequências alélicas do loco SSR3 para cada população; C) Alelos e frequências alélicas do loco SSR3 para cada população; D) Alelos e frequências alélicas do loco SSR4 para cada população; E) Alelos e frequências alélicas do loco SSR5 para cada população.

A distância genética de Nei (1972), calculada para inferir a divergência genética entre os pares de populações, variou de 0,056 (nativa e meliponário 2) à 0,203 (meliponário 2 e meliponário 4) (Tabela 8). De um modo geral, quanto mais distantes estão as populações, mais diferentes elas são em relação às suas frequências alélicas (FUTUYMA, 1992). Esses valores demonstram baixa distância genética entre as populações, o que indica que suas frequências alélicas são similares. Nogueira e colaboradores (2014), também encontraram baixos valores

de distância genética entre populações de *M. capixaba* considerando marcadores microsatélites (0,003 à 0,118) e ISRR (0,168 à 0,199), o que sugeriu que as populações compartilham um mesmo “*pool*” genético, ou seja, exibem uma alta similaridade genética.

O meliponário 4 foi o que apresentou maior distância genética em relação a população nativa (0,185) e o meliponário 2 foi o que apresentou menor distância genética em relação a população nativa (0,056). Entre os meliponários, o meliponário 2 e meliponário 4 foram os que apresentaram maior distância genética entre si (0,203) (Tabela 8).

Tabela 8 - Distância genética de Nei (1972) para os pares de populações de *M. capixaba*.

	Nativa	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6
Nativa	0,000						
M1	0,086	0,000					
M 2	0,056	0,059	0,000				
M 3	0,065	0,092	0,105	0,000			
M4	0,185	0,159	0,203	0,104	0,000		
M5	0,128	0,135	0,147	0,074	0,139	0,000	
M 6	0,112	0,136	0,146	0,097	0,098	0,079	0,000

Nativa: população de *M. capixaba* amostrada na natureza; M1: Meliponário 1; M2: Meliponário 2; M3: Meliponário 3; M4: Meliponário 4, M5: Meliponário 5; e M6: Meliponário 6.

A análise de diferenciação entre os pares de populações (F_{ST}) mostrou ausência de estruturação ou baixa diferenciação genética entre as populações (Tabela 9), corroborando com os valores encontrados para a distância genética de Nei. Os valores de F_{ST} para os pares de populações variou de 0,012 (nativa e meliponário 2, meliponário 2 e meliponário 1) à 0,045 (meliponário 2 e meliponário 4). Wright (1978) considera que amplitude de F_{ST} entre 0,00 e 0,05 pode ser considerada como indicativo de baixa diferenciação genética.

Tabela 9 - Valor de F_{ST} para os pares de populações de *M. capixaba*.

	Nativa	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6
Nativa	0,000						
M1	0,019	0,000					
M 2	0,012	0,012	0,000				
M 3	0,015	0,020	0,022	0,000			
M4	0,044	0,035	0,045	0,026	0,000		
M5	0,027	0,026	0,029	0,016	0,032	0,000	
M 6	0,028	0,031	0,033	0,025	0,026	0,020	0,000

Nativa: população de *M. capixaba* amostrada na natureza; M1: Meliponário 1; M2: Meliponário 2; M3: Meliponário 3; M4: Meliponário 4, M5: Meliponário 5; e M6: Meliponário 6.

Os resultados referentes à análise de estrutura genética de populações, realizados a partir da análise de variância molecular (AMOVA) estão representados na Tabela 10. A AMOVA revelou que as populações possuem baixa estruturação genética. Foi detectado baixo grau de diferenciação entre as populações ($F_{ST}= 0,01972$), sendo que a variação genética entre as populações é de apenas 1,97%. A maior porcentagem da variação genética (98,03 %) se encontra dentro das populações consideradas, indicando que a perda de qualquer população representa uma grande perda de diversidade genética.

Tabela 10 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as populações de *Melipona capixaba* amostradas na natureza e em meliponários.

Fontes de Variação	Soma dos Quadrados	Componentes da Variância	Varição Percentual (%)
Entre populações	17,362	0,03463	1,97214
Dentro das populações	404,568	1,72157	98,02786
Total	421,93	1,7562	

$F_{ST}=0,01972$

O F_{ST} está correlacionado ao fluxo gênico entre as populações (JARNES; LAGODA, 1996). Uma alta taxa de fluxo gênico tende a homogeneizar a variação genética entre as populações, conseqüentemente a diferenciação genética interpopulacional (F_{ST}) será baixa.

Segundo Kerr 1987, a enxameagem em meliponários ocorre a curtas distâncias, uma vez que as abelhas transportam cera e alimento para o novo local de nidificação. Machos de diferentes colônias formam agrupamentos próximo às novas colônias ou colônias órfãs na tentativa de copular uma rainha virgem (KEER; CARVALHO; NASCIMENTO; 1996). Este aglomerado de machos faz com que as rainhas virgens, na maioria das vezes, sejam fecundadas assim que deixam as colônias para o voo nupcial. Assim, o fluxo gênico depende do raio de voo dos machos, que partem em busca de rainhas virgens, e do raio de ocupação de ocupação de um novo ninho. Os machos da espécie *M. scutellaris* podem se deslocar por até 1 Km de distância (CARVALHO-ZILSE; KERR, 2004). Por serem espécies filogeneticamente próximas, pode-se inferir que os machos de *M. capixaba* possam se deslocar até essa mesma distância e atuar como mediadores de fluxo gênico.

Todos os meliponários estão localizados a mais de 5 Km de distância um do outro (Figura 1), portanto não é esperado a ocorrência de fluxo gênico entre eles. A baixa estruturação genética observada pode ser explicada pela ocorrência de fluxo gênico intermediada por populações nativas de *M. capixaba* distribuídas ao longo da distribuição dos meliponários, ou os meliponários foram formados a partir de colônias naturais não estruturadas. No primeiro caso, as matas do entorno dos meliponários podem abrigar ninhos naturais. Machos oriundos

dos ninhos naturais podem migrar até os meliponários e fecundar rainhas virgens, promovendo o fluxo gênico e a introdução de novos alelos nos meliponários, diminuindo as diferenças genéticas entre a população nativa e as populações manejadas. No segundo caso, mesmo que não esteja ocorrendo fluxo gênico entre os meliponários, ainda não houve tempo evolutivo para ocorrer diferenciação genética e estruturação.

Nogueira e colaboradores (2014) analisando populações de *M. capixaba* de diferentes localidades, observaram que a maior taxa de variação (95%) estava dentro dos municípios e apenas 5% da variação estava entre os municípios, o que indicou um baixo grau de subdivisão das populações de *M. capixaba* amostradas. Os autores propuseram que a fragmentação do habitat natural da espécie provocou a fragmentação da sua área de distribuição, entretanto as populações ainda apresentam fluxo gênico o suficiente para impedir que ocorra a diferenciação genética entre os grupos. Ainda segundo os autores, a baixa diferenciação genética entre as populações analisadas e a restrita distribuição da espécie, permitem inferir a hipótese de que todas as colônias amostradas sejam remanescentes de uma mesma população e a cobertura vegetal observada se mostrou insuficiente para promover uma grande diferenciação entre as populações por isolamento geográfico.

Resende (2012) analisando dados de sequências do gene CO1 mitocondrial, estimou $F_{ST} = 0.73$, o que indica diferenciação genética muito grande entre as populações. A diferença encontrada entre os valores de F_{ST} para dados de gene mitocondrial e os loco microssatélites nucleares pode ser explicada por duas razões. Resende (2012) analisou um número menor de colônias, e pode ter deixado de analisar haplótipos intermediários por falta de amostragem, aumentando artificialmente a diferenciação entre as populações. Por outro lado, considerando o modo de reprodução da espécie e o comportamento de fundação de novos ninhos, é possível que a estruturação de fato ocorra entre as matrilineagens, mas que o mesmo não ocorra para os genes nucleares devido a maior dispersão dos machos. Resende (2012) ao contrário, verificou que a maior parte da variação considerando genes mitocondriais verifica-se entre grupos de populações (no caso, os grupos hierárquicos consideravam apenas distâncias geográficas, não fazendo distinção entre colônias naturais e colônias manejadas). Tal diferença mais uma vez pode ser explicada pela diferente distribuição de alelos mitocôndrias entre as matrilineagens e os alelos nucleares também dispersos por machos.

Santiago (2013), ao comparar a diversidade genética de colônias de *Tetragonisca angustula* amostradas na natureza e em meliponários, observou que havia baixa diferenciação genética entre as populações e também sugeriu a ocorrência de fluxo gênico através de machos oriundos de matas ao entorno dos meliponários. Em algumas espécies de abelhas, os

aglomerados constituídos por machos de diferentes ninhos também têm sido apontados como o principal mecanismo para evitar endocruzamentos (WOYKE, 1973; PAGE, 1980).

4.3 Influência do Manejo sobre a Diversidade Genética das Colônias Manejadas

Alguns fatores devem ser levados em consideração para o entendimento do padrão de diversidade genética observado para as populações presentes nos meliponários: a localização do meliponário; a fundação do meliponários; e as técnicas de manejo realizadas. Desta forma, é necessário analisar cada meliponário de forma particular para compreender os padrões de diversidade observados. Raad (2017) analisou 5 dos 6 meliponários analisados neste trabalho por meio de sequências nucleares (ITSI) e mitocondriais (CO1) e também observou que a diversidade genética das colônias manejadas está relacionada com as técnicas de criação adotada por cada meliponicultor.

Em relação a localização dos meliponários, as populações manejadas instaladas próximas à matas nativas podem ser beneficiadas pelo fluxo gênico mediado pelos machos oriundos das colônias naturais presentes nas matas. Esse fluxo gênico pode aumentar a diversidade genética das populações manejadas, permitir a introdução de novos alelos, impedir a perda de alelos devido aos efeitos deriva genética e reduzir os efeitos da endogamia. Sendo assim, a constituição genética da população pode ser influenciada pela matriz na qual ela está inserida.

Em relação à fundação do meliponário e as técnicas de manejo, as populações que são fundadas a partir de várias colônias e que são constantemente multiplicadas podem apresentar maior diversidade genética. O fluxo gênico artificial, intermediado por meio da aquisição ou captura de colônias de diferentes locais do de origem, pode contribuir para o aumento da diversidade genética dos meliponários. Caso o transporte ocorra entre regiões com estruturas genéticas diferentes pode contribuir para aumentar artificialmente a diversidade genética da população.

O meliponário 2 (Mcap80) foi a população manejada que apresentou os padrões de diversidade mais próximos do observado para a população nativa (Tabela 6), sendo que este foi o meliponário que apresentou a menor distância genética (0,056) (Tabela 8) e o menor grau de diferenciação ($F_{ST}= 0,012$) (Tabela 9) em relação a população nativa. Entre às populações manejadas, o meliponário 2 apresentou o maior número total de alelos ($Nt= 25$), o maior número médio de alelos por loco ($Na= 5,0$) e o maior número médio de alelos efetivos por loco ($Ne= 3,470$) (Tabela 6). Raad (2017) ao analisar as amostras deste mesmo meliponário por meio de

sequências nucleares (ITSI) e mitocondriais (CO1), também detectou um padrão de diversidade similar ao observado para a população nativa. Estes padrões de diversidade genética podem ser explicados pelo fato deste meliponário ser um meliponário conservacionista instalado dentro do Parque Estadual Pedra Azul, em uma região com uma extensa área de mata preservada e com um grande número de colônias nativas (Raad, 2017). Assim, devido sua localização, pode ocorrer fluxo gênico entre o meliponário e as colônias nativas localizadas na mata ao seu entorno. Além disso, o meliponário foi fundado por colônias provenientes do resgate de fauna de diferentes meliponicultores, o que também pode colaborar para o aumento da diversidade genética desta população.

O meliponário 3 (Mcap61) também apresentou um padrão de diversidade genética próximo ao observado para a população nativa (Tabela 6), sendo que este meliponário também apresentou baixa distância genética (0,065) (Tabela 8) e diferenciação genética ($F_{ST}= 0,015$) (Tabela 9) em relação a população nativa. Raad (2017) também observou um padrão de diversidade genética similar ao da população nativa ao realizar análises destas colônias por meio de marcadores nucleares (ITSI) e mitocondriais (CO1). O meliponário 3 está localizado na área rural, em Alto Parajú, no distrito de Domingos Martins. Ao seu entorno há fragmento de mata que podem abrigar ninhos naturais e permitir o fluxo gênico entre as colônias nativas e as colônias do meliponário. O meliponicultor é um madeireiro e relatou que adquiri as suas colônias de diferentes lugares. Assim, apesar de não realizar a divisão das colônias, a mistura de colônias de diferentes localidades garante o aumento da diversidade genética da população.

O meliponário 1 (Mcap90), meliponário 4 (Mcap5) e meliponário 5 (Mcap64) apresentaram um padrão de diversidade genética intermediário em comparação à população nativa (Tabela 6).

O meliponário 1 (Mcap 90) está instalado em um sítio no município de Conceição do Castelo (ES). Em seu entorno há matas ciliares que podem atuar como corredores de fluxo gênico entre as colônias nativas e o meliponário. Além disso o meliponicultor relatou que suas colônias são adquiridas na própria região e que realiza a multiplicação constantes das colônias. Entre os meliponários 4 e 5, o meliponário 1 foi o que apresentou menor distância genética (Tabela 8) e o menor grau de diferenciação (F_{ST}) (Tabela 9) em relação a população nativa. O meliponário 4 (Mcap5) foi fundado a partir de várias colônias adquiridas da região, está localizado na mata de uma propriedade rural em Tijuco Preto, no distrito de Domingos Martins, e seu entorno há matas bem preservadas. O meliponário 5 (Mcap64) está instalado em uma propriedade rural em Garrafão, no município de Santa Maria do Jetibá. O meliponário foi

fundado por colônias adquiridas da própria região. Em seu entorno há matas ciliares, áreas de pastagem e cultivo.

O meliponário 6 (Mcap86) foi a população que apresentou o menor número total de alelos ($Nt= 19$), o menor número médio de alelos por loco ($Na= 3,8$) e o menor número médio de alelos efetivos por loco ($Ne= 3,470$) (Tabela 6). O padrão de diversidade genética observado pode ser explicado pelo fato deste meliponário está localizado em uma área urbana, dentro do município de Santa Maria do Jetibá. Ao entorno deste meliponário não há áreas de matas próximas, sendo que existe apenas resquícios de mata e grandes áreas de cultivo. Raad (2017) ao analisar as amostras deste meliponário por meio de marcadores nucleares (ITSI) e mitocondriais (CO1) também observou que este foi o meliponário que apresentou a menor diversidade genética em relação às demais populações. Como citado por Raad, a diversidade genética deste meliponário também pode ser influenciada pela técnica de manejo empregada. O meliponicultor relatou que realiza a multiplicação constante apenas de uma pequena parte das colônias, o que pode contribuir para a redução da diversidade genética.

4.4 Avaliação do Potencial Genético das Colônias Manejadas para a Conservação da espécie

Apesar dos obstáculos legais para a criação de *M. capixaba*, os meliponários podem ter um importante papel para a conservação da espécie. O mesmo foi constatado por Raad (2017). As análises de diversidade genética podem auxiliar na elaboração de planos de conservação e orientar o manejo a fim de manter a diversidade genética das colônias manejadas, garantido que elas tenham potencial genético para atuar como populações de conservação, auxiliando na manutenção da diversidade genética e preservação da espécie.

A distribuição dos alelos e as frequências alélicas foram bem variadas entre os locos e populações, sendo que cada população apresentou suas particularidades. A população nativa apresentou 29 alelos, sendo que 72,41% dos alelos (21 alelos) apresentaram frequências abaixo de 0,20 (Tabela 7). Todas as populações manejadas apresentaram alelos raros ou com baixas frequências (Tabela 7), entretanto as porcentagens destes alelos foram menores que na população nativa. Isto indica que alguns alelos podem ter frequências maiores nos meliponários do que na população nativa. Sendo assim, os meliponários podem atuar como estoques de diversidade genética e atuar como matrizes para a formação de populações de conservação. Nos meliponários as porcentagens de alelos com frequências abaixo de 0,20 foram: 50%

(meliponário 1), 64% (meliponário 2), 58,33% (meliponário 3), 56,52% (meliponário 4), 52,17% (meliponário 5), 47,37% (meliponário 6).

Considerando a distribuição dos alelos, as frequências alélicas, as distâncias genéticas e grau de diferenciação entre as populações é possível orientar o manejo de cada meliponário de forma a aumentar a diversidade genética e preservar o potencial genético destas populações. Desta forma, considerando estes critérios, foram descritas algumas orientações para o manejo de cada meliponário:

Meliponário 1 (Mcap90): apresentou um padrão razoável de diversidade genética, entretanto 50% dos alelos amostrados apresentam frequências alélicas abaixo de 0,20. Para garantir a manutenção da diversidade genética deste meliponário deve-se aumentar a frequência dos alelos raros ou com baixa frequência e incluir alelos que estão ausentes nesta população, em especial os alelos 276, 284, 290, 292, 296, 298, 189, 273. Podem ser realizadas trocas com os meliponários 4, 5 e 6, que são os meliponários que apresentaram a maior distância genética (Tabela 8) e maior diferenciação genética (Tabela 9) em relação a este meliponário. Entretanto, é importante verificar se estes meliponários apresentam os alelos que não foram amostrados no meliponário 1.

