

ANDREIA ARANTES BORGES

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Partamona helleri*
FRIESE, 1900 (HYMENOPTERA, APIDAE)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

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

T

B732v
2007

Borges, Andreia Arantes, 1982-
Variabilidade genética de *Partamona helleri* Friese, 1900
(Hymenoptera, Apidae) / Andreia Arantes Borges.
– Viçosa, MG, 2007.
viii, 48f. : il. ; 29cm.

Orientador: Mara Garcia Tavares.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 39-48.

1. Abelha - Genética. 2. Abelha - Populações.
3. Marcadores genéticos. 4. *Partamona helleri*.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 595.79913

ANDREIA ARANTES BORGES

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Partamona helleri*
FRIESE, 1900 (HYMENOPTERA, APIDAE)**

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

APROVADA: 13 de março de 2007

Profº. Lucio Antonio Oliveira Campos
(Co-orientador)

Profª Tania Maria Fernandes Salomão
(Co-orientador)

Profº Cosme Damião Cruz

Profª Ana Maria Waldschmidt

Profª. Mara Garcia Tavares
(Orientadora)

*À minha família amada,
em especial à minha
She Mary e Papito.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À “DEUS” que tem me mostrado de forma tão concreta que a beleza da vida está nas pequenas coisas e que “ELE” tem muito mais a me revelar a cada dia, basta estar atenta ao seu chamado. Novamente repito que confiante em sua bondade e misericórdia sei que nunca estarei sozinha.

Aos meus pais por todo carinho e confiança depositados. Obrigada por estarem comigo e permitirem que eu me sinta segura e protegida. Apesar da distância que nos separa sei que nada é capaz de reduzir o eterno amor que nos une.

Ao Fabrício por me mostrar como é fácil ser alguém melhor e mais feliz. Obrigada por fazer parte da minha vida, partilhando das minhas alegrias, conquistas e angústias e por todos os muitos: “Tudo vai dar certo, não se preocupe”.

À Prof^a Mara pela orientação ao longo de todos estes anos. Agradeço por estar sempre presente durante a minha formação acadêmica, ensinando-me os princípios básicos para uma vida profissional bem sucedida.

Ao Prof^o Lucio por ser muito mais que um co-orientador. Obrigada por ser enérgico, mas ao mesmo tempo cuidadoso e carinhoso e por me fazer sentir que sou bem vista aos seus olhos. Tenho muito respeito e admiração pelo senhor.

À Prof^a Tania pela disponibilidade e por sempre ter me tratado tão bem, e que diante dos seus elogios, faz-me sentir muitas vezes alguém que nem sempre acho que sou.

À Prof^a Ana Maria por ter partilhado dos resultados positivos e negativos obtidos ao longo da execução deste trabalho e por ter aceitado o convite de participar desta banca.

Ao Prof^o Cosme por sempre me auxiliar nas análises estatísticas com muita paciência e por ter aceitado o convite de participar desta banca.

A todos os muitos amigos que conviveram comigo e partilharam dos momentos de vitória e decepções ao longo da minha vida acadêmica. Aos amigos do laboratório por todos os momentos de descontração e

companheirismo: Rejane, Jefferson, Filipe, Daniela, Camilla, Denilce, Gustavo, Henrique, Marcília, Helder, Fábila e Marcela.

Aos funcionários do Apiário, Íris e Geraldo, por terem me ajudado a coletar as operárias de *P. helleri*. Sem a experiência de vocês, para encontrar os ninhos com tanta facilidade, com certeza a execução deste trabalho teria sido dificultada.

À Leonarda e Bruna pelos momentos de longas conversas que sempre me fizeram perceber como sou alguém especial e muito amada por “DEUS”.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

BIOGRAFIA

Andreia Arantes Borges, filha de Divino Marques Borges e Maria Arantes Borges, nasceu em 19 de abril de 1982, na cidade de Formiga, Minas Gerais.

Concluiu seus estudos de primeiro e segundo graus nesta cidade na Escola Estadual Drº Abílio Machado.

Em 2001, ingressou-se na Universidade Federal de Viçosa (UFV), graduando-se bacharel e licenciada no curso de Ciências Biológicas em julho de 2005.

Foi bolsista de iniciação científica (PIBIC-CNPq) no período de 2002 a 2005, desenvolvendo trabalhos relacionados a biologia molecular de abelhas, no Departamento de Biologia Geral, sob orientação da Profª. Mara Garcia Tavares.

Em agosto de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em 13 de março de 2007, sob orientação da Profª Mara Garcia Tavares.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Importância das abelhas.....	1
1.2- O gênero <i>Partamona</i> e os estudos desenvolvidos com <i>Partamona helleri</i>	2
1.3- Variabilidade genética em abelhas.....	5
1.4- Uso de marcadores microsatélites em estudos genéticos com abelhas.....	7
2- OBJETIVOS.....	12
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1- Material genético.....	13
3.2- Extração do DNA.....	15
3.3- Amplificação do DNA.....	16
3.4- Análise estatística.....	18
4- RESULTADOS.....	22
4.1- Condições de amplificação.....	22
4.2- Análise populacional.....	23
5- DISCUSSÃO.....	33
6- CONCLUSÕES GERAIS.....	38
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

RESUMO

BORGES, Andreia Arantes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007. **Variabilidade genética de *Partamona helleri* Friese, 1900 (Hymenoptera, Apidae)**. Orientadora: Mara Garcia Tavares. Co-orientadores: Lucio Antonio Oliveira Campos e Tania Maria Fernandes Salomão.

A variabilidade genética de 66 colônias de *Partamona helleri* coletadas em cinco localidades do Estado de Minas Gerais foi estimada utilizando dez locos microssatélites. Baixos níveis de polimorfismos foram detectados, obtendo-se 40% de locos polimórficos e 1,5 alelos/loco. A heterozigosidade média esperada para todas as colônias analisadas foi 0,180 e a heterozigosidade média observada foi de 0,107. As subpopulações analisadas apresentaram forte estruturação, com significativa diferenciação genética ($F_{ST} = 0,552$). A análise de variância molecular (AMOVA) revelou que 81,23% da variabilidade genética total é explicada pela variação existente entre as populações, o que confirma a forte estruturação detectada. A análise de agrupamento de todas as colônias em conjunto, não revelou a formação de grupos correspondentes à origem geográfica das mesmas. Porém, ao agrupar as colônias por localidade, verificou-se que a população de Viçosa mostrou-se mais geneticamente diferente das demais, e que as populações de São Miguel do Anta, Teixeiras e Porto Firme mostraram-se geneticamente mais próximas daquela coletada em Rio Vermelho, do que da população de Viçosa, apesar de ser geograficamente mais distante. Estudos mais detalhados, analisando um maior número de colônias e utilizando “primers” microssatélites específicos para *P. helleri*, devem ser realizados a fim de fornecerem dados mais conclusivos sobre a variabilidade genética destas abelhas.

ABSTRACT

BORGES, Andreia Arantes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March of 2007. **Genetic variability of *Partamona helleri* Friese, 1900 (Hymenoptera, Apidae)**. Adviser: Mara Garcia Tavares. Co-Advisers: Lucio Antonio Oliveira Campos and Tania Maria Fernandes Salomão.

The genetic variability of 66 colonies of *Partamona helleri* collected in five locations of Minas Gerais state was estimated using ten microsatellites loci. Low levels of polymorphism were detected, getting 40% of polymorphic loci and 1,5 alleles/locus. The expected average heterozygosity for all the analyzed colonies was 0.180 and the observed average heterozygosity was 0.107. The analyzed subpopulations were well structured, with significant genetic variation ($F_{ST} = 0.552$). The analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that 81.23% of the total genetic variability is explained by variation among populations, what confirms the structure observed. The grouping analysis of the colonies, did not reveal the formation of groups corresponding to their geographic origin. However, when grouping colonies according to localities, it was verified that the population of Viçosa was more genetically different from the others, and that populations of São Miguel do Anta, Teixeiras and Porto Firme were closer to that collected in Rio Vermelho, than to population of Viçosa, although Rio Vermelho was geographically more distant. More detailed studies, analyzing a larger number of colonies and using microsatellites “primers” specific for *P. helleri*, must be carried out in order to supply more conclusive information about the genetic variability of these bees.

1- INTRODUÇÃO

1.1. Importância das abelhas

A polinização, processo vital para a sobrevivência e multiplicação de muitas espécies vegetais, tem como agentes principais os insetos devido à sua eficiência e disponibilidade na natureza. Muitos grupos de insetos são conhecidos como polinizadores, mas as abelhas constituem, provavelmente, o grupo mais importante em número e diversidade (Bawa *et al.*, 1985).

As abelhas constituem o principal grupo de polinizadores de plantas floríferas em diversos ecossistemas (Bawa, 1990; Neff e Simpson, 1993), além de ter amplamente reconhecida a sua ação na perpetuação de espécies silvestres contribuindo assim para a manutenção do equilíbrio ecológico (La Salle e Gauld, 1993).

Elas formam o grupo mais importante de visitantes florais, pois são inteiramente dependentes das flores para a obtenção de recursos alimentares, podendo não ter se originado antes do aparecimento das Angiospermas. Eriksson e Bremer (1992) verificaram que a taxa de diversificação é significativamente superior nos vegetais cujas famílias são polinizadas por animais e sugerem que a fidelidade dos polinizadores, especialmente as abelhas, foi o fator mais importante na diversificação das Angiospermas.

No cerrado, segundo Silberbauer-Gottsberger e Gottsberger (1988), 75% das espécies vegetais estudadas eram polinizadas primária ou secundariamente pelas abelhas. Nos campos rupestres, de um total de 130 espécies de plantas estudadas, 82 (63%) apresentaram características melitófilas, sendo primária ou secundariamente dependentes das abelhas para a polinização (Faria, 1994).

A importância das abelhas para as plantas não se resume ao transporte de grãos de pólen de uma flor para outra, mas, também ao fato de serem vetores bastante ativos e que, muitas vezes, promovem o cruzamento entre plantas separadas por grandes distâncias, o que garante a manutenção do ciclo de reprodução sexuada das plantas e, conseqüentemente, a disponibilidade de alimento para outros animais. Por

isso, a extinção de uma espécie de abelha pode levar a um processo de extinção em cadeia, envolvendo a(s) planta(s) que ela poliniza assim como os animais que dependem dessa(s) planta(s) para se alimentarem (Campos, 1998).

Entre as abelhas sociais brasileiras, as pertencentes à subtribo Meliponina, popularmente chamadas de “abelhas indígenas sem ferrão”, são as mais conhecidas e consideradas importantes polinizadores das árvores nativas. Este grupo de abelhas exibe ampla distribuição pelo mundo, sendo encontradas nas regiões tropicais e subtropicais do hemisfério sul, nas Américas do Sul e Central, Ásia, Ilhas do Pacífico, Austrália, Nova Guiné e África (Camargo e Pedro, 1992).

Algumas espécies desta subtribo são essenciais para a polinização de grande parte da flora da floresta Atlântica e conforme o ecossistema, elas polinizam de 40 a 90% das árvores nativas (Kerr *et al.*, 1996). Portanto, elas atuam na manutenção da biodiversidade e funcionamento de comunidades, além de proporcionarem retorno econômico aos meliponicultores devido à extração de saboroso e nutritivo mel produzido pelas mesmas.