Meliponário 2 (Mcap80): apresentou os maiores índices de diversidade entre as populações manejadas. Entretanto 64% dos alelos amostrados apresentam frequências alélicas abaixo de 0,20, o que indica a perda de alelos devido à deriva genética. Para garantir a manutenção da diversidade genética e do potencial genético deste meliponário, deve-se aumentar a frequência destes alelos e incluir alelos que estão ausentes na população, em especial os alelos 290, 292, 294, 300, 189. Este meliponário também pode realizar trocas de colônias com os meliponários 4, 5 e 6, os quais apresentaram a maior distância genética (Tabela 8) e diferenciação genética (Tabela 9) em relação a este meliponário.

Meliponário 3 (Mcap61): apresentou um padrão de diversidade genética bem próximo ao apresentado para a população nativa. Este meliponário também apresentou uma alta taxa de alelos com frequência inferiores a 0,20 (58,33%). Para manter a diversidade genética deste meliponário é necessário aumentar a frequência alélica dos alelos raros ou com baixa frequência e inserir alelos que estão ausentes nesta população, especialmente os alelos 276, 280, 290, 189, 271, 273. Este meliponário foi o único que apresentou um alelo exclusivo, o alelo 292, com uma frequência de 0,22, indicando que é um alelo raro. Sendo assim, aumentar frequência deste alelo deve ser prioridade, principalmente por ele não ter sido amostrado na população nativa, o que pode indicar que ele está eliminado desta população. Este meliponário pode realizar trocas

como os meliponários 2, 4 e 6, os quais apresentaram a maior distância genética (Tabela 8) e diferenciação genética (Tabela 9) em relação a este meliponário.

Meliponário 4 (Mcap5): apresentou um padrão de diversidade intermediário em relação à população nativa. Uma alta porcentagem dos alelos amostrados apresentaram frequências abaixo de 0,20 (56,52%). Desta forma o manejo deve visar o aumento destes alelos e incluir alelos que estão ausentes na população, em particular os alelos 204, 276, 290, 292, 298, 330 e 273. Os meliponários 1, 2 e 5 apresentaram a maior distância genética (Tabela 8) e diferenciação genética (Tabela 9) em relação ao meliponário 4, desta forma estes meliponários podem fornecer colônias para realização de trocas com o meliponário 4. O alelo 189 foi amostrado apenas na população nativa e no meliponário 4 com baixíssimas frequências, desta forma o manejo deve priorizar o aumento da frequência deste alelo, para evitar a sua perda devido à deriva genética. O meliponário 4 foi a população que apresentou a maior distância genética (Tabela 8) e diferenciação genética (Tabela 9) em relação população nativa. Sendo assim, pode atuar como fonte de indivíduos para serem reintroduzidos na natureza, a fim de manter a diversidade das colônias naturais e evitar a perda de alelos.

Meliponário 5 (Mcap64): apresenta um padrão de diversidade genética intermediário comparado com a população nativa. Por apresentar uma alta porcentagem de alelos com frequências abaixo de 0,20 (52,17%), recomenda-se que o manejo vise aumentar a frequência destes alelos, além de incluir alelos que não foram amostrados para esta população (204, 276, 290, 292, 294, 296, 189). Este meliponário pode realizar a trocas de colônias com os meliponários 1, 2 e 4, os quais apresentaram a maior distância genética (Tabela 8) e diferenciação genética (Tabela 9) em relação a este meliponário.

Meliponário 6 (Mcap86): apresentou o menor padrão de diversidade genética em relação às demais populações analisadas. Uma alta porcentagem de alelos também apresentou frequências alélicas abaixo de 0,20 (42,11%). O manejo deve ser realizado de forma a aumentar a frequência destes alelos. Além disso, um grande número de alelos não foi amostrado para esta população (204, 288, 290, 292, 294, 296, 298, 326, 189, 271, 273), desta forma o manejo também deve visar a inclusão destes alelos na população. Apesar deste meliponário apresentar baixa diversidade genética quando comparado com a população nativa, a frequência de alguns dos seus alelos é maior que na população nativa. Além disso, o alelo 276 foi amostrado apenas neste meliponário, no meliponário 2 e na população nativa em baixíssimas frequências. Sendo assim, este meliponário pode atuar como fonte de indivíduos para aumentar a frequência de alelos raros ou com baixa frequência. Pode realizar trocas com os meliponário 1 e 2.

Como discutido anteriormente, a endogamia é uma ameaça para as abelhas devido ao seu sistema de determinação do sexo. A endogamia eleva a taxa de formação de machos diploides homozigotos para os alelos sexuais, pois aumenta a probabilidade de uma rainha ser fecundada por um macho com alelo sexual idêntico a um de seus alelos. A produção de machos diploides causa o enfraquecimento da colônia, pois estes machos normalmente são estéreis e podem compreender cerca de 50% da prole de uma rainha. Desta forma, o manejo das colônias deve ser realizado de forma a evitar a endogamia. Segundo Harpur et al. (2012), o manejo dos ninhos, a multiplicação artificial das colônias e o transporte de colônias em *Apis mellifera* são fatores responsáveis pela maior diversidade das colônias manejadas em relação as colônias naturais.

4.5 Formação de Populações para a Conservação

Mesmo que os meliponários não apresentaram diferenciação genética significativa em relação à população nativa, eles devem ser considerados como Unidades de Manejo (UM) (*Management Units*). Segundo Eizirik (1996), as unidades de Manejo são populações ou conjunto de populações que representam unidades demográficas localizadas e que não apresentam necessariamente uma diferenciação genética significativa em relação às unidades equivalentes.

Analisando a distribuição dos alelos e as frequências alélicas, como discutido, anteriormente, foi possível observar que cada meliponário analisado possui potencial genético para auxiliar na manutenção da diversidade genética da espécie. Dessa forma, os esforços de conservação da espécie que incluam a formação de populações para conservação, devem considerar as populações manejadas.

Resende e colaboradores (2014) indicaram algumas possíveis áreas onde populações de conservação podem ser instaladas, dentre essas as áreas foram citadas: as áreas de preservação do Parque Estadual Pedra Azul e de Forno Grande, a reserva biológica Augusto Ruschi e o Parque Nacional do Caparaó, sendo que para as duas últimas áreas não existem registro da ocorrência natural da espécie. O meliponário 2 (Mcap80) instalado no Parque Estadual de Pedra Azul, demonstrou neste trabalho e no trabalho realizado por Raad (2017) que meliponários instalados em áreas de preservação ambiental podem abrigar uma alta diversidade genética e contribuir para a preservação da espécie. Entretanto, isso não garante uma total proteção das colônias. Em novembro de 2017, grande parte das colônias deste meliponário foram roubadas,

restando apenas 5 colônias. Isto significou uma enorme perda de diversidade genética para a espécie.

Apesar de ter sido observado uma baixa diferenciação genética entre a população nativa e as populações manejadas, as populações manejadas podem auxiliar na conservação da espécie, já que a maioria das colônias conhecidas são mantidas por criadores. Foi amostrado um alelo exclusivo (290) na população nativa com baixa frequência (Tabela 7). Uma vez que foram amostrados um grande número de alelos com baixa frequência na população nativa, ressalta-se a importância de preservar as colônias naturais e preservar o habitat natural da espécie para evitar a perda de diversidade genética. Isto reforça a importância de preservar as populações manejadas, pois podem atuar como estoques de variabilidade genética e de indivíduos para a formação de populações de conservação, uma vez que muitos alelos foram amostrados com baixas frequências nas colônias naturais e a maioria das colônias conhecidas estão nas mãos dos meliponicultores.

Considerando o exposto na introdução deste trabalho, as populações de conservação não podem ser formadas de forma aleatória. As análises de diversidade genética mostraram ser importantes ferramentas que podem auxiliar na formação de populações de conservação e na preservação da espécie *M. capixaba*.

5. CONCLUSÕES

As análises de diversidade genética das colônias de *M. capixaba* mostraram que as colônias nativas possuem maior diversidade genética que os meliponários. Entretanto, as análises de estruturação e diferenciação populacional evidenciaram que há baixa distância genética e baixa diferenciação genética entre as populações. Isto indica que há ocorrência de fluxo gênico entre as populações ou os meliponários foram formados a partir de colônias naturais não estruturadas.

Ficou evidenciado que a redução do habitat natural da *M. capixaba* tem efeitos diretos sobre sua diversidade genética. Apesar de ter sido observada altas taxas de heterozigotidade, foram amostrados uma grande porcentagem de alelos raros ou com baixa frequência, o que pode ser um efeito da drástica redução populacional ocasionada pela fragmentação e destruição do habitat natural da espécie, sugerindo que a população está sobre os efeitos da deriva genética.

Os três principais fatores que podem influenciar na diversidade genética das populações manejadas são: a localização do meliponário, a fundação do meliponário e as técnicas de manejo. Meliponários localizados próximos à matas podem apresentar maior diversidade genética devido a ocorrência de fluxo gênico entre as colônias do meliponário e colônias nativas localizadas na mata do entorno do meliponário. Quanto a fundação dos meliponários e as técnicas de manejo, meliponários fundados por colônias de várias localidades, que realizam multiplicação constante das colônias e realiza trocas com outros meliponicultores também podem apresentar maior diversidade genética.

Com os resultados obtidos por meio das análises de diversidade genética, foi possível elaborar orientações de manejo, com o objetivo de manter o potencial genético dos meliponários. Como foi observada baixa diferenciação genética entre as populações e uma alta porcentagem de alelos raros ou com baixa frequência, o manejo deve ser realizado de forma a aumentar a frequência destes alelos, evitando a perda devido os efeitos da deriva genética.

Considerando que muitas colônias de *M. capixaba* são mantidas por meliponicultores, a meliponicultura pode ser considerada como uma forma alternativa e legal para a manutenção da *M. capixaba* em seu habitat natural e para preservação da espécie. As populações manejadas analisadas neste trabalho apresentaram elevado valor para a conservação, visto que cada população manejada apresentou suas particularidades. Além disso a diversidade genética é de extrema importância para a sobrevivência da espécie, principalmente devido ao *status* de conservação da espécie e de seu habitat.

Os esforços para o manejo e a conservação de *M. capixaba* devem ter como objetivo aumentar a população da espécie em número de colônia, elevar a diversidade genética e garantir a preservação de sua área de ocorrência natural. Análises de diversidade genética podem auxiliar na escolha de indivíduos para a formação de populações de conservação e orientar a reintrodução das colônias, garantindo que estas populações contenham o máximo de variabilidade genética disponível e a manutenção da espécie à longo prazo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, E. D. DE; DINIZ-FILHO, J. A. F.; OLIVEIRA, F. A. Extinção de populações locais do gênero *Melipona* (Hymenoptera: Meliponinae): efeito do tamanho populacional e da produção de machos por operárias. **Naturalia**, v. 25, n. March 2016, p. 287–299, 2000.
- BEYE, M. The dice of fate: The csd gene and how its allelic composition regulates sexual development in the honey bee, *Apis mellifera*. **BioEssays**, v. 26, n. 10, p. 1131–1139, 2004.
- BRASIL. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçada de Extinção. Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014. Ministério do Meio Ambiente. **Diário Oficial da União**, v. 245, n. 1, p. 121–126, 2014.
- BROWN, M. J. F.; PAXTON, R. J. The conservation of bees: a global perspective. **Apidologie**, v. 40, n. 3, p. 410–416, 2009.
- BRUFORD, M. W.; BRADLEY, D. G.; LUIKART, G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 11, p. 900–910, 2003.
- CARVALHO-ZILSE, G. A.; KERR, W. E. Substituição natural de rainhas fisogástricas e distância de vôo dos machos em Tiuba (*Melipona compressipes fasciculata* Smith, 1854) e Uruçu (*Melipona scutellaris* Latreille, 1811) (Apidae, Meliponini). **Acta Amazonica**, v. 34, n. 4, p. 649-652, 2004.
- CARVALHO-ZILSE, G. A.; KERR, W. E. Utilização de marcadores microssatélites para estudos populacionais em *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). **Magistra**, v. 18, nº 4, p. 213-220, 2006.
- CAUGHLEY, G. Directions in Conservation Biology. **The Journal of Animal Ecology**, v. 63, n. 2, p. 215, 1994.
- CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, n. 4, p. 2001–2014, 1996.
- CORTOPASSI-LAURINO, M. et al. Global meliponiculture : challenges and opportunities To cite this version. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 275–292, 2006.
- DELANEY, D. A. et al. Genetic characterization of commercial honey bee (Hymenoptera: Apidae) populations in the United States by using mitochondrial and microsatellite markers. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 102, n. 4, p. 666–673, 2009.
- EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. **Brazilian Journal of Genetics**, v.19, n.4, p.23-29, 1996.
- ELLSTRAND, N. C.; ELAM, D. R. Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**, v. 24, p. 217–242, 1993.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.
- FERNANDES-SALOMÃO, T. M. et al. The first internal transcribed spacer (ITS-1) of *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Characterization and phylogenetic analysis. **Insectes Sociaux**, v. 52, p. 11–18, 2005.

- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos da genética da conservação**. Tradução de Francisco, M. R. e Farias, I. P. Ribeirão Preto São Paulo: SBG (Sociedade Brasileira de Genética). 280p. 2008.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais). **Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica - Relatório Técnico/Período 2015/2016**. ArcPlan. São Paulo - SP, 69 p. 2017.
- FUNDAÇÃO S.O.S MATA ATLÂNTICA; INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais). Mapa dos Remanescentes. 2016. Disponível em: <<http://www.mapas.sosma.org.br>>; acesso em: 15/05/2018.
- FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 2ª Ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 631 p. 1992.
- GUICHOUX, E. et al. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 4, p. 591–611, 2011.
- HARPUR, B. A. et al. Management increases genetic diversity of honey bees via admixture. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 18, p. 4414–4421, 2012.
- HEDRICK, P. W. **Genetics of populations**. 4ª ed. Boston: Jones and Bartlett. 675p. 2011.
- JAFFÉ, R. et al. Bees for development: Brazilian survey reveals how to optimize stingless beekeeping. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–21, 2015.
- JAFFÉ, R. et al. Estimación de la densidad de colonias de abejas en su Rango Natural para cerrar la brecha en los Censos del declive de polinizadores. **Conservation Biology**, v. 24, n. 2, p. 583–593, 2010.
- JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, n. 10, p. 424–429, 1996.
- KELLER, L. F.; WALLER, D. M. Inbreeding effects in wild populations. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 17, n. 5, p. 230–241, 2002.
- KERR, W. E. Sex determination in bees XXI. Number of x0-heteroalleles in a natural population of *Melipona compressipes fasciculata* (Apidae). **Insectes Sociaux**, v. 34, n. 4, p. 274–279, 1987.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha Uruçu: Biologia, Manejo E Conservação**. p. 157, 1996.
- KERR, W. E.; VENCOVSKY, R. Melhoramento genético em abelhas I. Efeito de número de colônias sobre o melhoramento. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 5, p. 279- 285, 1982.
- KIMURA, M.; CROW, J. F. The number of alleles that can be maintained. **Genetics**, v. 49, n. 4, p. 725–738, 1964.
- LUIKART, G. et al. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. **Journal of Heredity**, v. 89, n. 3, p. 238–247, 1998.
- LUIKART, G.; CORNUET, J. M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. **Conservation Biology**, v. 12, n. 1, p. 228–237, 1998.
- MEIXNER, M. D. et al. Conserving diversity and vitality for honey bee breeding. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 85–92, 2010.

- MICHENER, C. D. **The bees of the world**. 2.ed. Baltimore, Johns Hopkins University Press, 953p. 2000.
- MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 2000.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, n. 3, p. 583–590, 1978.
- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press, New York, USA. 512p. 1987.
- NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, v. 29, n° 1, p. 1-10, 1975.
- NOGUEIRA, J. et al. Conservation study of an endangered stingless bee (*Melipona capixaba*-Hymenoptera: Apidae) with restricted distribution in Brazil. **Journal of Insect Conservation**, v. 18, n. 3, p. 317–326, 2014.
- PAGE, R. E. The evolution of multiple mating behavior by honey bee queens (*Apis mellifera* L.). **Genetics**, v. 96, p. 263-272, 1980.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537–2539, 2012.
- POTTS, S. G. et al. Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 25, n. 6, p. 345–353, 2010.
- RAAD, L. P. **Importância Genética de populações manejadas para a conservação de *Melipona capixaba* Moure & Camargo, 1994 e as consequências da hibridização com *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). 2017**. 60f. Dissertação (Mestrado em Entomologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.
- RAMOS, J. C. **Estrutura Genética de *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994 (Hymenoptera Apidae). 2009**. 62f. Dissertação (mestrado em Biologia Celulae e Estrutural). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.
- RESENDE, H. C. et al. Geographic distribution, key challenges, and prospects for the conservation of threatened stingless bee *Melipona capixaba* Moure and Camargo (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 529–535, 2014.
- RESENDE, H. C. **Filogeografia e conservação de *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994 e *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, e biogeografia do gênero *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera: Apidae). 2012**. 155f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.
- REUSCH, T. B. H.; WOOD, T. E. Molecular ecology of global change. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 19, p. 3973–3992, 2007
- RIDLEY, M. **Evolução**. 3.ed. Porto Alegre: ArtMed. 752p. 2006.
- SANTIAGO, L. A. **Variabilidade genética de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) de meliponários**. 2013. 130 p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Biologia/Genética). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- SEDDON, P. J. et al. Reversing defaunation: Restoring species in a changing world. **Science**, v. 345, n. 6195, p. 406–412, 2014.