1.2. O gênero *Partamona* e os estudos desenvolvidos com *Partamona helleri*.

Partamona Schwarz (1939) é um gênero pertencente à subtribo Meliponina que compreende 33 espécies, exclusivamente neotropicais, com ampla distribuição geográfica, sendo encontradas do sul do Brasil ao sul do México (Pedro e Camargo, 2003). Especificamente, a espécie *Partamona helleri*, objeto de estudo do presente trabalho, tem sido encontrada do nordeste de Santa Catarina até a região de Salvador na Bahia, acompanhando a mata atlântica, e a oeste chega até o vale do São Francisco em Minas Gerais, na região dos cerrados.

Segundo Pedro e Camargo (2003) as abelhas deste gênero ocorrem em matas, cerrado, caatinga, regiões montanhosas como as cordilheiras andinas e centro-americanas, podendo ser encontradas em altitudes

maiores que 2.000 m. Os autores verificaram que existem espécies adaptadas a ambientes antrópicos que utilizam uma ampla variedade de substratos para nidificação, podendo ser frequentemente observadas em vasos de plantas e frestas de paredes. Porém há espécies que são termitófilas obrigatórias.

A população nos ninhos de *Partamona* varia de 1000 a 3000 indivíduos adultos (Michener, 1946 *apud* Pedro e Camargo, 2003). Esta grande abundância de número de indivíduos e de colônias, em muitas regiões, facilita o desenvolvimento de pesquisas sobre a biologia e genética destas abelhas. Porém, elas apresentam comportamento agressivo de defesa atacando o potencial invasor com mordidas, enroscando-se nos cabelos e entrando nos ouvidos de quem se aproxima da entrada do ninho.

O gênero *Partamona* vem sendo amplamente estudado em nível morfológico. Estes estudos demonstram que se trata de um grupo de abelhas bastante uniformes com relação aos caracteres morfológicos. Muitas espécies de *Partamona* são praticamente idênticas na aparência e, assim, as espécies são reconhecidas principalmente pela combinação das variações na coloração do integumento, cor da pilosidade e asas, comprimento de cerdas do escapo, e a forma dos dentes da mandíbula. Para muitas espécies é necessário que se considere uma combinação de vários caracteres e, em muitos casos, informações sobre a procedência do exemplar e dados sobre o substrato de nidificação, são bastante úteis.

O fato de existirem poucos caracteres estruturais de importância taxonômica para este gênero, dificulta ainda mais a determinação do “status” taxonômico de suas espécies (Pedro e Camargo, 2003). Estes autores encontraram dificuldades para propor uma hipótese filogenética consistente para o gênero *Partamona*, devido à escassez de caracteres morfológicos passíveis de codificação e polarização.

Estudos comportamentais e citogenéticos também já foram realizados com algumas espécies do gênero *Partamona*. Azevedo (1997), por exemplo, realizou experimentos relacionados à atividade de vôo de *P. helleri*, e, posteriormente, analisaram os padrões de aprovisionamento e postura nas células de cria (POP) em *P. helleri*, *P. aff. nigrior*, *P. mulata*, *P. ayilae* e *P. vicina* (Azevedo e Zucchi, 2000).

As espécies *P. helleri* (Costa *et al.*, 1992; Brito *et al.*, 1997), *P. mulata*, *P. vicina*, *P. ayilae*, *P. sp. n.* (Bruto-Ribon *et al.*, 1999) e *P. rustica* (Martins *et al.*, 2005), foram caracterizadas citogeneticamente. Verificou-se que as espécies *P. helleri* e *P. rustica* apresentavam indivíduos com cromossomos supranumerários, além dos 34 cromossomos do complemento normal. Brito *et al.* (1997) encontraram de zero a três destes cromossomos B, em diferentes indivíduos de *P. helleri*, enquanto Tosta *et al.* (1998) encontraram indivíduos com até quatro cromossomos B nesta espécie.

Após a detecção dos cromossomos B em *P. helleri* iniciaram-se estudos genéticos utilizando marcadores moleculares para se detectar os fragmentos de DNA associados aos cromossomos B. Tosta (2001) e Tosta *et al.* (2004) identificaram, isolaram, clonaram e sequenciaram parcialmente um marcador RAPD associado a esses cromossomos e evidenciaram a presença de seqüências específicas de DNA em indivíduos que carregavam estes cromossomos.

Devido à inespecificidade e baixa repetibilidade dos marcadores RAPD, Tosta (2005) desenvolveu um marcador SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), a partir da seqüência parcial do marcador RAPD, a fim de obter um marcador mais fidedigno para a identificação dos cromossomos B em *P. helleri*.

Tosta (2005) sugeriu, a partir da medida das asas anteriores de indivíduos de *P. helleri*, com e sem cromossomos B, que estes não afetam o “fitness” dos indivíduos que os carregam.

Estudos relacionados com a análise da variabilidade genética populacional desta espécie, entretanto são escassos. Recentemente, Brito (2005) analisou as relações genéticas entre populações naturais de *P. helleri* e *P. mulata* empregando a técnica de microssatélites. A análise dos locos microssatélites mostrou baixa variabilidade genética em ambas as espécies e discreta estruturação entre as populações, não relacionada com a distribuição geográfica das mesmas. A autora propôs que os resultados obtidos possam ser decorrentes da fragmentação dos habitats pela rápida degradação do cerrado e da Mata Atlântica, ou devido à presença de alelos nulos associados ao uso de “primers” heteroespecíficos.

1.3. Variabilidade genética em abelhas.

Os himenópteros compreendem um dos maiores e mais diverso grupo de insetos. Entretanto, tem se verificado que as espécies dessa ordem apresentam baixa variabilidade genética quando comparado a outros insetos (Berkelhamer, 1983; Graur, 1985; Packer e Owen, 1992; Packer *et al.* 1992). Este baixo nível de variabilidade genética tem sido explicado pelo sistema de determinação do sexo, comportamento social e características ecológicas dos organismos pertencentes a esta ordem. Em muitos casos, pode-se considerar que mais de um destes fatores podem estar envolvidos na baixa variabilidade genética detectada (Graur, 1985; Owen, 1985; Boraschi e Del Lama, 2004), como observado abaixo.

A haplodiploidia corresponde ao sistema de diferenciação sexual da maioria dos Hymenoptera. Neste sistema, ovos fertilizados dão origem a fêmeas (diplóides) e ovos não fertilizados originam machos (haplóides). Espera-se que organismos haplodiplóides apresentem baixo polimorfismo porque todos os locos dos machos hemizigotos estão expostos à seleção. A haplodiploidia, então, estaria associada à diminuição do tamanho efetivo da população, aumento da taxa de fixação de alelos e prevenção da produção de polimorfismos estáveis. Porém, algumas espécies de Symphyta (*sawflies*) exibem níveis de heterozigosidade similares àqueles dos insetos diplóides (Sheppard e Heydon, 1986; Rosemeier e Packer, 1993; Boato e Battisti, 1996; Boraschi e Del Lama, 2004). Isto sugere que a haplodiploidia por si só não parece ser responsável pelos baixos níveis de variabilidade genética nos himenópteros.

Similarmente, o comportamento social reduz o tamanho efetivo da população, fazendo com que poucos indivíduos sejam responsáveis pela reprodução na colônia, elevando as taxas de endogamia (Lester e Selander, 1979; Berkelhamer, 1983). Graur (1985) avaliou o grau de socialidade de diferentes espécies de himenópteros e verificou que a diversidade genética é reduzida de acordo com o tamanho efetivo esperado, ou seja, espécies eusociais avançadas apresentam menor variabilidade genética que espécies solitárias. Contudo, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre himenópteros primitivamente eusociais e sociais avançados ou entre

primitivamente eusociais e solitários.

A redução da variabilidade genética em organismos haplodiplóides também está associada à produção de machos diplóides (Packer e Owen, 2001; Zayed e Packer, 2001). Estes são produzidos a partir de ovos fertilizados que apresentam homozigose no loco de determinação sexual, enquanto indivíduos heterozigotos nesse loco desenvolvem-se em fêmeas e indivíduos hemizigotos provenientes de ovos não fertilizados desenvolvem-se em machos haplóides (Cook e Crozier, 1995; Beye *et al.*, 2003). Devido a sua esterilidade ou inviabilidade (Stouthamer *et al.*, 1992; Agoze *et al.*, 1994), a produção de machos diplóides é desvantajosa porque aumenta a carga genética da colônia (Page, 1980; Ross *et al.*, 1993). Em espécies sociais, a presença de machos diplóides contribui para a redução populacional, pois as operárias matam a rainha que está produzindo estes machos, o que pode levar à extinção da colônia (Plowright e Pallet, 1979; Ross *et al.*, 1987).

Outra possível explicação para a baixa variabilidade genética nos himenópteros está relacionada com a estabilidade ambiental dentro da colônia. De acordo com a hipótese variação-nicho descrita por Van Valen (1965), há uma tendência ao aumento da heterozigosidade frente a variações ambientais. Considerando que as colônias de insetos sociais funcionam como um microhabitat parcialmente tamponado, baixa variabilidade é esperada para estas espécies.

Considerando que se trata de um grupo de insetos aparentemente frágil com relação à degradação ambiental, estudos sobre a variabilidade genética das abelhas poderão fornecer dados essenciais para o conhecimento da estrutura populacional, do grau de parentesco entre colônias e do fluxo gênico entre populações, que são dados, sobremaneira, importantes para o desenvolvimento de estratégias que visem a preservação deste importante grupo de insetos.

1.4. Uso de marcadores microssatélites em estudos genéticos com abelhas.

Atualmente um grande número de metodologias está disponível para a quantificação e estudo da diversidade genética. A aplicação de tecnologias baseadas em marcadores moleculares permite a detecção da variabilidade existente diretamente ao nível do DNA, fornecendo dados suficientes para discriminar a variação genética existente entre indivíduos e dentro de populações (Kresovich *et al.*, 1995). Marcadores microssatélites têm sido amplamente utilizados nestes tipos de análise (De La Rúa *et al.*, 2001; Balloux e Lugon-Moulin, 2002; Blouin, 2003; De La Rúa *et al.*, 2003).

Microssatélites consistem em locos nucleares hipervariáveis, de unidades compostas de 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, repetidas em série. Eles são muito freqüentes e estão distribuídos ao acaso nos genomas de eucariotos e de alguns procariotos (Field e Wills, 1998; Tóth *et al.*, 2000; Bichara *et al.*, 2000).

De acordo com Goldstein e Schlötterer (1999) eles podem ser classificados como perfeitos quando a seqüência de bases repetidas não apresenta nenhuma interrupção (ATATATATAT); imperfeitos quando há uma ou mais bases diferentes na estrutura repetitiva (ATATCATATAT); interrompidos quando há um pequeno número de pares de base diferentes na estrutura repetitiva (ATATACCATATATCCATATAT) e compostos, quando há dois ou mais microssatélites adjacentes com diferentes seqüências repetitivas (ATATATCAGCAGCAGCAG).

A princípio, os microssatélites eram considerados marcadores seletivamente neutros que não eram afetados por pressões seletivas (Hamada *et al.*, 1982). Entretanto, fortes evidências demonstram que os microssatélites podem atuar na regulação da expressão gênica, visto que eles podem ser encontrados na região *upstream* de promotores eucarióticos (Biggin e Tjian, 1988; Gilmour *et al.*, 1989; O'Donnell *et al.*, 1994). Morgante *et al.* (2002) verificaram uma freqüência significativamente elevada de seqüências repetitivas em ESTs e DNA genômico não transcrito de cinco espécies vegetais, sendo que a composição das repetições variaram entre as seqüências genômicas não transcritas e aquelas transcritas.