- SERRA, B. D. V. Preservação de *Melipona capixaba* Moure & Camargo, 1994 (Hymenoptera: Apidae): aspectos biológicos e ecológicos. 2012. 121f. Tese (Doutorado em entomologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.
- SERRA, B. D. V. et al. Modeling potential geographical distribution of the wild nests of *Melipona capixaba* Moure & Camargo, 1994 (Hymenoptera, apidae): Conserving isolated populations in mountain habitats. **Natureza a Conservacao**, v. 10, n. 2, p. 199–206, 2012.
- SILVEIRA, F. A., MELO, G. A. R., CAMPOS, L.A.O. *Melipona capixaba* Moure & Camargo, 1995, in MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND G. M.; PAGLIA A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília, DF, MMA; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas. v.1. p. 381-382, 2008.
- TAJIMA, F. Infinite-allele model and infinite-site model in population genetics. **Journal of Genetics**, v. 75, n. 1, p. 27–31, 1996.
- VAN OOSTERHOUT, C. et al. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535–538, 2004.
- VIANA, M. V. C. et al. Transferability of microsatellite primers developed for stingless bees to four other species of the genus *Melipona*. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 3942–3947, 2011.
- WERNECK, M. V. **Uso de marcadores microssatélites para análise genética de populações de *Melipona mandacaia* Smith, 1863 (Hymenoptera, apoidea) no estado da bahia**. 2008. 25f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- WHITING, P.W. Multiple alleles in complementary sex determination in *Habrobracon*. **Genetics**, v. 28, p.365-382, 1943.
- WOYKE, J. Experiences with *Apis mellifera adansonii* in Brazil and in Poland. **Apiacta**, v. 8, p. 115-116, 1973.
- WRIGHT S. **Evolution and Genetics of Populations: Variability within and among Natural Populations**. University of Chicago Press, Chicago, 465 pp. 1978.
- WRIGHT, S. I. The Effects of Artificial Selection on the Maize Genome. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1310–1314, 2005.
- ZAYED, A. Bee genetics and conservation. **Apidologie**, v. 40, n. 2, p. 237–262, 2009.
- ZEDER, M. A. et al. Documenting domestication: The intersection of genetics and archaeology. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 3, p. 139–155, 2006.

CAPÍTULO 2. UTILIZAÇÃO DE *PRIMERS* MICROSSATÉLITES COMO AUXÍLIO NA DETECÇÃO DE HIBRIDIZAÇÃO ENTRE AS ABELHAS SEM FERRÃO *Melipona capixaba* E *Melipona scutellaris* (HYMENOPTERA: APIDAE)

1. RESUMO

A *M. capixaba* e *M. scutellaris* são espécies de abelha sem ferrão ameaçadas de extinção. Estas espécies ocorrem de forma alopátrica, estando seus habitats naturais separados por mais de 500 Km de distância. O isolamento geográfico impede a ocorrência de hibridização natural entre as espécies. Entretanto, foram relatados casos de hibridização entre as espécies quando ambas foram colocadas no mesmo ambiente. Os marcadores microssatélites por serem altamente polimórficos e possuírem herança biparental, podem ser importantes ferramentas para detectar a ocorrência de hibridização, além de facilitar o processo de identificação de híbridos. Este trabalho teve como objetivo identificar marcadores microssatélites capazes de detectar a ocorrência de hibridização entre as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* e identificar indivíduos híbridos, além de aprimorar os conhecimentos sobre esse evento. Dois casos de hibridização descritos na literatura foram reavaliados por meio de análises moleculares com marcadores microssatélites. As análises de ocorrência de hibridização por meios dos marcadores microssatélites foram pouco conclusivas, pois as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* são evolutivamente próximas e o compartilhamento de alelos pode ocorrer devido à retenção de polimorfismo ancestral ou devido à hibridização, e esse tipo de marcador molecular não é capaz de distinguir qual destes fenômenos é o responsável pelo compartilhamento dos alelos. Entretanto, as análises por meio dos marcadores microssatélites associadas às análises do DNA mitocondrial e das características morfológicas permitiram identificar a ocorrência de hibridização e as possíveis vias de hibridização entre as espécies. Os resultados indicaram que machos de *M. scutellaris* podem fecundar rainhas de *M. capixaba* e machos de *M. capixaba* podem fecundar rainhas de *M. scutellaris*. Também foi evidenciado que fêmeas híbridas são férteis, podem ser fecundadas por machos híbridos ou machos da espécie *M. scutellaris* e podem gerar descendentes férteis. A hibridização pode ser considerada uma ameaça a mais para a conservação da *M. capixaba*, desta forma colônias de *M. scutellaris* não devem ser introduzidas na área de ocorrência natural desta espécie.

2. INTRODUÇÃO

A hibridização é um processo natural e pode ser definida como a ocorrência do cruzamento entre indivíduos de espécies distintas ou pertencentes a populações que se diferenciam geneticamente (ENDLER, 1998; RHYMER; SIMBERLOFF, 1996). Sendo assim, a hibridização pode ser intraespecífica ou interespecífica.

Algumas barreiras impedem a ocorrência da hibridização interespecífica. Segundo Coyne e Orr (2004), estas barreiras podem ser intrínsecas ou extrínsecas. As barreiras intrínsecas são determinadas por incompatibilidades genéticas ou reprodutivas entre as espécies. As barreiras extrínsecas são determinadas por fatores ambientais (ex.: distribuição geográfica, tempo de florescimento e tipo de polinizador). Entretanto, as alterações no meio ambiente podem possibilitar o contato entre as espécies isoladas por barreira extrínsecas e aumentar as chances de ocorrer hibridização.

As atividades humanas têm favorecido o contato entre espécies que estavam isoladas geograficamente e que possuem potencial para acasalar entre si por meio da introdução de espécies exóticas e pela modificação e fragmentação dos habitats (LEVIN, 2002; MALLET, 2005; RHYMER; SIMBERLOFF, 1996; VILÀ; WEBER; ANTONIO, 2000). A hibridização antropogênica está ocorrendo de forma crescente e frequente e pode se tornar um desafio para a conservação das espécies (ALLENDORF et al., 2001; ALLENDORF; HOHENLOHE; LUIKART, 2010).

Até a década de 1960, a detecção de indivíduos híbridos era realizada por meio de estudos e comparações morfológicas, supondo que os híbridos apresentariam características morfológicas intermediárias às características das espécies parentais (ALLENDORF et al., 2001). Entretanto, a identificação morfológica não é fácil de ser realizada, nem toda a variação morfológica tem base genética e muitas vezes esta morfologia intermediária não pode ser detectada, pois os híbridos podem apresentar grande parte de seus genes herdados apenas de uma das espécies e serem morfológicamente indistinguíveis da espécie parental ou a aparência de híbrido pode ser resultado de mutações (ALLENDORF et al., 2001; MALLET, 2005). Além disso, os caracteres morfológicos não permitem identificar se um indivíduo é híbrido de primeira geração, gerado a partir de um retrocruzamento ou de uma geração posterior (ALLENDORF et al., 2001).

Marcadores moleculares altamente polimórficos, como os marcadores microssatélites, são muito empregados nos estudos de diversidade genética e na investigação das relações evolutivas entre as espécies, como a ocorrência de hibridização (BEAUMONT et al., 2001;

DUBUT et al., 2010; KHOSRAVI; REZAEI; KABOLI, 2013; RANDI; LUCCHINI, 2002). Por possuírem herança biparental e serem altamente polimórficos (SCHLOTTERER, 2000), os marcadores microssatélites se tornam importantes ferramentas para a identificação de hibridização, pois permitem identificar todos os espécimes amostrados e torna possível a realização de uma variedade de análises estatísticas que permitem identificar a origem dos indivíduos no caso de serem híbridos (HANSEN et al., 2000). A alta taxa de mutação dos marcadores microssatélite e sua natureza codominante possibilita que sejam utilizados para estimar a diversidade genética da espécie e a mistura genética entre espécies, mesmo que sejam intimamente relacionadas (RAZA; SHOAI; MUBEEN, 2016).

As espécies de abelha sem ferrão *M. capixaba* e *M. scutellaris*, ambas ameaçadas de extinção, ocorrem de forma alopátrica, e seus habitats naturais encontram-se separados por mais de 500 Km de distância (RESENDE, 2012). *Melipona capixaba* ocorre exclusivamente nas regiões de altitude do Espírito Santo (MELO, 1996; RESENDE et al., 2014) enquanto *M. scutellaris* ocorre no nordeste brasileiro (ALVES et al., 2012). Como não há uma área onde as espécies ocorram em simpatria, é impossível a ocorrência de hibridização na natureza (NASCIMENTO; MATUSITA; KERR, 2000; RESENDE, 2012). Entretanto, estudos realizados com colônias de *M. capixaba* e *M. scutellaris* mantidas em um mesmo meliponário confirmaram a ocorrência de hibridização entre as espécies (NASCIMENTO; MATUSITA; KERR, 2000; RAAD, 2017; RESENDE, 2012).

Morfologicamente *M. capixaba* é muito similar à *M. scutellaris* (MOURE; CAMARGO, 1994). As operárias das duas espécies podem ser distinguidas por meio de algumas características morfológicas. *Melipona capixaba* apresenta mesonoto liso e brilhante, pilosidade do mesonoto fusca, pilosidade do escutelo preta e ausência de faixas brancas nos tergos. Em *M. scutellaris* o mesonoto é mate e microrrugoso, a pilosidade do mesonoto e do escutelo é fulvo-arruivada e os tergos apresentam faixas pré-marginais largas, brancas e contrastantes (MOURE; CAMARGO, 1994)

Melipona scutellaris é uma espécie amplamente utilizada pelos meliponicultores brasileiros (ALVES et al., 2012), apresenta manejo relativamente simples e alta produtividade (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996). Apesar de ameaçada e extinção, colônia de *M. scutellaris* podem ser compradas de forma ilegal pela internet, podendo ser encontrada em vários estados brasileiros (RAAD, 2017).

Nascimento e colaboradores (2000), relataram o primeiro registro de ocorrência de hibridização entre as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris*. O caso de hibridização ocorreu entre colônias experimentais de *M. capixaba* e *M. scutellaris* que foram instaladas em um

meliponário fora da área de ocorrência natural das espécies, na cidade de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. A suspeita de hibridização surgiu por meio da observação das características morfológicas dos descendentes de *M. capixaba*, onde constatou-se que as operárias apresentavam características distintas das apresentadas pela espécie. O abdômen apresentava-se mais fino e com listras brancas, sendo esta uma característica peculiar da espécie *M. scutellaris*. A suspeita de hibridização foi averiguada por meio da análise eletroforética das esterases, em gel de poliacrilamida. As amostras de *M. capixaba* e *M. scutellaris* apresentaram perfil esterásico com bandas comuns à ambas espécies e exclusivas a cada uma das espécies e as amostras da colônia híbrida apresentaram uma mistura de bandas comuns e exclusivas de ambas as espécies. Estas observações sugeriram que a ausência de mecanismos de isolamento anatômico ou comportamental permitem o cruzamento dessas espécies quando são colocadas dentro de uma mesma área, e por compartilharem similaridades genéticas podem gerar híbridos férteis.

Um segundo registro de ocorrência de hibridização entre as espécies foi relatado por Resende (2012). A suspeita de hibridização foi informada por um meliponicultor do estado de São Paulo, Brasil, que adquiriu duas colônias de *M. capixaba* e as instalou em seu meliponário, onde já havia colônias de *M. scutellaris* instaladas. O criador de abelhas relatou que uma das rainhas morreu durante o transporte das colônias e, após a formação de uma nova rainha, as descendentes desta colônia passaram a apresentar características morfológicas distintas das características de *M. capixaba*. As operárias descendentes da nova rainha apresentaram faixas brancas no abdome, uma característica típica da espécie *M. scutellaris*. Na tentativa de recuperar a colônia de *M. capixaba*, o meliponicultor sacrificou a rainha da suposta colônia híbrida e uma nova rainha foi formada.

Resende (2012), ao ter acesso à colônia, verificou que não havia mais operárias com características morfológicas típicas de *M. capixaba*, todas as operárias apresentavam listras brancas no abdome. Também foi observada uma variação no padrão de coloração dos pelos, com algumas operárias aparentemente mais velhas apresentando padrão de coloração da espécie *M. capixaba* (preta e fulvo-clara) e operárias aparentemente mais novas com o padrão semelhante ao da espécie *M. scutellaris* (fulvo-arruivado). Para confirmar a hipótese de hibridização foram realizados estudos morfológicos e moleculares. As características morfológicas externas das operárias da suposta colônia híbrida foram comparadas com as características das operárias de *M. capixaba* e *M. scutellaris* amostradas em suas áreas de ocorrência natural. O DNA mitocondrial e nuclear das espécies e da suposta colônia híbrida foram comparados por meio do sequenciamento parcial dos genes, o mitocondrial citocromo

oxidase subunidade I (CO1) e nuclear EF1alfa. As comparações dos caracteres morfológicos e os dados moleculares confirmaram a ocorrência de hibridização entre as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris*.

Os dados moleculares obtidos por meio do sequenciamento parcial do gene mitocondrial CO1 mostraram que as operárias da colônia híbrida apresentaram DNA mitocondrial exclusivo de *M. capixaba*, sugerindo que são filhas de uma mesma rainha ou filhas de rainhas diferentes, mas pertencentes a uma mesma linhagem materna. Assim, considerando que a linhagem materna das operárias híbridas é de *M. capixaba*, o autor inferiu que a hibridização ocorreu por meio do cruzamento entre uma rainha virgem de *M. capixaba* e um macho de *M. scutellaris*. Os dados moleculares obtidos através do sequenciamento parcial do gene nuclear EF1alfa também confirmaram a hibridização entre uma rainha de *M. capixaba* e um macho de *M. scutellaris*. Cada uma das espécies apresentaram um único alelo exclusivo para o gene EF1alfa e a colônia híbrida apresentou os alelos exclusivos de *M. capixaba* e *M. scutellaris*, sendo que algumas operárias eram heterozigotas para o gene EF1alfa e outras homozigotas. Resende propôs que as operárias heterozigotas para o loco EF1alfa eram híbridas de primeira geração e as homozigotas eram híbridas de segunda geração. Assim, o autor sugeriu que a primeira geração originou-se do cruzamento de uma rainha de *M. capixaba* e um macho de *M. scutellaris* e a segunda geração resultou do cruzamento de uma rainha híbrida descendente da primeira geração e um macho *M. scutellaris*, sugerindo que as fêmeas híbridas são férteis e podem ser fecundadas por macho da espécie *M. scutellaris*.

O terceiro registro de hibridização foi descrito recentemente por RAAD (2017). Segundo o autor, um meliponicultor adquiriu duas colônias de *M. scutellaris* e as instalou em um meliponário na cidade de Conceição do Castelo (ES), área de ocorrência natural da espécie *M. capixaba* e junto a colônias desta espécie. Como as colônias de *M. scutellaris* não se aclimataram ao novo ambiente e não se desenvolveram como o esperado, elas foram transferidas para outro meliponário no município de Aracruz (ES), fora da área de ocorrência de *M. capixaba*, onde outro criador de abelhas mantinha com sucesso colônias de *M. scutellaris*. Esse novo meliponicultor, tendo conhecimento sobre a possibilidade de hibridização entre as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris*, entrou em contato com o professor Helder Canto Resende (Universidade Federal de Viçosa – *campus* UFV Florestal). Assim, o professor juntamente com Raad passaram a monitorar o desenvolvimento das supostas colônias híbridas e durante o período de maio de 2015 a janeiro de 2016 realizaram três amostragens de operárias de todas as colônias presentes no meliponário e na segunda e terceira amostragem as rainhas das supostas colônias híbridas também foram amostradas. As observações realizadas durante o

monitoramento das colônias sugeriram que a hibridização ocorreu por meio do cruzamento de uma rainha de *M. scutellaris* e um macho de *M. capixaba* em sua área de ocorrência natural.

Para confirmar a ocorrência de hibridização e determinar a dinâmica de hibridização nas três gerações híbridas amostradas, Raad realizou estudos morfológicos e moleculares. As características morfológicas das operárias e rainhas das supostas colônias híbridas foram analisadas e indicaram a ocorrência de hibridização. Como observado por Nascimento et al. (2000) e Resende (2012), as operárias apresentaram listras brancas no abdome, característica típica de *M. scutellaris*. As rainhas coletadas também apresentaram características morfológicas híbridas. Os dados moleculares foram obtidos por meio do sequenciamento do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (CO1) e do rDNA espaçador interno transcrito 1 (ITS1). As análises do DNA mitocondrial confirmaram a hipótese da ocorrência de hibridização entre uma rainha de *M. scutellaris* e um macho de *M. capixaba*, sendo que na análise Bayesiana os híbridos foram agrupados exclusivamente com *M. scutellaris*, o que indicou a origem materna das colônias híbridas. Os resultados obtidos para as sequências ITS1 foram menos conclusivos quanto a herança genética da colônia híbrida, as sequências de rDNA dos híbridos se mostraram intermediárias entre as duas espécies. As características híbridas mantiveram-se ao longo das gerações, o que levou o autor a inferir sobre duas possíveis vias de hibridização que originaram a segunda e terceira geração: a fecundação de rainhas híbridas por machos híbridos (não foram amostrados), ou a fecundação de rainhas híbridas por machos de *M. scutellaris*.