Tendo em vista a expressão co-dominante e o multialelismo, os microssatélites correspondem ao grupo de marcadores que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo por loco (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Em um mesmo loco microssatélite de uma população podem ser encontrados vários alelos que apresentam cada um diferentes números de repetições. Os diferentes alelos são caracterizados pelo seu comprimento exato em pares de base obtidos após amplificação individual do DNA por meio de PCR utilizando-se um par de “primers” específicos (de 20 a 30 pares de bases) complementares a seqüências únicas que flanqueiam o microssatélite. A amplificação ocorrerá quando os dois “primers” estiverem flanqueando um segmento de DNA em direção oposta e distanciados de 100 a 300 pb, o que possibilitará a síntese desse segmento pela *Taq* DNA polimerase (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

O alto polimorfismo alélico detectado pelos microssatélites está associado ao fato destas seqüências corresponderem a regiões de instabilidade no genoma, submetidas a mudanças mutacionais em taxas superiores às aquelas observadas em regiões de DNA não repetitivo (Sia *et al.*, 1997). As taxas de mutação nos locos microssatélites foram estimadas ser da ordem de 10^{-5} a 10^{-2} (Dallas, 1992). Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar esta elevada taxa de mutação incluindo erros durante a recombinação, ocorrência de *crossing-over* desigual e erro da DNA polimerase durante a replicação (*slippage*) ou reparo (Henderson e Petes, 1992; Strand *et al.*, 1993; Sia *et al.*, 1997, Sia *et al.*, 2000).

Marcadores microssatélites já foram desenvolvidos para diversos insetos: abelhas (Hall, 1991; Estoup *et al.*, 1993; Peters *et al.*, 1998; Paxton *et al.*, 1996) vespas (Choudhary *et al.*, 1993; Hughes e Queller, 1993) e formigas (Evans, 1993; Gertsch *et al.*, 1995), possibilitando a realização de estudos sobre a poliandria, paternidade, utilização de espermatozóides e genética de populações (Paxton *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 1999; Paxton, 2000; De La Rúa *et al.*, 2001, 2003).

Em abelhas, o primeiro estudo utilizando microssatélites foi realizado por Estoup *et al.* (1993), com a descrição de alguns “primers” desenhados para *Apis mellifera* e *Bombus terrestris*.

Verificando que os marcadores microssatélites consistiam em poderosa ferramenta para a análise da variação genética, Rowe *et al.* (1997) desenvolveram novos “primers” para *Apis mellifera* sendo que sete deles eram polimórficos e destes, cinco apresentaram locos altamente polimórficos com mais de cinco alelos cada.

Widmer *et al.* (1998) realizaram um estudo sobre a estrutura genética e história de colonização de populações de *Bombus terrestris* presente no continente europeu e de *B. canariensis* e *B. maderiensis*, presentes nas ilhas Canárias e Madeira, respectivamente, utilizando nove locos microssatélites. A variabilidade genética acessada pelos microssatélites permitiu distinguir as populações da ilha Canária e verificar que as populações da ilha Madeira eram geneticamente mais similares às populações de *B. terrestris*.

“Primers” microssatélites também foram desenvolvidos para espécies de abelhas sem ferrão. Peters *et al.* (1998) descreveram os primeiros “primers” microssatélites para um meliponíneo: *Melipona bicolor*. De um total de vinte e cinco locos analisados, 19 foram polimórficos. Os locos microssatélites detectados para *M. bicolor* também foram identificados em *Melipona quadrifasciata*, *Tetragona clavipes* e *Scaptotrigona postica*. Nota-se que a construção destes “primers” é, portanto, útil para a execução de estudos genéticos de espécies relacionadas, ou até mesmo para gêneros diferentes.

Posteriormente, Paxton *et al.* (1999) desenvolveram “primers” microssatélites para *Scaptotrigona postica*. Cinco dos seis “primers” desenhados apresentaram produtos de amplificação satisfatórios, com o número de alelos variando de 5 a 10 alelos por loco. DNAs de outras espécies de abelhas sem ferrão foram amplificados com estes “primers” e obteve-se produtos de amplificação satisfatórios permitindo a detecção do loco microssatélite com ausência de produtos de amplificação inespecíficos, embora um número reduzido de alelos/loco (0 a 3) tenha sido detectado.

Os locos microssatélites descritos para *S. postica* foram utilizados para verificar o tipo de reprodução em rainhas desta abelha. Os dados obtidos com os microssatélites foram utilizados para identificar os genótipos da rainha das colônias analisadas e dos machos coletados nas congregações formadas em frente à entrada das colônias. Os genótipos

encontrados foram então comparados com os genótipos das operárias. Os resultados obtidos indicaram que as rainhas de *S. postica* são poliândricas facultativas, pois se verificou genótipos de operárias consistentes com a ocorrência de acasalamentos de rainhas com até seis machos diferentes (Paxton, 2000).

“Primers” microssatélites também foram desenvolvidos para *Trigona carbonaria* auxiliando na classificação taxonômica de espécies proximamente relacionadas a esta abelha. Nove dos dez locos microssatélites foram polimórficos apresentando heterozigosidade média de 0,481 e número de alelos variando de 1 a 9 alelos por loco. Análise genética utilizando estes “primers” também foi estendida para outras espécies de abelhas, revelando polimorfismos genéticos e menor número de alelos por loco (Green et al., 2001).

Estudos sobre a frequência de cruzamentos das rainhas e origem dos machos em espécies de abelha sem ferrão têm sido desenvolvidos utilizando os marcadores microssatélites. Green e Oldroyd (2002) verificaram que as rainhas de *Trigona carbonaria* são monoândricas e que o controle da razão sexual permanece sobre o controle da rainha. Resultado semelhante foi obtido por Palmer et al. (2002) ao se analisar algumas espécies de abelha sem ferrão mexicanas e australianas e por Brown et al. (2003) analisando colônias de *Bombus hypnorum*.