O presente trabalho visa aprimorar o conhecimento referente aos eventos de hibridização entre as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* e identificar marcadores microssatélites com potencial para detectar a ocorrência de hibridização entre as espécies e identificar os indivíduos híbridos. Para isto, foram reavaliados os casos de hibridização descritos por Resende (2012) e Raad (2017).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Biológico

As amostras de DNA genômico da espécie *M. scutellaris* foram obtidas no Laboratório de Biologia Molecular de Insetos da Universidade Federal de Viçosa, compreendendo coletas realizadas por Resende (2012). As amostras foram selecionadas de forma que amostrassem os principais genótipos encontrados por Resende (2012) e ocorressem ao longo de toda a distribuição geográfica natural da espécie (Bahia, Paraíba, Pernambuco e Sergipe – Tabela 1).

Tabela 1 - Relação das amostras de *M. scutellaris* utilizadas nas análises de ocorrência de hibridização entre as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* no estado de São Paulo e no Espírito Santo.

ID	Voucher	Município	Estado	Número de Indivíduos
Mscu1	Mscu4.1	Armagosa Baixo Alegre	Bahia	1
Mscu2	Mscu5.1	Andaraí	Bahia	1
Mscu3	Mscu17.2	Lafaiete Coutinho	Bahia	1
Mscu4	Mscu28.1	Morro do Chapéu	Bahia	1
Mscu5	Mscu51.1	Bananeiras	Paraíba	1
Mscu6	Mscu61.1	Sairé	Pernambuco	1
Mscu7	Mscu63.1	Japarutuba	Sergipe	1
Mscu8	Mscu69.2	Igarassu	Pernambuco	1

As amostras de *M. capixaba* foram obtidas a partir de coletas realizadas por Resende (2012), Serra, (2012), Raad (2017) e pela equipe do Laboratório de Genética e Conservação da Universidade Federal de Viçosa – *campus* UFV Florestal. As amostras de *M. capixaba* utilizadas correspondem às mesmas amostras utilizadas no capítulo 1 deste trabalho (ver capítulo 1, p. 11).

As amostras de DNA genômico das operárias das colônias híbridas oriundas do estado de São Paulo foram obtidas no Laboratório de Biologia Molecular de Insetos da Universidade Federal de Viçosa, compreendendo amostras do trabalho realizado por Resende (2012).

As amostras de DNA genômico das colônias híbridas oriundas do Espírito Santo foram obtidas no Laboratório de Genética e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal de Viçosa – *campus* UFV Florestal, compreendendo amostras do trabalho realizado por Raad (2017). Raad amostrou as operárias das supostas colônias híbridas em três períodos diferentes (Tabela 2). A primeira coleta foi realizada no dia 13/05/15 e foram coletadas apenas operárias das 9 colônias amostradas. Na segunda (12/09/2015) e terceira coleta (09/01/2016), além das operárias, as rainhas das colônias que aparentavam ser morfologicamente híbridas também foram amostradas. As datas das coletas indicam em qual geração os indivíduos pertencem,

sendo assim na primeira coleta foram amostrados indivíduos da primeira geração (F1), na segunda coleta indivíduos da segunda geração (F2) e na terceira coleta indivíduos da terceira geração (F3).

Tabela 2 - Relação das amostras das supostas colônias híbridas amostradas por Raad (2017). Na coleta 1 foram amostrados indivíduos da 1ª geração, na coleta 2 foram amostrados indivíduos da 2ª geração e na coleta 3 indivíduos da 3ª geração.

Coleta 1 - 13/05/2015				Coleta 2 - 12/09/2015				Coleta 3 - 09/01/2016	
Cód.	Col./Ind.	Cód.	Col./Ind.	Cód.	Col./Ind.	Cód.	Col./Ind.	Cód.	Col./Ind.
Hsc1	Col.1/1	Hsc12	Col.7/1	Hsc18	Col.1/R	Hsc29	Col.6/2	Hsc37	Col.1/R
Hsc2	Col.1/2	Hsc13	Col.7/2	Hsc19	Col.1/1	Hsc30	Col.7/R	Hsc38	Col.1/1
Hsc3	Col.2/1	Hsc14	Col.8/1	Hsc20	Col.1/2	Hsc31	Col.7/1	Hsc39	Col.1/2
Hsc4	Col.3/1	Hsc15	Col.8/2	Hsc21	Col.3/R	Hsc32	Col.7/2	Hsc40	Col.3/R
Hsc5	Col.3/2	Hsc16	Col.9/1	Hsc22	Col.3/1	Hsc33	Col.8/1	Hsc41	Col.3/1
Hsc6	Col.4/1	Hsc17	Col.9/2	Hsc23	Col.3/2	Hsc34	Col.8/2	Hsc42	Col.3/2
Hsc7	Col.4/2			Hsc24	Col.4/1	Hsc35	Col.9/1	Hsc43	Col.4/1
Hsc8	Col.5/1			Hsc25	Col.4/2	Hsc36	Col.9/2	Hsc44	Col.4/2
Hsc9	Col.5/2			Hsc26	Col.5/1			Hsc45	Col.7/R
Hsc10	Col.6/1			Hsc27	Col.5/2			Hsc46	Col.7/1
Hsc11	Col.6/2			Hsc28	Col.6/1			Hsc47	Col.7/2

Cód.: Código da amostra; Col./Ind.: colônia/indivíduo; R: rainha.

3.2 Amplificação do DNA e Marcadores Moleculares

As ampliações das amostras de DNA das espécies *M. capixaba*, *M. scutellaris* e possíveis híbridos foram realizadas por meio dos marcadores microssatélites descritos no capítulo 1 deste trabalho (ver capítulo 1, p. 14, 15 e 16). Dos 5 primers utilizados, 4 foram desenhados para a espécie *M. scutellaris* (SRR1, SRR3, SSR4, SSR5) e 1 para a espécie *M. capixaba* (SSR2) (Tabela 3).

As reações de PCR foram realizadas sob as mesmas condições descritas no capítulo 1 deste trabalho (ver capítulo 1, p. 15). Os produtos do PCR foram genotipados no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), por meio do. Em um volume de 1µL de produto de PCR, foi adicionado 0,5µL de GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard e 8,5µL de Formamida HI-DI Applied biosystems. As reações foram colocadas em termociclador a 95°C por 3min para a desnaturação e submetidas à choque térmico no freezer. Posteriormente, as amostras foram aplicadas no sequenciador automático ABI3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies) conforme orientações do fabricante.

Tabela 3 - Descrição dos loco microssatélites e sequência de *primers* utilizados para a análise de hibridização entre as espécies *Melipona capixaba* e *Melipona scutellaris*.

Loco	Repetição	Sequência (5'-3')	T _A (°C)	MF	Espécie de Origem do Primer
SSR1	(GT) ₈	F: CACCGAAAGATACAAAGCCG R: GCGGGATTATTTTCATTACAGC	49	HEX	<i>M. scutellaris</i>
SSR2	(TG) ₂₃	F: AGAAAGAAGAAGGGTTGCGT R: GTTCGGGGAGACGACTAAAT	49	HEX	<i>M. capixaba</i>
SSR3	(TG) ₁₃	F: TCGTAAGCGGACATGATCCC R: TCACCGATGTTCTCCACCAC	53	6-FAM	<i>M. scutellaris</i>
SSR4	(TC) ₁₆	F: CAATCCTCTTCCCACCCTCT R: TTGACGGAGCGAGACGAACG	55	6-FAM	<i>M. scutellaris</i>
SSR5	(AC) ₈	F: TAGTCTCGCTCCAGTAAGCG R: TGGGACTAGCGAAGAGGAAC	53	HEX	<i>M. scutellaris</i>

TA: Temperatura de anelamento do *primer* (°C); MF: marcador de fluorescência do *primer*.

3.3 Análises dos dados

Os dados obtidos no sequenciamento automático foram analisados no programa Geneious R7 (biomatters <http://www.geneious.com>), e os genótipos amostrados foram anotados em uma tabela no Excel, a qual foi utilizada, nas configurações adequadas, como arquivo de entrada para as análises estatísticas.

Para verificar as diferenças genéticas entre as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris*, a diversidade genética e as diferenças alélica entre as espécies foram estimadas através do programa GenAlex versão 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). Foram calculados: o número de alelos por loco para cada espécie, o número total de alelos por espécie, número de alelos privados por loco e por espécie e a variação no tamanho dos alelos. No mesmo programa também foram obtidos os dados de diversidade genética para os indivíduos híbridos, sendo calculados o número de alelos por loco, o número total de alelos e a variação no tamanho dos alelos. Além disso, também foram estimadas as frequências alélicas para cada grupo amostral (*M. capixaba*, *M. scutellaris* e híbridos).

Análises bayesianas dos dados microssatélites foram realizadas através do programa Structure 2.3.4 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000). O método Bayesiano implementado neste programa faz inferências sobre o número (K) de conjuntos gênicos que podem ser traduzidos em populações ou espécies. A análise foi realizada para verificar o número real de K grupos entre todas as amostras e visualizar o número de grupos diferenciados entre as espécies parentais e as populações com híbridos. Utilizou-se o modelo de

ancestralidade misturada (*admixture model*) (cada indivíduo pode ter ancestralidade em mais de uma população parental), frequências alélicas correlacionadas, intervalo de $K= 1$ a 10, 10 réplicas para cada valor de K , 1.000.000 de gerações MCMC e 250.000 gerações “*burn-in*”.

Para verificar as relações filogenéticas entre os haplótipos mitocondriais, bem como avaliar a possível linhagem materna das supostas colônias híbridas, foi construída uma rede de haplótipos a partir das sequências do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (CO1) das amostras de *M. capixaba*, *M. scutellaris* e possíveis híbridos analisados por Resende (2012) e Raad (2017). As sequências foram gentilmente cedidas pelos autores. Os haplótipos existentes foram identificados com auxílio do software DnaSP v.5.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009). A rede de haplótipos foi reconstruídas por análise de *median-joining* (BANDELT; FORSTER; ROHL, 1999) utilizando o programa NETWORK 5.0.01 (Fluxus Technology Ltd) e editadas manualmente para melhor visualização gráfica dos grupos formados.

As amostras também foram analisadas visualmente quanto aos genótipos apresentados. Foi elaborada uma tabela com o genótipo de cada amostra, posteriormente foram identificados os alelos comuns e exclusivos das espécies e analisado o genótipo apresentado pelos indivíduos híbridos, a fim de identificar alguma evidência de hibridização.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises Interespecíficas

A diversidade genética e as diferenças alélicas entre as espécies foram demonstradas na Tabela 4. Os marcadores microssatélites utilizados foram polimórficos para ambas espécies. Foi verificado um total de 30 alelos para a espécie *M. capixaba*. Para a espécie *M. scutellaris* foi verificado um total de 24 alelos. O loco SSR2 apresentou a maior diferença de diversidade genética entre as espécies, com *M. capixaba* apresentando 12 alelos e *M. scutellaris* com 6 alelos. Houve variação na faixa de tamanho dos alelos de cada espécie, o que indica a presença de alelos exclusivos. *Melipona capixaba* apresentou alelos exclusivos para todos os loco, sendo amostrado um total de 12 alelos exclusivos para a espécie. *Melipona scutellaris* apresentou 7 alelos exclusivos, sendo que não foram amostrados alelos exclusivos apenas para o loco SSR5.

Tabela 4 - Diversidade genética estimada para cada espécie (*M. capixaba* e *M. scutellaris*) por loco.

Loco	Número de alelos		Alelos exclusivos		Tamanho dos alelos (pb)	
	<i>M. capixaba</i>	<i>M. scutellaris</i>	<i>M. capixaba</i>	<i>M. scutellaris</i>	<i>M. capixaba</i>	<i>M. scutellaris</i>
SSR1	3,0	4,0	1	2	204 - 208	206 – 212
SSR2	12,0	7,0	6	1	276 - 300	276 – 290
SSR3	5,0	5,0	2	2	324 - 332	324 – 336
SSR4	5,0	6,0	1	2	189 - 197	189 – 201
SSR5	5,0	3,0	2	0	265 - 273	267 – 271
Total	30	25	12	7	-	-
Média	6,0	5	-	-	-	-

4.2 Avaliação da Ocorrência de Hibridização entre Colônias de *M. capixaba* e *M. scutellaris* no estado de São Paulo, Brasil (RESENDE, 2012)

Foram analisados 13 supostos indivíduos híbridos. Verificou-se um total de 18 alelos para estas amostras, sendo que o número de alelos por loco variou de 3 a 4, com uma média de 3,6 alelos por loco (Tabela 5). A variação do tamanho dos alelos para os supostos indivíduos híbridos abrangeu a faixa de tamanho apresentada pelas espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* (Tabela 4 e Tabela 5). Para o loco SRR1 as amostras dos supostos indivíduos híbridos apresentaram uma variação de tamanho de alelos (206-212 pb) que abrange uma parte da variação amostrada exclusivamente para *M. scutellaris* (206-212), sendo que *M. capixaba* apresentou uma variação de 204 à 208 pb. Para o loco SSR5 as amostras dos supostos indivíduos híbridos apresentaram uma variação de tamanho de alelos (265-269 pb) que abrange

uma parte da variação amostrada exclusivamente para *M. capixaba* (265-273), sendo que *M. scutellaris* apresentou uma variação de 267 à 271 pb. Isto indica que entre os supostos indivíduos híbridos pode haver descendentes de ambas espécies, sugerindo uma possível ocorrência de hibridização.

Tabela 5 - Número de alelos e tamanhos dos alelos (pb) dos supostos indivíduos híbridos para cada loco.

Loco	Número de alelos por loco	Tamanho dos alelos (pb)
SSR1	4,000	206 – 212
SSR2	4,000	276 – 288
SSR3	3,000	324 – 330
SSR4	4,000	189 – 195
SSR5	3,000	265 – 269
Média	3,600	-

A análise Bayesiana gerada pelo programa Structure indicou K=2 grupos genéticos ($P_{(K)}= 1.000$), o que indica que duas espécies contribuíram para a composição genética das amostras. Esses grupos correspondem às espécies *M. capixaba* (azul) e *M. scutellaris* (laranja) (Figura 1). O gráfico da composição genética do conjunto de amostras (*M. capixaba*, *M. scutellaris* e híbridos) (Figura 1) mostra os supostos grupos definidos à priori. A população 1 corresponde à espécie *M. capixaba*, a população 2 corresponde à espécie *M. scutellaris* e a população 3 corresponde aos indivíduos híbridos. Os resultados indicaram o compartilhamento de alelos entre as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* (Figura1). O compartilhamento de alelos entre as espécies pode ser explicado pela retenção de polimorfismo ancestral. O compartilhamento de polimorfismo ancestral ocorre entre espécies filogeneticamente próximas (WENDT et al., 2000). *Melipona capixaba* e *M. scutellaris* são espécies irmãs e análises moleculares sugeriram um processo de especiação recente do grupo *M. capixaba* e *M. scutellaris* (RESENDE, 2012). As análises filogenéticas realizadas por Resende (2012) indicam que a divergência genética dos grupos *M. capixaba* e *M. scutellaris* ocorreu a cerca de 600 mil anos a 1,26 Maa. Assim, o compartilhamento pode ser igualmente explicado pelo tempo insuficiente para que os alelos ancestrais se fixassem dentro das linhagens.

Os supostos indivíduos híbridos apresentaram uma mistura de alelos de ambas espécies, o que indica uma possível mistura genética entre as espécies (Figura 1). Entretanto não foi possível afirmar se esta mistura genética é resultado da hibridização ou retenção de polimorfismo ancestral. A identificação de híbridos pode ser uma tarefa difícil quando as espécies hibridizantes em estudo são filogeneticamente próximas e os marcadores moleculares produzem um diagnóstico conclusivo. Desta forma, a análise pode ser mais conclusiva quando

são utilizados um maior número e tipos de marcadores moleculares combinados com análises morfológicas (SCHNEIDER, 2009).

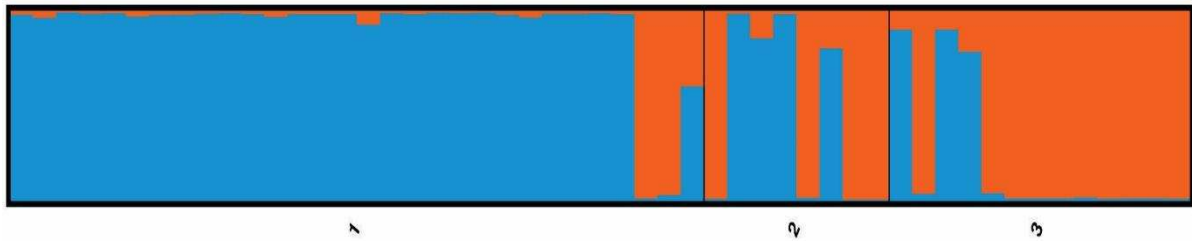


Figura 1 – Gráfico da composição genética dos grupos amostrais gerados pelo programa Structure. Grupo1: *M. capixaba*; Grupo 2: *M. scutellaris*; Grupo3: híbridos.