Cameron et al. (2004) analisaram a estrutura genética de *Trigona collina* utilizando oito locos microssatélites para se verificar a existência de mecanismos comportamentais que minimizam a ocorrência de endogamia nesta espécie. Os autores verificaram que as colônias encontradas dentro de uma mesma área de agregação não eram geneticamente aparentadas e que os machos congregados na entrada de um ninho apresentavam genótipos distintos entre si, indicando que eles eram provenientes de colônias diferentes.

Azuma et al. (2005) desenvolveram oito “primers” microssatélites para a abelha *Ceratina flavipes* com o intuito de se obter informações a respeito da socialidade e sistema de cruzamentos das abelhas pertencentes ao gênero *Ceratina*. A estimativa da heterozigosidade esperada variou de 0,21 a 0,87 e detectou-se a presença de dois a oito alelos por loco. Verificou-se

ainda que estes “primers” microssatélites podem ser utilizadas para análise genética de *C. okinawana* e outras espécies congêneras.

Apesar da grande aplicabilidade desta metodologia, a grande limitação do seu uso está no alto custo para se desenvolver “primers” específicos. Entretanto, tem sido comum o uso de “primers” heterólogos que correspondem a “primers” descritos para uma espécie e que podem ser utilizados por outras espécies do mesmo gênero (Moore *et al.*, 1991).

Francisco (2002) utilizou “primers” heterólogos (construídos para *S. postica* e *M. bicolor*) para analisar a diversidade genética em populações da abelha sem ferrão *Plebeia remota*. Dos 25 “primers” testados, 12 produziram resultados satisfatórios, podendo ser utilizados no cálculo da heterozigose e diferenciação entre as populações analisadas.

A estrutura genética de populações de *M. rufiventris* e *M. mondury* coletadas em diferentes localidades do Estado de Minas Gerais foi analisada utilizando os “primers” desenvolvidos para *M. bicolor*. Verificou-se um baixo nível de variabilidade genética que pode ser decorrente da redução populacional pela qual estas populações têm passado e altos valores de F_{ST} (0.25), os quais revelam uma grande estruturação genética entre as subpopulações destas espécies (Lopes, 2004).

Francisco *et al.* (2006) alertam para o uso de “primers” heterólogos, visto que baixos níveis de polimorfismo foram detectados ao se analisar populações de *Partamona helleri*, *P. mulata* e *Plebeia remota* utilizando “primers” microssatélites descritos para *Melipona bicolor* e *Scaptotrigona postica*. Estes autores verificaram menor diversidade alélica e heterozigosidade nas populações analisadas comparado aos resultados obtidos por Peters *et al.* (1998) e Paxton *et al.* (1999) em *M. bicolor* e *S. postica*, respectivamente.

Pelos dados relatados, pode-se concluir que é grande a importância o uso dos marcadores microssatélites no estudo de diversos aspectos da biologia de insetos da subtribo Meliponina.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi estimar o grau de variabilidade genética de populações de *P. helleri*, coletadas em diferentes localidades do Estado de Minas Gerais.

Os objetivos específicos foram:

- a) Caracterizar os níveis de variação genética intra e inter colonial de populações de *Partamona helleri*.
- b) Fazer inferências sobre a dinâmica populacional desta espécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Material genético

A avaliação da variabilidade genética de populações de *Partamona helleri* foi realizada a partir da coleta de operárias adultas desta abelha em diferentes localidades do Estado de Minas Gerais. As operárias foram trazidas vivas ou preservadas em álcool absoluto para as dependências do Setor de Biofísica e Biologia Celular do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa e identificadas pelo Profº Lucio Antonio Oliveira Campos (Universidade Federal de Viçosa/MG). Posteriormente, elas foram armazenadas em Ultra-Freezer a -80°C até o momento das análises genéticas.

Um total de 66 colônias coletadas nas cinco localidades foi utilizado para a execução do presente trabalho. Destaca-se o fato de muitas operárias terem sido coletadas em ninhos encontrados em áreas urbanizadas e relativamente próximas entre si. A distribuição geográfica das cinco localidades e a relação das colônias amostradas em cada localidade são apresentadas na Figura 1 e Tabela 1, respectivamente.

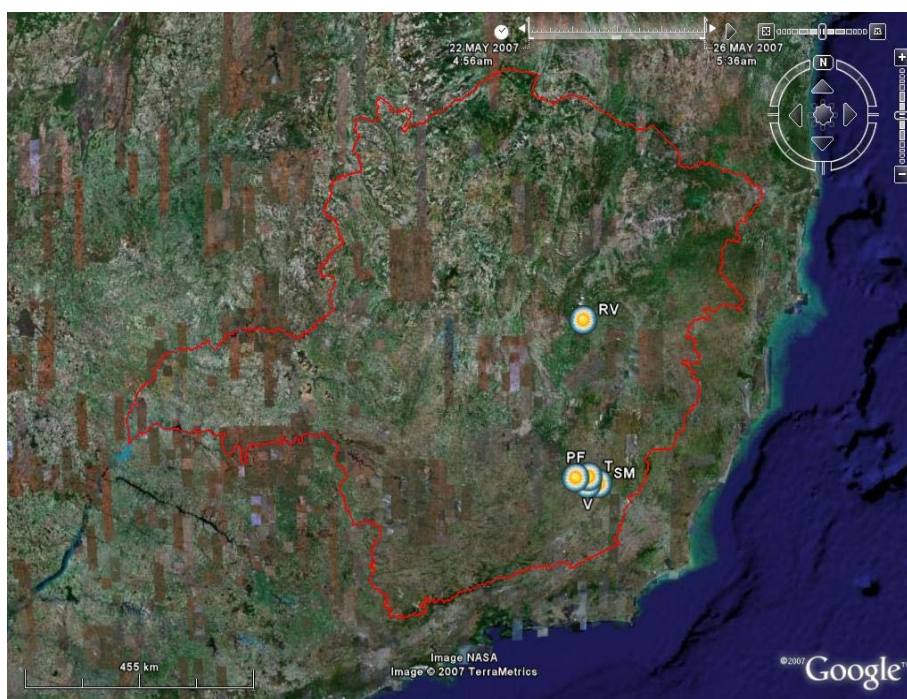


Figura 1. Distribuição geográfica das cinco localidades analisadas. SM: São Miguel do Anta, T: Teixeira, PF: Porto Firme, V: Viçosa e RV: Rio Vermelho.