A rede de haplótipos construída pela sequência do gene mitocondrial CO1, mostrou uma separação clara entre as duas linhagens (*M. capixaba* e *M. scutellaris*), com a formação de dois cladogramas bem definidos (Figura 2). Os haplótipos de *M. capixaba* foram agrupados em um clado e no outro clado foram agrupados os haplótipos de *M. scutellaris*, sendo que o haplótipo dos indivíduos híbridos foram agrupados juntamente com o clado de *M. capixaba*, inclusive os híbridos apresentaram haplótipo idêntico ao desta espécie. Isso indica que os híbridos possuem DNA mitocondrial de *M. capixaba*, sugerindo dessa forma que a hibridização ocorreu por um macho de *M. scutellaris* que fecundou uma rainha de *M. capixaba*, corroborando com os resultados encontrados por Resende (2012).

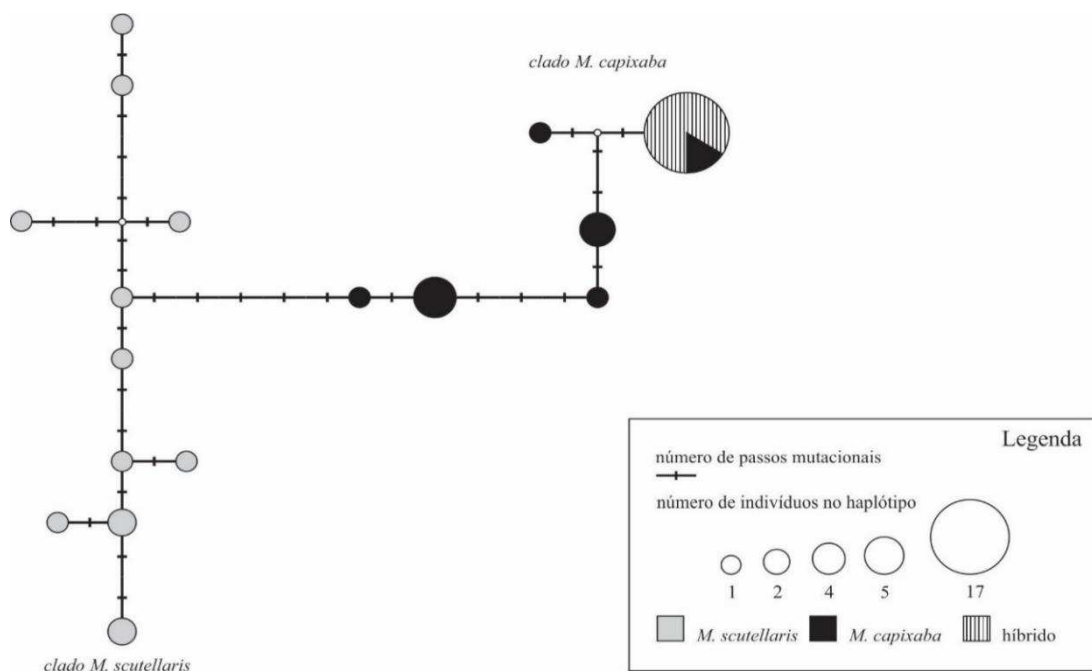


Figura 2 - Rede de haplótipos obtida por *median-joining network* a partir do gene mitocondrial CO1 para as amostras de *M. capixaba*, *M. scutellaris* e possíveis híbridos.

Os alelos amostrados para os indivíduos de *M. capixaba*, *M. scutellaris* e híbridos estão demonstrados na Tabela 6. Os genótipos amostrados para as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris*, genótipos amostrados para os indivíduos híbridos e as frequências dos alelos amostrados para cada loco por amostra de cada grupo amostral foram demonstrados nos anexos III, VI e V, respectivamente.

Tabela 6 - Alelos amostrados para *M. capixaba*, *M. scutellaris* e indivíduos híbridos originados do estado de São Paulo (RESENDE, 2012).

		Alelos												
Loco SRR1		204	206	208	210	212								
<i>M. capixaba</i>		■	■	■										
<i>M. scutellaris</i>			■	■	■	■								
Híbrido			■	■	■	■								
Loco SSR2		276	278	280	282	284	286	288	290	292	294	296	298	300
<i>M. capixaba</i>		■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>M. scutellaris</i>		■	■		■	■	■	■	■					
Híbrido		■	■	■				■						
Loco SSR3		324	326	328	330	332	334	336						
<i>M. capixaba</i>		■	■	■	■	■								
<i>M. scutellaris</i>		■			■	■	■	■						
Híbrido		■		■	■									
Loco SSR4		189	191	193	195	197	199	201						
<i>M. capixaba</i>		■	■	■	■	■								
<i>M. scutellaris</i>		■	■	■	■		■	■						
Híbrido		■	■	■	■									
Loco SSR5		265	267	269	271	273								
<i>M. capixaba</i>		■	■	■	■	■								
<i>M. scutellaris</i>			■	■	■									
Híbrido		■	■	■										

■ Alelos exclusivos de *M. capixaba*, ■ Alelos comuns, ■ Alelos exclusivos de *M. scutellaris*

Analisando os genótipos individualmente, foi possível observar que os supostos híbridos apresentaram alelos que foram amostrados somente para a espécie *M. capixaba* (amarelo), alelos amostrados apenas para *M. scutellaris* (verde) e também alelos comuns à ambas às espécies (azul) (Tabela 6). Em nenhum loco foram amostrados supostos híbridos com o genótipo formado por alelos exclusivos de ambas as espécies. Os genótipos dos supostos

híbridos foram compostos por alelos comuns, ou por alelos comuns e alelos exclusivos de uma das espécies (Anexo V).

Resende (2012) por meio das análises das sequências mitocondrial (CO1) e nuclear (EF1alfa) e das características morfológicas sugeriu que entre as amostras dos supostos indivíduos híbridos haviam descendentes híbridos da primeira geração, originados do cruzamento entre uma rainha de *M. capixaba* e um macho de *M. scutellaris*, e descendentes híbridos da segunda geração, originados do cruzamento de uma rainha híbrida e um macho de *M. scutellaris*. Os alelos amostrados pelos microssatélites corroboraram com esta hipótese. Foram amostrados para os indivíduos híbridos dois alelos exclusivos de *M. scutellaris* para o mesmo loco (alelos 210 e 2012 – loco SSR1) (Tabela 6). Como os machos são haploides, isto indica que há híbridos descendentes de machos diferentes, sugerindo a sobreposição de gerações na colônia híbrida e que as fêmeas híbridas são férteis e podem ser fecundadas por machos da espécie *M. scutellaris*.

4.3 Avaliação da Ocorrência de Hibridização entre Colônias de *M. capixaba* e *M. scutellaris* no estado do Espírito Santo, Brasil (RAAD, 2017)

Foram analisadas 9 colônias supostamente híbridas, totalizando 47 indivíduos. Foram amostrados um total de 20 alelos para estas amostras, sendo que o número de alelos por loco variou de 3 a 5, com uma média de 4 alelos por loco. A variação do tamanho dos alelos para os supostos indivíduos híbridos abrangeu a faixa de tamanho apresentada pelas espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* (Tabela 4 e Tabela 7). Alguns locos apresentaram variação no tamanho dos alelos de forma que abrangeram parte da variação amostrada exclusivamente para *M. capixaba* ou *M. scutellaris*, o que indica que entre os supostos indivíduos híbridos pode haver descendentes de ambas espécies, sugerindo uma possível ocorrência de hibridização.

Tabela 7 - Número de alelos e tamanho dos alelos (pb) dos supostos indivíduos híbridos para cada loco.

Loco	Nº de Indivíduos	Número de alelos por loco	Tamanho dos alelos (pb)
SSR1	46	3,0	206 – 210
SSR2	45	5,0	276 – 290
SSR3	45	4,0	324 – 334
SSR4	46	5,0	189 – 199
SSR5	46	3,0	265 – 269
Média	-	4,0	-

A análise Bayesiana gerada pelo programa Structure indicou $K=2$ grupos genéticos ($P_{(K)}= 1.000$), indicando que duas espécies contribuíram para a composição genética do grupo amostral. Os grupos indicados correspondem às espécies *M. capixaba* (azul) e *M. scutellaris* (laranja) (Figura 3). O gráfico da composição genética do conjunto amostral (*M. capixaba*, *M. scutellaris* e híbridos) (Figura 3) mostra os supostos grupos definidos à priori. A população 1 corresponde à espécie *M. capixaba*, a população 2 corresponde à espécie *M. scutellaris* e a população 3 corresponde às amostras dos indivíduos híbridos. Cada gráfico corresponde à uma colônia analisada. Para a colônia 2 não foi gerado um gráfico, pois foi amostrado um único indivíduo para esta colônia. O gráfico mostrou que há alelos compartilhados entre as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris*. Como citado anteriormente para o caso de hibridização no estado de São Paulo (RESENDE, 2012), o compartilhamento de alelos pode ser explicado pela retenção de polimorfismo ancestral, uma vez que as espécies são filogeneticamente próximas.

No gráfico gerado pelo Structure, não foi possível observar claramente uma mistura de alelos de ambas espécies para os supostos híbridos (Figura 3). Os resultados gerados pela análise Bayesiana não foram conclusivos, não sendo possível afirmar a ocorrência de hibridização. Como citado para o caso de hibridização do estado de São Paulo (RESENDE, 2012), a detecção da ocorrência de hibridização não é uma tarefa fácil quando as espécies analisadas são evolutivamente próximas e os resultados apresentados pelos marcadores moleculares não produzem um diagnóstico claro. Análises moleculares realizadas com um maior número e tipos de marcadores e associadas com análises morfológicas podem ser mais conclusivas na detecção da ocorrência de hibridização e na identificação de indivíduos híbridos (SCHNEIDER, 2009).

A rede de haplótipos, construída através da sequência do gene mitocondrial CO1, mostrou uma clara separação entre os táxons *M. capixaba* e *M. scutellaris*, com a formação de dois clados bem definidos (Figura 4). Um clado agrupou os haplótipos de *M. scutellaris* e outro clado os haplótipos de *M. capixaba*. Os haplótipos dos supostos indivíduos híbridos foram agrupados juntamente com o clado de *M. scutellaris*, inclusive os híbridos apresentaram haplótipo idêntico ao desta espécie. Estes resultados mostram os supostos híbridos possuem DNA mitocondrial de *M. scutellaris*, sugerindo que a hibridização ocorreu através do cruzamento entre uma rainha de *M. scutellaris* e um macho de *M. capixaba*, corroborando com os resultados encontrados por Raad (2017).

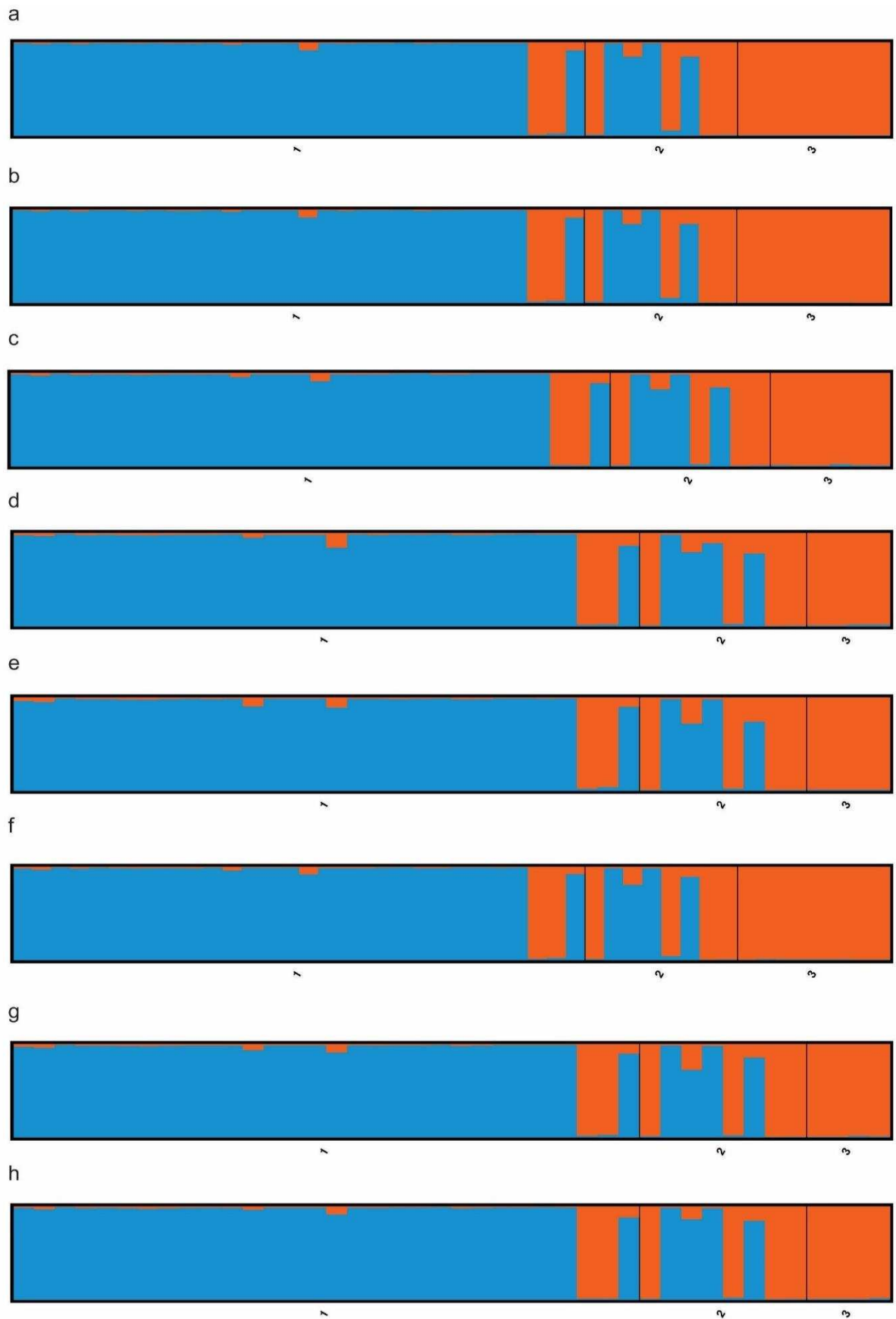


Figura 3 - Gráfico da composição genética dos grupos amostrais gerados pelo programa Structure. Grupo 1: *M. capixaba*; Grupo 2: *M. scutellaris*; Grupo 3: híbridos. a) colônia 1, b) colônia 3, c) colônia 4, d) colônia 5, e) colônia 6, f) colônia 7, g) colônia 8, h) colônia 9.

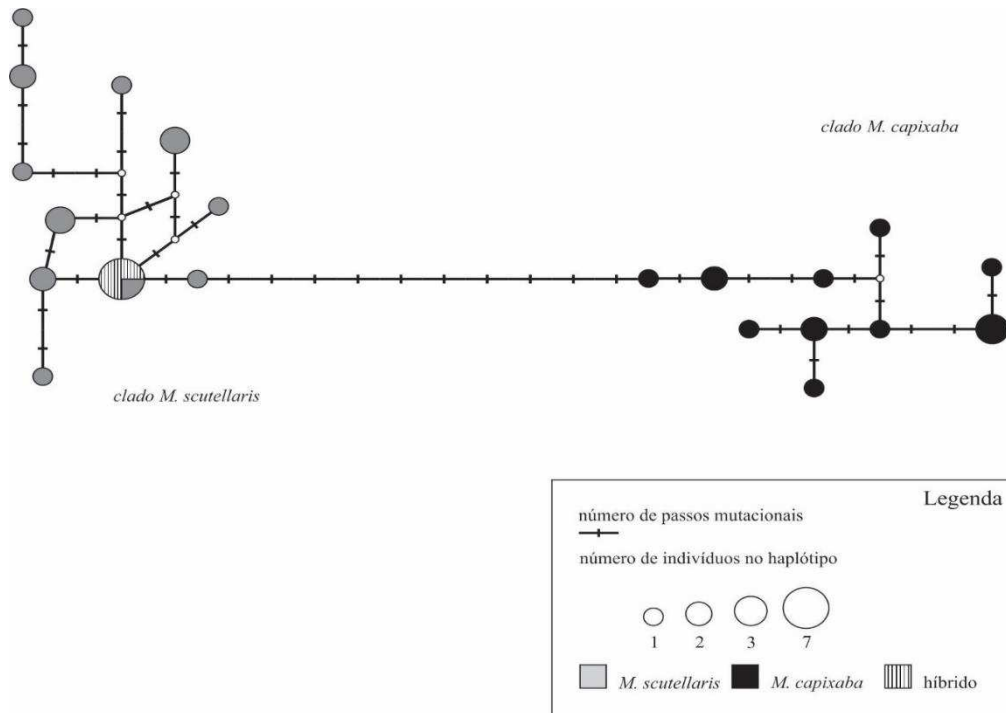


Figura 4 - Rede de haplótipos obtida por *median-joining network* a partir do gene mitocondrial CO1 para as amostras de *M. capixaba*, *M. scutellaris* e híbridos (colônia 1).

Os alelos amostrados para as amostras de *M. capixaba*, *M. scutellaris* e indivíduos híbridos estão demonstrados na Tabela 8. Os genótipos amostrados para as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris*, genótipos amostrados para os supostos indivíduos híbridos e as frequências dos alelos amostrados para cada loco por amostra de cada grupo amostral foram demonstrados nos anexos IV, V e VII, respectivamente.

Os híbridos apresentaram alelos que foram amostrados apenas para *M. capixaba* (amarelo) ou *M. scutellaris* (verde) e também alelos que foram amostrados em ambas às espécies (azul) (Tabela 8). Os locos SSR1, SSR2 e SSR4 apresentaram alelos amostrados apenas para *M. scutellaris* e alelos comuns à ambas espécies. O loco SSR5 apresentou alelos amostrados apenas para *M. capixaba* e alelos compartilhados por ambas espécies. O loco SSR3 apresentou alelos amostrados apenas para *M. capixaba*, alelos amostrados apenas *M. scutellaris* e alelos compartilhados pelas duas espécies. A amostragem de alelos exclusivos de ambas as espécies nos supostos indivíduos híbridos sugere uma mistura genética entre as espécies e a possível ocorrência de hibridização. Somente estas observações não permitiram confirmar a ocorrência de hibridização, uma vez que estes resultados observados podem ser devido a retenção de polimorfismo ancestral e não devido a ocorrência de hibridização. Além disso, o número de amostras de *M. scutellaris* utilizadas foi muito pequeno, o que pode ter mascarado a presença de alelos que foram amostrados neste estudo apenas para *M. capixaba* e que também podem ser amostrados em *M. scutellaris* ou vice-versa. Sendo assim, tanto para o caso de

hibridização no Espírito Santo (RAAD, 2017) quanto para o caso de hibridização em São Paulo (RESENDE, 2012), apenas os resultados das análises com marcadores microssatélite não foram conclusivos sobre a ocorrência de hibridização. A confirmação da hibridização entre as espécies só foi possível devido à combinação das análises dos marcadores microssatélites com as análises do DNA mitocondrial e a comparação das características morfológicas.

Tabela 8 - Alelos amostrados para *M. capixaba*, *M. scutellaris* e indivíduos híbridos oriundos do estado do Espírito Santo (RAAD, 2017).

		Alelos												
Loco SRR1		204	206	208	210	212								
<i>M. capixaba</i>		■	■	■										
<i>M. scutellaris</i>			■	■	■	■								
Híbrido			■	■	■									
Loco SSR2		276	278	280	282	284	286	288	290	292	294	296	298	300
<i>M. capixaba</i>		■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>M. scutellaris</i>		■	■		■	■	■	■	■					
Híbrido		■	■				■	■	■					
Loco SSR3		324	326	328	330	332	334	336						
<i>M. capixaba</i>		■	■	■	■	■								
<i>M. scutellaris</i>		■			■	■	■	■						
Híbrido		■		■	■		■							
Loco SSR4		189	191	193	195	197	199	201						
<i>M. capixaba</i>		■	■	■	■	■								
<i>M. scutellaris</i>		■	■	■	■		■	■						
Híbrido		■	■	■	■		■							
Loco SSR5		265	267	269	271	273								
<i>M. capixaba</i>		■	■	■	■	■								
<i>M. scutellaris</i>			■	■	■									
Híbrido		■	■	■										

■ Alelos exclusivos de *M. capixaba*, ■ Alelos comuns, ■ Alelos exclusivos de *M. scutellaris*

O indivíduo Hcs3 (colônia 2), Hcs5 (colônia 3), Hcs11 (colônia 6) e Hcs12 (colônia 7) apresentaram os alelos 328 (amostrado apenas para *M. capixaba*) e 334 (amostrado apenas para

M. scutellaris) (Anexo VI), sugerindo a ocorrência de hibridização entre as espécies. Esses indivíduos foram amostrados na primeira coleta realizada por Raad (2017), o que indica que são da primeira geração de híbridos (F1) e podem ter sido gerados pelo cruzamento de uma rainha *M. scutellaris* com o alelo 334 (a linhagem materna foi confirmada pelo DNA mitocondrial, como evidenciado pela rede de haplótipos e pelas análises realizadas por Raad) e um macho *M. capixaba* com o alelo 328.

Os indivíduos Hcs22 (colônia 3), Hcs25 (colônia 4) e Hcs 30 (colônia 7) também apresentaram os alelos 328 e 334. Estes indivíduos foram coletados na segunda coleta realizada por Raad (2017), compreendendo, portanto, amostras da segunda geração (F2). Desta forma, é possível inferir que estes indivíduos foram gerados a partir do cruzamento de uma fêmea híbrida com o alelo 328 e um macho da espécie *M. scutellaris* ou um macho híbrido com o alelo 334, já que não havia mais indivíduos puros da espécie *M. capixaba*. Estas observações corroboram com as hipóteses de Raad (2017), as fêmeas híbridas são férteis e podem ser fecundadas por machos da espécie *M. scutellaris* ou por machos híbridos.

Os indivíduos Hcs45, Hcs46 e Hcs47, pertencentes a colônia 7, apresentaram o alelo 328 (amostrado apenas para *M. capixaba*). Estes indivíduos foram amostrados na terceira coleta, portanto são amostras da terceira geração (F3). Esta observação também corrobora com as hipóteses de Raad (2017), sugerindo que as fêmeas híbridas são férteis e podem ser fecundadas por machos da espécie *M. scutellaris* ou por machos híbridos, além de mostrar que as fêmeas híbridas podem gerar descendentes férteis.

Diante dos resultados apresentados, a composição genética dos híbridos mostrada no gráfico gerado pelo Structure (Figura 3) pode ser explicada pelo fato da segunda e terceira geração de híbridos terem sido geradas pelo retrocruzamento de rainhas híbridas com machos da espécie *M. scutellaris* ou machos híbridos. Logo, a análise do Structure não evidenciou uma mistura de alelos de ambas espécies para o grupo dos híbridos, pois as novas gerações foram perdendo alelos exclusivos de *M. capixaba* e acumulando alelos de *M. scutellaris*.

Os marcadores microssatélites foram pouco diagnósticos neste estudo, pois este tipo de marcador possui a limitação de distinguir casos de compartilhamento de alelos devido a hibridização ou devido a retenção de polimorfismo ancestral. Além disso, foram utilizados um baixo número de marcadores microssatélites, um maior número de marcadores poderiam mostrar um resultado mais conclusivo. Uma outra forma de resolver este problema na identificação de híbridos entre espécies filogeneticamente próximas é a utilização de análises realizadas através da combinação de marcadores moleculares (ligados e não ligados) com diferentes propriedades mutacionais e demográficas (ex.: microssatélites, DNA mitocondrial,

sequências de autossomos e de cromossomos sexuais), o que permite eliminar as diferentes variáveis que afetam os padrões genéticos devido a proximidade genética das espécies (SCHNEIDER, 2009). Além de utilizar um número amostral significativo para as espécies em estudo.

4.4 Consequências da Hibridização para a Conservação das Espécies *Melipona capixaba* e *Melipona scutellaris*

Melipona capixaba e *M. scutellaris* estão na lista de espécies ameaçadas de extinção na categoria em perigo (BRASIL, 2014). Ambas espécies vivem na Mata Atlântica, um bioma extremamente degradado que conta com poucos remanescentes florestais. Além disso, as espécies sofrem ameaças devido a exploração predatória pelos meliponicultores. A ocorrência de hibridização entre *M. capixaba* e *M. scutellaris* é um desafio a mais pra a conservação destas espécies.

A produção de híbridos estéreis pode ter consequências negativas para as espécies parentais devido à perda de esforços reprodutivos (RHYMER; SIMBERLOFF, 1996). A hibridização pode promover a redução da taxa de crescimento de uma população, o que consequentemente tem efeitos negativos sobre sua eficácia reprodutiva, seu potencial de competição e sua interação com predadores e patógenos (LEVIN; FRANCISCO-ORTEGA; JANSEN, 1996). A hibridização pode acarretar uma menor produção de progênie pura (LEVIN; FRANCISCO-ORTEGA; JANSEN, 1996; RHYMER; SIMBERLOFF, 1996), o que ocasionará a redução do tamanho da população e quanto menor o número de descendentes puros, mais rápida será a extinção da espécie (LEVIN, 2002). Quando os híbridos são férteis, pode ocorrer a introgressão, o que pode levar a formação de uma população composta por indivíduos híbridos, a diluição dos genomas parentais e a extinção genética das espécies parentais (ALLENDORF et al., 2001; ALLENDORF; HOHENLOHE; LUIKART, 2010). Além disso, os híbridos podem competir com as espécies parentais (RHYMER; SIMBERLOFF, 1996). Portanto, os efeitos da hibridização sobre as espécies dependem da viabilidade e da adaptação dos híbridos.

A hibridização pode ser vista como um mecanismo evolutivo com importante papel na especiação e adaptação das espécies, entretanto para as espécies endêmicas e raras a hibridização é especialmente prejudicial, pois existe uma alta probabilidade de mistura completa dos genes (LEVIN; FRANCISCO-ORTEGA; JANSEN, 1996; RHYMER; SIMBERLOFF, 1996; WOLF; TAKEBAYASHI; RIESEBERG, 2001).

No trabalho realizado por Raad (2017), colônias híbridas foram monitoradas durante três gerações e foi constatado que, mesmo sob os cuidados de um criador, as abelhas híbridas apresentaram baixa taxa de sobrevivência em comparação às colônias de *M. scutellaris* mantidas no mesmo meliponário. Além disso, observou-se a descaracterização do ninho das colônias híbridas e uma alta taxa de mortalidade das larvas/pupas. Apesar disso, algumas colônias se mantiveram funcionais por mais de um ano e após sucessivas substituições da rainha. Raad (2017) não amostrou machos híbridos, mas os resultados encontrados em suas análises e neste trabalho indicam que os machos híbridos podem ser viáveis e férteis. O autor também sugeriu que as rainhas híbridas podem apresentar comportamento parasítico semelhante aos de rainhas de *M. scutellaris*. Ainda não foi observado o potencial adaptativo de colônias híbridas no ambiente natural de *M. capixaba*, sendo assim efeitos para a espécie são imprevisíveis. Casos os híbridos sejam mais aptos e ocupem a mesmo habitat e nicho da *M. capixaba*, a competição pode ocasionar a extinção da espécie e sua substituição pelos descendentes híbridos. Mesmos que os híbridos sejam menos aptos que a espécie *M. capixaba*, uma única colônia híbrida que substituir uma colônia de *M. capixaba* significa uma perda para espécie devido ao seu reduzido número populacional (RESENDE, 2012).

Como as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* são alopátricas, o contato entre elas pode ocorrer somente por meio da ação antrópica, sendo assim a melhor estratégia é impedir que colônias de *M. scutellaris* sejam introduzidas na área ou próximo às áreas de distribuição natural da espécie. Os resultados encontrados para o caso de hibridização no estado de São Paulo (RESENDE 2012), mostraram que fêmeas da espécie *M. capixaba*, podem ser fecundadas por macho da espécie *M. scutellaris*. Já os resultados encontrados para os híbridos do Estado do Espírito Santo (RAAD, 2017) mostraram que fêmeas da espécie *M. scutellaris* podem ser fecundadas por machos da espécie *M. capixaba* e que fêmeas híbridas são férteis, geram descendentes férteis e podem ser fecundadas por machos híbridos ou da espécie *M. scutellaris*.

5. CONCLUSÕES

A identificação de indivíduos híbridos entre as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* não foi uma tarefa fácil, pois as espécies são filogeneticamente próximas e apresentam muitas semelhanças em seus genomas, o que pode ser explicado devido a retenção de polimorfismo ancestral. Análises moleculares com diferentes tipos de marcadores combinadas com as análises morfológicas permitiram detectar a ocorrência de hibridização e identificar as possíveis vias de hibridização entre as espécies.

Ficou evidenciado que a hibridização pode ocorrer tanto através da fecundação de uma rainha da espécie *M. capixaba* por um macho da espécie *M. scutellaris*, quanto uma rainha de *M. scutellaris* pode ser fecundada por um macho de *M. capixaba*. Além disso, as fêmeas híbridas são férteis, podem ser fecundadas por machos da espécie *M. scutellaris* ou por machos híbridos e geram descendentes férteis.

Considerando a falta de conhecimento sobre os efeitos da hibridização para a *M. capixaba* e o *status* de conservação da espécie recomenda-se que colônias de *M. scutellaris* não sejam instaladas dentro ou próximo à área de ocorrência de *M. capixaba*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLENDORF, F. W. et al. The problems with hybrids: Setting conservation guidelines. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 16, n. 11, p. 613–622, 2001.
- ALLENDORF, F. W.; HOHENLOHE, P. A.; LUIKART, G. Genomics and the future of conservation genetics. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 10, p. 697–709, 2010.
- ALVES, R. M. O. et al. Areas of natural occurrence of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) in the state of Bahia, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 3, p. 679–688, 2012.
- BANDELT, H.J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. **Molecular Biology**, v. 16, n. 1, p. 37–48, 1999.
- BEAUMONT, M. et al. Genetic diversity and introgression in the Scottish wildcat. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 2, p. 319–336, 2001.
- BRASIL. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçada de Extinção. Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014. Ministério do Meio Ambiente. **Diário Oficial da União**, v. 245, n. 1, p. 121–126, 2014.
- COYNE, J.A. & Orr, H. A. 2004. **Speciation**. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- DUBUT, V. et al. Cross-species amplification of 41 microsatellites in European cyprinids: A tool for evolutionary, population genetics and hybridization studies. **BMC Research Notes**, v. 3, 2010.
- ENDLER, J. The Place of Hybridization in Evolution. **Evolution**, v. 52, n. 2, p. 640–644, 1998.
- HANSEN, M. M. et al. Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). **Molecular Ecology**, v. 9, n. 5, p. 583–594, 2000.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. Abelha Uruçu: Biologia, Manejo E Conservação. p. 157, 1996.
- KHOSRAVI, R.; REZAEI, H. R.; KABOLI, M. Detecting Hybridization between Iranian Wild Wolf (*Canis Lupus Pallipes*) and Free-Ranging Domestic Dog (*Canis Familiaris*) by Analysis of Microsatellite Markers. **Zoological Science**, v. 30, n. 1, p. 27–34, 2013.
- LEVIN, D. A. Hybridization and extinction: in protecting rare species, conservationists should consider the dangers of interbreeding, which compound the more well-known threats to wildlife. **Am. Sci.**, v. 90, n. May, p. 254–261, 2002.
- LEVIN, D. A.; FRANCISCO-ORTEGA, J.; JANSEN, R. K. Society for Conservation Biology Hybridization and the Extinction of Rare Plant Species. v. 10, n. 1, p. 10–16, 1996.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451–1452, 2009.
- MALLET, J. Hybridization as an invasion of the genome. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, n. 5, p. 229–237, 2005.
- MELO, G. A. R. Notes on the nesting biology of *Melipona capixaba* (Hymenoptera, Apidae). **Jornal of the Kansas Entomological Society**, v. 69, n. 2, p. 207–210, 1996. MOURE, J. S.; CAMARGO, J. M. F. *Melipona* (*Michmelia*) *capixaba*, uma nova espécie de Meliponinae

- (Hymenoptera, Apidae) do Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 11, n. 2, p. 289–296, 1994.
- NASCIMENTO, V. A.; MATUSITA, S. H.; KERR, W. E. Evidence of hybridization between two species of *Melipona* bees. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 79–81, 2000.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537–2539, 2012.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population Structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, 2000.
- RAAD, L. P. **Importância Genética de populações manejadas para a conservação de *Melipona capixaba* Moure & Camargo, 1994 e as consequências da hibridização com *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae)**. 2017. 60f. Dissertação (Mestrado em Entomologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.
- RANDI, E.; LUCCHINI, V. Detecting rare introgression of domestic dog genes into wild wolf (*Canis lupus*) populations by Bayesian admixture analyses of microsatellite variation. **Conservation Genetics**, v. 3, n. 1, p. 29–43, 2002.
- RAZA, S.; SHOAIB, M. W.; MUBEEN, H. Genetic Markers: Importance, uses and applications. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 6, n. 3, p. 221–2250, 2016.
- RESENDE, H. C. **Filogeografia e conservação de *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994 e *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, e biogeografia do gênero *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera: Apidae)**. 2012. 155f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.
- RESENDE, H. C. et al. Geographic distribution, key challenges, and prospects for the conservation of threatened stingless bee *Melipona capixaba* Moure and Camargo (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 529–535, 2014.
- RHYMER, J. M.; SIMBERLOFF, D. Extinction By Hybridization and Introgression. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 27, n. 1, p. 83–109, 1996.
- SCHLOTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, v. 109, n. 6, p. 365–371, 2000.
- SERRA, B. D. V. **Preservação de *Melipona capixaba* Moure & Camargo, 1994 (Hymenoptera: Apidae): aspectos biológicos e ecológicos**. 2012. 121f. Tese (Doutorado em entomologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.
- SCHNEIDER, A. **Caracterização de uma zona híbrida entre dois felídeos neotropicais utilizando múltiplos locos nucleares**. 2009. 71 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Zoologia). PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL, Porto Alegre, 2009.
- VILÀ, M.; WEBER, E.; ANTONIO, C. M. D. Conservation implications of invasion by plant hybridization. **Biological Invasions**, v. 2, n. 3, p. 207–217, 2000.
- WENDT, T. et al. Recognition of *Pitcairnia corcovadensis* (Bromeliaceae) at the species level. **Systematic Botany**, v. 25, p. 389–398, 2000.
- WOLF, D. E.; TAKEBAYASHI, N.; RIESEBERG, L. H. Predicting the risk of extinction through hybridization. **Conservation Biology**, v. 15, n. 4, p. 1039–1053, 2001.