Tabela 1. Códigos, coordenadas geográficas e número de colônias de *P. helleri* analisadas.

Código	Latitude(S)/ Longitude (W)	Nº Colônias
<i>São Miguel do Anta</i>		
SM-1	S 20°45.397' W 42°40.636'	1
SM-2	S 20°45.503' W 42°40.724'	1
SM-3	S 20°45.488' W 42°40.656'	1
SM-4	S 20°42.488' W 42°42.997'	1
SM-5	S 20°42.539' W 42°42.896'	1
SM-6	S 20°42.727' W 42°42.976'	1
SM-7 e SM-8	S 20°42.882' W 42°42.919'	2
SM-9	S 20°42.882' W 42°43.105'	1
SM-10	S 20°42.742' W 42°43.060'	1
SM-11 e SM-12	S 20°42.804' W 42°42.945'	2
<i>Teixeiras</i>		
T-1	S 20°38.873' W 42°50.849'	1
T-2	S 20°38.873' W 42°51.036'	1
T-3 a T-5	S 20°39.128' W 42°50.833'	3
T-6	S 20°39.146' W 42°51.003'	1
T-7 a T-10	S 20°39.204' W 42°51.289'	4
T-11 e T-12	S 20°39.000' W 42°51.000'	2
<i>Rio Vermelho</i>		
RV-1 e RV-2	S 18°18.662' W 43°00.558'	2
RV-3	S 18°18.768' W 43°00.629'	1
RV-4	S 18°12.262' W 43°01.176'	1
RV-5	S 18°12.283 W 43°01.119'	1
RV-6	S 18°12.069' W 43°59.379'	1
RV-7 e RV-8	S 18°12.071' W 43°59.375'	2
RV-9	S 18°14.640' W 43°01.885'	1
RV-10 a RV-12	S 18°17.000' W 43°00.000'	3

Tabela 1. Continuação.

Código	Latitude(S)/ Longitude (W)	Nº Colônias
Porto Firme		
PF-1	S 20°40.172' W 43°05.103'	1
PF-2 a PF-4	S 20°40.071' W 43°04.963'	3
PF-5 a PF-8	S 20°40.076' W 43°05.205'	4
PF-9 a PF-11	S 20°39.950' W 43°05.130'	3
Viçosa		
V-1	S 20°46.168' W 42°52.313'	1
V-2	S 20°46.169' W 42°52.310'	1
V-3	S 20°46.155' W 42°52.304'	1
V-4	S 20°46.209' W 42°52.292'	1
V-5	S 20°45.720' W 42°52.173'	1
V-6 e V-7	S 20°45.731' W 42°52.156'	2
V-8 e V-9	S 20°45.379' W 42°52.437'	2
V-10	S 20°45.400' W 42°52.462'	1
V-11 a V-19	S 20°44.925' W 42°53.038'	9
TOTAL		66

3.2 - Extração de DNA

A extração do DNA de cinco operárias adultas de cada colônia de *Partamona helleri* analisada foi realizada conforme protocolo recomendado por Waldschmidt *et al.* (1997). Cada indivíduo foi macerado em um gral de porcelana com nitrogênio líquido sendo em seguida adicionado 1 mL de tampão de extração gelado constituído de: CTAB a 2% (hexadecil trimetil brometo de amônio); EDTA (ácido tetraacético diamina etileno) a 20 mM (pH 8,0); NaCl a 1,4 M; Tris-HCl a 100 mM (pH 8,0) e 100 µg/mL protease. O macerado foi incubado a 65°C por 30 min. A desproteínização foi feita com um volume de clorofórmio. Após a desproteínização o macerado foi centrifugado a 13.000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5415C) por 8 min. A

precipitação do ácido nucléico foi feita com um volume de isopropanol seguida de incubação a -20°C por 24 h. O material foi então submetido à centrifugação a 14.000 rpm por 30 min e o precipitado formado lavado três vezes com etanol 70% e seco à estufa por, aproximadamente, 10 minutos.

Posteriormente, o ácido nucléico foi ressuspendido em 100 µL de TE (Tris-HCl a 10 mM, pH 8,0; EDTA a 1mM pH 8,0). Em seguida as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídio para quantificar e verificar a integridade e pureza do DNA extraído.

3.3 – Amplificação do DNA

O DNA extraído foi amplificado conforme metodologia descrita por Brito (2005), com algumas modificações. A mistura de reação de 10 µL consistiu de: 0,1 mM de cada desoxirribonucleosídeos trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 2,5 µM de cada “primer”; 0,5 unidade de *Taq* polimerase em tampão 1X e 10 ng de DNA total.

O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de 30 a 40 ciclos de: desnaturação a 93°C por 40 segundos, pareamento com temperatura específica para cada “primer” por 50 segundos e elongação a 72°C por 40 segundos. Ao final destes ciclos, um passo extra de elongação a 72° por 5 minutos foi efetuado.

A seleção dos “primers” microssatélites a serem utilizados no presente trabalho foi realizada a partir da execução de um teste para se ajustar a temperatura de pareamento e o número de ciclos adequados para cada “primer” microssatélite. Foram testados 25 “primers” descritos para *Melipona bicolor* (Peters *et al.*, 1998). Na Tabela 2 encontram-se listados os dez “primers” selecionados para a análise genética das populações de *P. helleri* que apresentaram padrão de amplificação que permitiu a detecção do loco microssatélite com ausência de produtos de amplificação inespecíficos.