CONCLUSÕES GERAIS

- A maioria das colônias remanescentes de *M. capixaba* amostradas estão em posse de meliponicultores. Os planos de manejo e conservação da espécie e os órgãos de controle e fiscalização devem levar em consideração esse fato, pois estas colônias abrigam indivíduos que podem compor populações de conservação, auxiliando na preservação da espécie e de sua diversidade genética.
- A hibridização é um fato confirmado para as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris*, sendo que os híbridos produzidos são férteis e podem produzir descendentes férteis. As consequências da hibridização não são conhecidas, mas esta representa uma ameaça para a conservação da *M. capixaba*, pois provavelmente terá efeitos negativos para a espécie. Desta forma, deve-se evitar a introdução de *M. scutellaris* na área de ocorrência natural de *M. capixaba*.
- Análises nucleares, realizadas por meio de marcadores microssatélite, combinadas com análises mitocondriais permitem identificar a ocorrência de hibridização e inferir as possíveis vias de hibridização entre as espécies.

ANEXOS

Anexo I – Tamanho em pares de bases (pb) dos alelos e genótipos formados para cada indivíduo amostrado na natureza (população nativa - N) e nos meliponários (M).

ID	Amostra (Voucher)	Loco									
		SSR1		SSR2		SSR3		SSR4		SSR5	
N1	M.cap3-1	208	208	294	300	328	332	195	197	269	271
	M.cap4-1	206	208	282	298	324	328	191	193	267	269
N2	M.cap4-2	206	208	282	300	332	332	193	197	265	269
	M.cap4-3	206	208	282	282	332	332	191	193	265	267
N3	Mcap28	206	208	282	296	332	332	191	193	265	269
N4	Mcap43-3	206	208	282	284	324	332	193	197	267	269
N5	Mcap60	204	206	282	282	332	332	191	193	267	269
N6	Mcap67-3	206	208	282	294	324	328	193	195	265	271
N7	Mcap69	206	208	286	288	332	332	195	197	267	269
N8	Mcap70-1	206	208	286	288	332	332	195	197	267	269
	Mcap70-2	206	208	286	288	332	332	195	197	267	269
	Mcap70-3	204	206	288	298	332	332	189	191	267	269
N9	Mcap74	204	206	284	286	324	332	193	195	267	269
N10	Mcap75	206	208	282	286	324	332	191	193	269	273
N11	Mcap76	206	208	282	286	324	332	193	197	267	269
N12	Mcap83	206	208	282	286	328	332	193	197	267	269
N13	Mcap91-1	206	208	284	284	332	332	191	193	267	269
	Mcap91-2	206	208	296	296	328	332	193	197	265	269
N14	Mcap92	206	208	284	288	328	332	193	197	267	269
N15	Mcap93	206	208	282	298	328	332	193	197	269	273
N16	Mcap94	206	208	282	298	324	332	191	193	269	273
N17	Mcap95	206	208	280	284	324	332	195	197	265	269
N18	Mcap98	208	208	282	300	324	326	193	197	265	269
N19	B01	206	208	282	298	332	332	195	197	267	269
N20	B05	206	208	282	286	332	332	195	197	269	269
N21	B07	206	208	280	298	326	332	193	197	265	269
N22	B09	206	208	280	298	332	332	197	197	267	269
N23	B10	206	208	276	290	330	330	189	191	267	269
N24	B12	206	208	286	290	324	330	189	191	267	267
N25	B14	206	208	280	282	324	330	195	197	267	269
M1	Mcap90-1	206	208	288	300	332	332	193	195	269	269
	Mcap90-2	206	208	286	294	324	330	193	197	267	269
	Mcap90-3	204	206	288	294	328	332	193	195	267	269
	Mcap90-4	206	206	282	300	326	332	195	197	265	265
	Mcap90-5	206	206	286	286	326	332	193	197	265	267
	Mcap90-7	206	208	282	300	324	330	193	197	269	269
	Mcap90-8	206	208	282	300	324	326	193	197	265	271
	Mcap90-9	206	208	282	300	330	330	195	197	267	269

	Mcap90-10	206	208	288	300	324	326	195	197	269	271
	Mcap90-11	206	208	282	282	332	332	195	197	269	271
	Mcap90-12	206	208	286	288	330	330	191	193	267	269
	Mcap90-13	206	208	282	300	324	332	193	197	265	271
	Mcap90-14	206	208	282	288	332	332	195	197	265	269
	Mcap90-15	206	208	280	282	326	332	193	197	269	269
M2	Mcap80-1	206	208	284	298	326	332	195	197	269	271
	Mcap80-2	204	206	282	288	330	330	193	195	267	269
	Mcap80-3	206	208	282	296	332	332	193	197	267	269
	Mcap80-4	206	208	282	296	324	330	193	197	267	269
	Mcap80-5	204	206	296	298	324	330	193	197	265	271
	Mcap80-6	206	208	282	288	332	332	193	195	265	269
	Mcap80-7	206	208	288	296	330	330	193	197	267	269
	Mcap80-8	206	208	282	298	328	332	195	197	269	271
	Mcap80-9	206	208	280	282	332	332	191	193	269	273
	Mcap80-10	206	208	276	276	332	332	195	197	267	269
	Mcap80-11	206	208	282	288	332	332	193	195	265	271
	Mcap80-12	208	208	288	288	324	324	193	197	265	269
	Mcap80-13	206	208	282	286	324	328	193	197	265	269
M3	Mcap61-1	206	208	292	294	328	328	193	197	265	269
	Mcap61-2	206	206	282	298	324	332	195	197	265	269
	Mcap61-3	206	208	294	300	328	328	193	197	267	269
	Mcap61-4	206	208	282	300	324	328	193	195	267	269
	Mcap61-5	206	208	288	298	324	324	193	197	267	269
	Mcap61-7	204	206	286	294	332	332	193	197	265	269
	Mcap61-8	206	208	282	300	324	332	193	195	267	269
	Mcap61-9	206	208	286	294	324	328	195	197	267	269
	Mcap61-10	206	208	284	288	324	324	193	197	267	269
	Mcap61-11	206	206	282	300	332	332	191	197	269	269
	Mcap61-12	206	208	298	300	332	332	195	197	267	269
	Mcap61-13	206	208	294	296	324	332	195	197	267	269
	Mcap61-14	204	206	282	294	326	328	191	193	267	269
	Mcap61-15	206	206	288	294	324	328	191	193	267	269
	Mcap61-16	204	206	282	282	328	332	195	197	267	269
	Mcap61-17	206	208	286	294	324	326	193	197	269	269
	Mcap61-18	206	208	282	296	328	328	193	197	265	269
	Mcap61-19	206	208	282	282	332	332	191	197	265	269
	Mcap61-20	206	206	282	282	324	332	191	193	267	269
	Mcap61-21	206	206	282	286	332	332	195	197	267	269
	Mcap61-22	208	208	282	296	328	330	193	193	267	269
	Mcap61-23	208	208	282	296	328	332	191	193	267	269
	Mcap61-24	204	208	294	300	324	328	195	197	267	269
	M4	Mcap5-1	206	208	282	296	326	328	193	197	265

	Mcap5-2	206	208	288	288	324	326	191	195	269	269
	Mcap5-3	206	206	294	294	324	324	191	197	265	269
	Mcap5-4	206	206	282	282	324	324	191	193	265	269
	Mcap5-5	206	206	284	294	328	328	193	197	269	271
	Mcap5-6	206	206	282	288	324	324	193	195	267	269
	Mcap5-7	206	208	282	288	324	324	191	195	269	269
	Mcap5-8	206	208	286	294	328	328	191	193	269	269
	Mcap5-9	206	206	288	300	324	324	191	193	269	269
	Mcap5-10	206	208	280	300	332	332	191	195	267	269
	Mcap5-11	206	208	282	294	332	332	193	195	265	269
	Mcap5-12	206	208	286	300	324	324	189	191	265	269
	Mcap5-13	206	208	282	294	332	332	191	193	265	269
M5	Mcap64-1	206	208	282	288	324	328	191	193	267	271
	Mcap64-2	206	208	282	288	324	328	193	195	269	273
	Mcap64-3	206	208	282	300	324	328	195	197	267	269
	Mcap64-4	206	206	280	282	324	328	193	195	267	267
	Mcap64-5	206	208	282	286	328	330	195	197	265	269
	Mcap64-6	206	208	282	286	328	332	191	193	265	271
	Mcap64-7	206	208	282	284	326	326	191	193	267	269
	Mcap64-8	206	208	284	298	324	326	191	197	265	269
	Mcap64-9	206	206	282	298	324	328	195	197	265	269
	Mcap64-10	206	208	286	288	332	332	193	197	265	269
	Mcap64-12	206	208	280	282	328	328	195	197	265	269
	Mcap64-13	206	208	284	286	328	332	195	197	269	269
	Mcap64-14	206	208	282	298	328	328	191	193	267	269
	Mcap64-15	206	208	280	282	328	328	195	197	267	269
	Mcap64-16	206	208	282	286	326	332	193	197	265	269
	M6	Mcap86-1	206	208	282	284	328	328	193	197	265
Mcap86-3		206	208	282	286	324	332	193	197	269	269
Mcap86-4		206	208	282	286	324	324	193	195	269	269
Mcap86-5		206	208	286	286	332	332	193	197	269	269
Mcap86-6		206	208	282	282	328	332	193	195	269	269
Mcap86-7		206	208	282	282	328	332	191	193	265	269
Mcap86-8		206	208	282	286	324	328	191	193	265	269
Mcap86-10		206	208	282	300	324	324	195	197	267	269
Mcap86-11		206	208	276	280	324	330	191	193	265	269
Mcap86-12		206	208	282	300	328	328	191	193	265	267
Mcap86-13		206	208	282	286	324	332	191	193	265	269
Mcap86-14		206	206	284	284	332	332	193	195	265	269
Mcap86-15		208	208	286	300	328	330	191	193	265	269

N: amostras da natureza; M1: Meliponário 1; M2: Meliponário 2; M3: Meliponário 3; M4: Meliponário 4; M5: Meliponário 5; M6: Meliponário 6.

ANEXO II – Estimativas de diversidade genética para cada loco por população.

Pop.	Loco	N	Na	Ne	Ho	He	F	<i>EHW</i> (<i>P</i> -valor)
Nativa	SSR1	30	3,000	2,203	0,933	0,546	-0,709	0,0000*
	SSR2	30	11,000	6,452	0,867	0,845	-0,026	0,1285 ^{ns}
	SSR3	30	5,000	2,423	0,567	0,587	0,035	0,0778 ^{ns}
	SSR4	30	5,000	4,027	0,967	0,752	-0,286	0,0000*
	SSR5	30	5,000	2,946	0,933	0,661	-0,413	0,0013*
	Total	-	30	-	-	-	-	-
	Média	-	5,800	3,610	0,853	0,678	-0,280	-
M1	SSR1	14	3,000	2,074	0,857	0,518	-0,655	0,0216*
	SSR2	14	6,000	4,455	0,857	0,776	-0,105	0,1448 ^{ns}
	SSR3	14	5,000	3,769	0,643	0,735	0,125	0,0919 ^{ns}
	SSR4	14	4,000	3,111	1,000	0,679	-0,474	0,0725 ^{ns}
	SSR5	14	4,000	3,187	0,714	0,686	-0,041	0,5641 ^{ns}
	Total	-	22	-	-	-	-	-
	Média	-	4,400	3,319	0,814	0,679	-0,230	-
M2	SSR1	13	3,000	2,315	0,923	0,568	-0,625	0,0180*
	SSR2	13	8,000	5,121	0,846	0,805	-0,051	0,4840 ^{ns}
	SSR3	13	5,000	3,219	0,385	0,689	0,442	0,0053*
	SSR4	13	4,000	3,101	1,000	0,678	-0,476	0,1426 ^{ns}
	SSR5	13	5,000	3,596	1,000	0,722	-0,385	0,1383 ^{ns}
	Total	-	25	-	-	-	-	-
	Média	-	5,000	3,470	0,831	0,692	-0,219	-
M3	SSR1	23	3,000	2,275	0,696	0,560	-0,241	0,5361 ^{ns}
	SSR2	23	9,000	5,371	0,870	0,814	-0,069	0,3139 ^{ns}
	SSR3	23	5,000	3,380	0,565	0,704	0,197	0,3186 ^{ns}
	SSR4	23	4,000	3,538	0,957	0,717	-0,333	0,0390*
	SSR5	23	3,000	2,336	0,913	0,572	-0,597	0,0003*
	Total	-	24	-	-	-	-	-
	Média	-	4,800	3,380	0,800	0,674	-0,208	-
M4	SSR1	13	2,000	1,742	0,615	0,426	-0,444	0,2438 ^{ns}
	SSR2	13	8,000	5,365	0,769	0,814	0,055	0,5226 ^{ns}
	SSR3	13	4,000	2,889	0,154	0,654	0,765	0,0000*
	SSR4	13	5,000	3,756	1,000	0,734	-0,363	0,5543 ^{ns}
	SSR5	13	4,000	2,181	0,615	0,541	-0,137	1,0000 ^{ns}
	Total	-	23	-	-	-	-	-
	Média	-	4,600	3,186	0,631	0,634	-0,025	-
M5	SSR1	15	2,000	1,965	0,867	0,491	-0,765	0,0075*
	SSR2	15	7,000	4,369	1,000	0,771	-0,297	0,7429 ^{ns}
	SSR3	15	5,000	3,285	0,667	0,696	0,042	0,1842 ^{ns}
	SSR4	15	4,000	3,846	1,000	0,740	-0,351	0,0366*
	SSR5	15	5,000	3,309	0,867	0,698	-0,242	0,1433 ^{ns}
	Total	-	23	-	-	-	-	-
	Média	-	4,600	3,355	0,880	0,679	-0,323	-

M6	SSR1	13	2,000	2,000	0,846	0,500	-0,692	0,0338*
	SSR2	13	6,000	3,558	0,692	0,719	0,037	0,2715 ^{ns}
	SSR3	13	4,000	3,449	0,538	0,710	0,242	0,5347 ^{ns}
	SSR4	13	4,000	3,189	1,000	0,686	-0,457	0,0552 ^{ns}
	SSR5	13	3,000	2,086	0,692	0,521	-0,330	0,4268 ^{ns}
	Total	-	19	-	-	-	-	-
	Média	-	3,800	2,856	0,754	0,627	-0,240	-

Nativa: população nativa; M1: Meliponário 1; M2: Meliponário 2; M3: Meliponário 3; M4: Meliponário 4; M5: Meliponário 5; M6: Meliponário 6. N: Número de indivíduos analisados; N_a : Número de alelos por loco; N_e : Número de alelos efetivo por loco; H_o : Heterozigosidade observada; H_e : Heterozigosidade esperada; F : Índice de Fixação; EHW : P valor Equilíbrio de Hardy-Weinberg, valores de P obtidos no teste exato de Equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada loco por população. Ns= não significativo, * $P < 0,05$.

Anexo III – Alelos em pares de bases (pb) e genótipos das amostras *M. capixaba* e *M. scutellaris* analisadas para verificar a ocorrência de hibridização entre as espécies.

ID	Amostra (Voucher)	Loco									
		SSR1		SSR2		SSR3		SSR4		SSR5	
Mcap1	M.cap3-1	208	208	294	300	328	332	195	197	269	271
Mcap2	M.cap4-1	206	208	282	298	324	328	191	193	267	269
Mcap3	M.cap4-2	206	208	282	300	332	332	193	197	265	269
Mcap4	M.cap4-3	206	208	282	282	332	332	191	193	265	267
Mcap5	Mcap98	208	208	282	300	324	326	193	197	265	269
Mcap6	Mcap74	204	206	284	286	324	332	193	195	267	269
Mcap7	Mcap75	206	208	282	286	324	332	191	193	269	273
Mcap8	Mcap76	206	208	282	286	324	332	193	197	267	269
Mcap9	Mcap60	204	206	282	282	332	332	191	193	267	269
Mcap10	Mcap28	206	208	282	296	332	332	191	193	265	269
Mcap11	Mcap43-3	206	208	282	284	324	332	193	197	267	269
Mcap12	Mcap67-3	206	208	282	294	324	328	193	195	265	271
Mcap13	Mcap69	206	208	286	288	332	332	195	197	267	269
Mcap14	Mcap70-1	206	208	286	288	332	332	195	197	267	269
Mcap15	Mcap70-2	206	208	286	288	332	332	195	197	267	269
Mcap16	Mcap70-3	204	206	288	298	332	332	189	191	267	269
Mcap17	Mcap83	206	208	282	286	328	332	193	197	267	269
Mcap18	Mcap91-1	206	208	284	284	332	332	191	193	267	269
Mcap19	Mcap91-2	206	208	296	296	328	332	193	197	265	269
Mcap20	Mcap92	206	208	284	288	328	332	193	197	267	269
Mcap21	Mcap93	206	208	282	298	328	332	193	197	269	273
Mcap22	Mcap94	206	208	282	298	324	332	191	193	269	273
Mcap23	Mcap95	206	208	280	284	324	332	195	197	265	269
Mcap24	B01	206	208	282	298	332	332	195	197	267	269
Mcap25	B05	206	208	282	286	332	332	195	197	269	269
Mcap26	B07	206	208	280	298	326	332	193	197	265	269
Mcap27	B09	206	208	280	298	332	332	197	197	267	269
Mcap28	B10	206	208	276	290	330	330	189	191	267	269
Mcap29	B12	206	208	286	290	324	330	189	191	267	267
Mcap30	B14	206	208	280	282	324	330	195	197	267	269
Mcap31	Mcap5-1	206	208	282	296	326	328	193	197	265	265
Mcap32	Mcap5-2	206	208	288	288	324	326	191	195	269	269
Mcap33	Mcap5-3	206	206	294	294	324	324	191	197	265	269
Mcap34	Mcap5-4	206	206	282	282	324	324	191	193	265	269
Mcap35	Mcap5-5	206	206	284	294	328	328	193	197	269	271
Mcap36	Mcap5-6	206	206	282	288	324	324	193	195	267	269
Mcap37	Mcap5-7	206	208	282	288	324	324	191	195	269	269
Mcap38	Mcap5-8	206	208	286	294	328	328	191	193	269	269
Mcap39	Mcap5-9	206	206	288	300	324	324	191	193	269	269
Mcap40	Mcap5-10	206	208	280	300	332	332	191	195	267	269
Mcap41	Mcap5-11	206	208	282	294	332	332	193	195	265	269

Mcap42	Mcap5-12	206	208	286	300	324	324	189	191	265	269
Mcap43	Mcap5-13	206	208	282	294	332	332	191	193	265	269
Mcap44	Mcap61-1	206	208	292	294	328	328	193	197	265	269
Mcap45	Mcap61-2	206	206	282	298	324	332	195	197	265	269
Mcap46	Mcap61-3	206	208	294	300	328	328	193	197	267	269
Mcap47	Mcap61-4	206	208	282	300	324	328	193	195	267	269
Mcap48	Mcap61-5	206	208	288	298	324	324	193	197	267	269
Mcap49	Mcap61-7	204	206	286	294	332	332	193	197	265	269
Mcap50	Mcap61-8	206	208	282	300	324	332	193	195	267	269
Mcap51	Mcap61-9	206	208	286	294	324	328	195	197	267	269
Mcap52	Mcap61-10	206	208	284	288	324	324	193	197	267	269
Mcap53	Mcap61-11	206	206	282	300	332	332	191	197	269	269
Mcap54	Mcap61-12	206	208	298	300	332	332	195	197	267	269
Mcap55	Mcap61-13	206	208	294	296	324	332	195	197	267	269
Mcap56	Mcap61-14	204	206	282	294	326	328	191	193	267	269
Mcap57	Mcap61-15	206	206	288	294	324	328	191	193	267	269
Mcap58	Mcap61-16	204	206	282	282	328	332	195	197	267	269
Mcap59	Mcap61-17	206	208	286	294	324	326	193	197	269	269
Mcap60	Mcap61-18	206	208	282	296	328	328	193	197	265	269
Mcap61	Mcap61-19	206	208	282	282	332	332	191	197	265	269
Mcap62	Mcap61-20	206	206	282	282	324	332	191	193	267	269
Mcap63	Mcap61-21	206	206	282	286	332	332	195	197	267	269
Mcap64	Mcap61-22	208	208	282	296	328	330	193	193	267	269
Mcap65	Mcap61-23	208	208	282	296	328	332	191	193	267	269
Mcap66	Mcap61-24	204	208	294	300	324	328	195	197	267	269
Mcap67	Mcap64-1	206	208	282	288	324	328	191	193	267	271
Mcap68	Mcap64-2	206	208	282	288	324	328	193	195	269	273
Mcap69	Mcap64-3	206	208	282	300	324	328	195	197	267	269
Mcap70	Mcap64-4	206	206	280	282	324	328	193	195	267	267
Mcap71	Mcap64-5	206	208	282	286	328	330	195	197	265	269
Mcap72	Mcap64-6	206	208	282	286	328	332	191	193	265	271
Mcap73	Mcap64-7	206	208	282	284	326	326	191	193	267	269
Mcap74	Mcap64-8	206	208	284	298	324	326	191	197	265	269
Mcap75	Mcap64-9	206	206	282	298	324	328	195	197	265	269
Mcap76	Mcap64-10	206	208	286	288	332	332	193	197	265	269
Mcap77	Mcap64-12	206	208	280	282	328	328	195	197	265	269
Mcap78	Mcap64-13	206	208	284	286	328	332	195	197	269	269
Mcap79	Mcap64-14	206	208	282	298	328	328	191	193	267	269
Mcap80	Mcap64-15	206	208	280	282	328	328	195	197	267	269
Mcap81	Mcap64-16	206	208	282	286	326	332	193	197	265	269
Mcap82	Mcap80-1	206	208	284	298	326	332	195	197	269	271
Mcap83	Mcap80-2	204	206	282	288	330	330	193	195	267	269
Mcap84	Mcap80-3	206	208	282	296	332	332	193	197	267	269
Mcap85	Mcap80-4	206	208	282	296	324	330	193	197	267	269
Mcap86	Mcap80-5	204	206	296	298	324	330	193	197	265	271

Mcap87	Mcap80-6	206	208	282	288	332	332	193	195	265	269
Mcap88	Mcap80-7	206	208	288	296	330	330	193	197	267	269
Mcap89	Mcap80-8	206	208	282	298	328	332	195	197	269	271
Mcap90	Mcap80-9	206	208	280	282	332	332	191	193	269	273
Mcap91	Mcap80-10	206	208	276	276	332	332	195	197	267	269
Mcap92	Mcap80-11	206	208	282	288	332	332	193	195	265	271
Mcap93	Mcap80-12	208	208	288	288	324	324	193	197	265	269
Mcap94	Mcap80-13	206	208	282	286	324	328	193	197	265	269
Mcap95	Mcap86-1	206	208	282	284	328	328	193	197	265	269
Mcap96	Mcap86-3	206	208	282	286	324	332	193	197	269	269
Mcap97	Mcap86-4	206	208	282	286	324	324	193	195	269	269
Mcap98	Mcap86-5	206	208	286	286	332	332	193	197	269	269
Mcap99	Mcap86-6	206	208	282	282	328	332	193	195	269	269
Mcap100	Mcap86-7	206	208	282	282	328	332	191	193	265	269
Mcap101	Mcap86-8	206	208	282	286	324	328	191	193	265	269
Mcap102	Mcap86-10	206	208	282	300	324	324	195	197	267	269
Mcap103	Mcap86-11	206	208	276	280	324	330	191	193	265	269
Mcap104	Mcap86-12	206	208	282	300	328	328	191	193	265	267
Mcap105	Mcap86-13	206	208	282	286	324	332	191	193	265	269
Mcap106	Mcap86-14	206	206	284	284	332	332	193	195	265	269
Mcap107	Mcap86-15	208	208	286	300	328	330	191	193	265	269
Mcap108	Mcap90-1	206	208	288	300	332	332	193	195	269	269
Mcap109	Mcap90-2	206	208	286	294	324	330	193	197	267	269
Mcap110	Mcap90-3	204	206	288	294	328	332	193	195	267	269
Mcap111	Mcap90-4	206	206	282	300	326	332	195	197	265	265
Mcap112	Mcap90-5	206	206	286	286	326	332	193	197	265	267
Mcap113	Mcap90-7	206	208	282	300	324	330	193	197	269	269
Mcap114	Mcap90-8	206	208	282	300	324	326	193	197	265	271
Mcap115	Mcap90-9	206	208	282	300	330	330	195	197	267	269
Mcap116	Mcap90-10	206	208	288	300	324	326	195	197	269	271
Mcap117	Mcap90-11	206	208	282	282	332	332	195	197	269	271
Mcap118	Mcap90-12	206	208	286	288	330	330	191	193	267	269
Mcap119	Mcap90-13	206	208	282	300	324	332	193	197	265	271
Mcap120	Mcap90-14	206	208	282	288	332	332	195	197	265	269
Mcap121	Mcap90-15	206	208	280	282	326	332	193	197	269	269
Mscu1	Mscu4-1	206	212	276	290	324	330	189	191	269	271
Mscu2	Mscu5-1	206	208	282	284	332	336	191	193	269	269
Mscu3	Mscu17-2	208	210	286	290	334	334	193	201	269	269
Mscu4	Mscu28-1	208	208	286	288	334	334	191	199	269	269
Mscu5	Mscu51-1	210	210	286	290	324	330	191	195	271	271
Mscu6	Mscu61-1	206	206	276	278	332	332	193	195	269	269
Mscu7	Mscu63-1	210	212	276	278	324	324	189	191	267	267
Mscu8	Mscu69-2	210	212	276	278	324	330	189	191	267	269

Anexo IV – Alelos em pares de bases (pb) e genótipos das amostras dos indivíduos híbridos oriundos do estado de São Paulo (RESENDE, 2012).

Amostra (Voucher)	Loco									
	SSR1		SSR2		SSR3		SSR4		SSR5	
HYBRID1	206	208	278	288	324	328	191	193	265	269
HYBRID2	206	212	276	278	324	328	189	191	267	269
HYBRID3	206	208	278	288	324	328	191	193	265	269
HYBRID4	206	208	276	288	324	328	191	193	265	267
HYBRID5	206	212	276	288	324	330	189	191	267	269
HYBRID6	206	212	276	280	324	324	191	195	267	269
HYBRID7	208	210	276	278	324	324	191	195	267	269
HYBRID8	206	210	276	280	324	324	191	195	267	269
HYBRID9	206	208	276	278	324	330	191	195	267	269
HYBRID10	206	212	276	278	324	324	191	195	267	269
HYBRID11	208	210	276	280	324	330	191	195	267	269
HYBRID12	208	210	276	280	324	330	191	195	267	269
HYBRID13	208	210	276	278	324	330	191	195	267	269

ANEXO V – Frequências alélicas dos alelos amostrados para *M. capixaba*, *M. scutellaris* e híbridos oriundos do estado de São Paulo (RESENDE, 2012).

Loco	Alelos	<i>M. capixaba</i>	<i>M. scutellaris</i>	Híbridos (Resende, 2012)
SSR1	204	0,041	0,000	0,000
	206	0,533	0,250	0,346
	208	0,426	0,250	0,308
	210	0,000	0,313	0,192
	212	0,000	0,188	0,154
SSR2	276	0,017	0,250	0,423
	278	0,000	0,188	0,269
	280	0,045	0,000	0,154
	282	0,331	0,063	0,000
	284	0,062	0,063	0,000
	286	0,132	0,188	0,000
	288	0,112	0,063	0,154
	290	0,008	0,188	0,000
	292	0,004	0,000	0,000
	294	0,079	0,000	0,000
	296	0,050	0,000	0,000
	298	0,066	0,000	0,000
300	0,095	0,000	0,000	
SSR3	324	0,252	0,313	0,654
	326	0,066	0,000	0,000
	328	0,211	0,000	0,154
	330	0,083	0,188	0,192
	332	0,388	0,188	0,000
	334	0,000	0,250	0,000
	336	0,000	0,063	0,000
SSR4	189	0,017	0,188	0,077
	191	0,157	0,375	0,500
	193	0,331	0,188	0,115
	195	0,202	0,125	0,308
	197	0,293	0,000	0,000
	199	0,000	0,063	0,000
	201	0,000	0,063	0,000
SSR5	265	0,190	0,000	0,115
	267	0,231	0,188	0,423
	269	0,504	0,625	0,462
	271	0,054	0,188	0,000
	273	0,021	0,000	0,000

Anexo VI – Alelos em pares (pb) e genótipos das amostras dos indivíduos híbridos oriundos do estado do Espírito Santo (RAAD, 2017).

Amostra	Colônia	Loco									
		SSR1		SSR2		SSR3		SSR4		SSR5	
Hcs1	Colônia1	206	208	278	290	330	334	189	191	265	267
Hcs2		206	208	276	290	330	334	189	191	265	267
Hcs18		206	208	278	290	330	330	189	191	265	267
Hcs19		206	208	276	290	330	334	189	191	265	267
Hcs20		206	208	276	290	330	334	189	191	267	267
Hcs37		206	208	278	290	330	334	189	191	265	267
Hcs38		206	210	276	290	330	334	189	191	265	267
Hcs39		206	210	276	290	330	334	189	191	265	267
Hcs3	Colônia2	208	210	290	290	328	334	189	191	267	269
Hcs4	Colônia3	206	210	278	290	324	334	189	191	265	267
Hcs5		206	208	276	276	328	334	189	191	265	267
Hcs21		0	0	0	0	0	0	0	0	265	267
Hcs22		206	208	276	290	328	334	189	191	265	267
Hcs23		206	208	276	278	324	330	193	195	265	267
Hcs40		208	210	0	0	324	334	189	191	265	267
Hcs41		206	210	276	290	324	334	189	191	265	267
Hcs42		206	208	276	286	330	334	189	191	265	267
Hcs6	Colônia4	206	208	276	276	0	0	189	191	265	267
Hcs7		206	208	276	276	330	330	189	191	265	267
Hcs24		206	208	276	276	324	330	189	191	265	267
Hcs25		206	208	276	276	328	334	189	191	265	267
Hcs43		206	208	286	290	324	334	189	191	265	267
Hcs44		206	208	286	290	330	334	189	191	265	267
Hcs8	Colônia5	206	208	276	276	330	330	191	199	265	267
Hcs9		206	208	276	276	330	330	191	199	265	267
Hcs26		206	208	278	288	324	330	189	191	265	267
Hcs27		206	208	276	288	324	330	189	191	265	267
Hcs10	Colônia6	206	210	278	290	324	328	189	191	265	269
Hcs11		206	210	276	290	328	334	189	191	265	267
Hcs28		206	210	276	290	324	328	189	191	265	269
Hcs29		206	210	276	278	324	328	189	191	265	269
Hcs12	Colônia7	206	210	290	290	328	334	189	191	265	267
Hcs13		206	210	290	290	324	334	189	191	267	269
Hcs30		206	208	290	290	328	334	189	191	265	267
Hcs31		206	208	276	290	330	334	191	191	265	267
Hcs32		206	208	276	290	330	334	189	191	265	267
Hcs45		206	208	276	290	328	330	189	191	265	267
Hcs46		208	210	276	290	328	330	189	191	265	267
Hcs47		208	210	276	290	328	330	189	191	265	267
Hcs14	Colônia8	208	210	276	290	324	334	189	191	265	267
Hcs15		208	210	276	290	324	334	189	191	265	267

Hcs33		208	210	276	290	324	328	189	191	267	269
Hcs34		208	210	276	290	324	328	189	191	265	267
Hcs16	Colônia9	206	208	276	276	330	330	189	191	265	267
Hcs17		206	208	276	276	324	330	189	191	265	267
Hcs35		206	208	276	276	324	324	189	191	0	267
Hcs36		206	208	276	286	324	324	189	191	265	267

Os alelos representados por 0 não foram identificados devido a falhas na genotipagem ou amplificação.

ANEXO VII – Frequências alélicas dos alelos amostrados para *M. capixaba*, *M. scutellaris* e híbridos oriundos do estado do Espírito Santo (RAAD, 2017).

Loco	Alelo	M. cap.	M. scu.	Col.1	Col.2	Col.3	Col.4	Col.5	Col.6	Col.7	Col.8	Col.9
SSR1	204	0,041	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	206	0,533	0,250	0,500	0,000	0,429	0,500	0,500	0,500	0,375	0,000	0,500
	208	0,426	0,250	0,375	0,500	0,357	0,500	0,500	0,000	0,375	0,500	0,500
	210	0,000	0,313	0,125	0,500	0,214	0,000	0,000	0,500	0,250	0,500	0,000
	212	0,000	0,188	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
SSR2	276	0,017	0,250	0,313	0,000	0,500	0,667	0,625	0,375	0,313	0,500	0,875
	278	0,000	0,188	0,188	0,000	0,167	0,000	0,125	0,250	0,000	0,000	0,000
	280	0,045	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	282	0,331	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	284	0,062	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	286	0,132	0,188	0,000	0,000	0,083	0,167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125
	288	0,112	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,250	0,000	0,000	0,000	0,000
	290	0,008	0,188	0,500	1,000	0,250	0,167	0,000	0,375	0,688	0,500	0,000
	292	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	294	0,079	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	296	0,050	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	298	0,066	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
300	0,095	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
SSR3	324	0,252	0,313	0,000	0,000	0,286	0,200	0,250	0,375	0,063	0,500	0,625
	326	0,066	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	328	0,211	0,000	0,000	0,500	0,143	0,100	0,000	0,500	0,313	0,250	0,000
	330	0,083	0,188	0,563	0,000	0,143	0,400	0,750	0,000	0,313	0,000	0,375
	332	0,388	0,188	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	334	0,000	0,250	0,438	0,500	0,429	0,300	0,000	0,125	0,313	0,250	0,000
	336	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
SSR4	189	0,017	0,188	0,500	0,500	0,429	0,500	0,250	0,500	0,438	0,500	0,500
	191	0,157	0,375	0,500	0,500	0,429	0,500	0,500	0,500	0,563	0,500	0,500
	193	0,331	0,188	0,000	0,000	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	195	0,202	0,125	0,000	0,000	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	197	0,293	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	199	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,250	0,000	0,000	0,000	0,000
	201	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
SSR5	265	0,190	0,000	0,438	0,000	0,500	0,500	0,500	0,500	0,438	0,375	0,500
	267	0,231	0,188	0,563	0,500	0,500	0,500	0,500	0,125	0,500	0,500	0,500
	269	0,504	0,625	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,375	0,063	0,125	0,000
	271	0,054	0,188	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	273	0,021	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

M. cap.: *Melipona capixaba*; M. scu.: *Melipona scutellaris*; col.: colônia.