Os produtos das amplificações (3 µL) foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 8%. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com aquele fornecido pelo

marcador de peso molecular (10 pb DNA Ladder, Invitrogen), o qual consiste de fragmentos de DNA que variam de 10 a 330 pb, com múltiplos de 10 pb.

A visualização dos fragmentos obtidos via PCR foi realizada por meio de coloração com nitrato de prata a 0,2%. Esta visualização foi realizada a partir da revelação dos géis por meio de um passo inicial de fixação em uma solução de etanol absoluto a 10% e ácido acético a 0,5% por 10 minutos. Decorrido este tempo a solução fixadora foi removida e armazenada para ser reutilizada ao final do processo de revelação dos géis. Posteriormente, o gel foi submetido à imersão em solução de nitrato de prata a 0,2% por 10 minutos. Em seguida realizou-se uma lavagem em água destilada por um minuto e o gel foi exposto a uma solução reveladora que consistiu de NaOH 3% e formaldeído 0,6% até o aparecimento das bandas. Esta solução reveladora foi então descartada e adicionou-se novamente a solução fixadora a fim de interromper a revelação, impedindo assim o escurecimento excessivo das bandas no gel o que poderia prejudicar a identificação dos genótipos moleculares obtidos. Todas estas etapas foram executadas sob leve agitação.

Tabela 2. “Primers” microssatélites descritos para *M. bicolor* e utilizados para a amplificação de locos microssatélites de *P. helleri*. CF: comprimento do fragmento esperado.

“Primers”	Seqüência (5' → 3')	Repetição	CF (pb)
Mbi 11	F....CGTTCGTTCTTCCCAAT R....GATCGAATTTAACCGGC	(AAC) ₈ ATC(GCC) ₅	152
Mbi 28	F....TTTTATCGCTCCTATCCTCC R....AATCCAACAGGACGGTGT	(TCC) ₆ ACC(TCC) ₃	108
Mbi 32	F....CTTTATCCGGTGCCTCGAA R....GAAGGCATTCCGGTTGTT	(GGA) ₄ (GGAGAA) ₅	154
Mbi 33	F....ATCACCTAACTTGGCATCCC R....GATCAAGGGCCAAGAGGA	TTC(TCC) ₂ TCTTCC(TCT) ₂ (TCC) ₃	140
Mbi 201	F.....GTTTAATCGCCCAAAGAGGC R....GTTGACGAGAAGGAGCACG	(CTT) ₁₀ CTC(CTT) ₅ CCT ₉ (CTT) ₂	152
Mbi 215	F....AGAGACGAAAAGTGGCGG R....GATAGCGGCGGAAGAGATT	(TTC) ₆	92
Mbi 219	F....GCAGCGAAAGACTAATTTACC R....GACGTTGGAATGGAACTC	(AAT) ₄	151
Mbi 254	F....CAATCGTTGGAAGGGAAC R....GGACCTATACCCAAGTCCAT	(AAG) ₁₁	213
Mbi 278	F....GTTCTGTTTCGTGGTGAAT R....GTTGCCGAGAACTCTGACGAT	CTT(CTC) ₂ CTTCTCTGCTTCC(TCT) ₉ CCT TCG(TCT) ₂	113
Mbi 522	F....CCCTGGACAAATACAAACGTA R....GAACAATGCTCTTCTCCGAA	(TGC) ₄ TGT(TGC) ₃	136

3.4 - Análises Estatísticas

Inicialmente, as análises foram realizadas agrupando as colônias de acordo com as localidades em que foram coletadas: São Miguel do Anta, Teixeiras, Rio Vermelho, Porto Firme e Viçosa. Posteriormente, procedeu-se a análise de cada colônia pertencente às cinco localidades de coleta, a fim de estimar a variabilidade genética existente entre as colônias amostradas em uma mesma localidade.

A diversidade genética dentro das populações foi estimada a partir do cálculo da frequência alélica que pode ser estimada a partir do número de ocorrência das diferentes classes genotípicas. Assim, denominando a ocorrência de homozigotos na população de n_{ii} e a ocorrência de heterozigotos de n_{ij} , tem-se:

$$f(A_i) = \frac{2n_{ii} + \sum_{j=1, j \neq i}^a n_{ij}}{2N}$$

Sendo a o número de alelos presente no loco analisado e N o número total de indivíduos da população.

O número médio de alelos por loco (N_m) foi calculado pela razão entre o número total de alelos (A) e o número de locos analisados (L):

$$N_m = \frac{A}{L}$$

A porcentagem de locos polimórficos (P) foi calculado como se segue:

$$P = \frac{(\text{número de locos polimórficos})}{(\text{número total de locos analisados})} \times 100$$

O loco foi considerado polimórfico utilizando o critério de neste loco o alelo mais comum apresentar frequência menor que 95%.

As taxas de heterozigosidade esperada (H_E) e heterozigosidade observada (H_O) foram calculadas a partir das frequências alélicas, ou seja:

$$H_O = 1 - \sum_{j=1}^a p_i^2$$

Onde p_i corresponde a frequência dos genótipos homozigotos.

$$H_E = 1 - \sum_{j=1}^a P_i^2$$

Onde P_i corresponde a frequência alélica estimada do i-ésimo alelo.

O conteúdo médio de informação polimórfica (PIC) também foi calculado para caracterizar a diversidade dentro das populações. Este valor fornece uma estimativa do poder discriminatório do marcador por considerar não somente o número de alelos por loco, mas também a frequência relativa desses alelos e é expresso por:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^a p_i^2 - \sum_{i,j=1}^a \sum_{(i \neq j)} p_i^2 p_j^2$$

A análise da diversidade genética entre as populações foi realizada a partir da obtenção da matriz entre pares de colônias, utilizando como medida de dissimilaridade a distância euclidiana que é dada por:

$$d_{ij} = \sqrt{\sum_j (Y_{ij} - Y_{i'j})^2}$$

Sendo Y_{ij} a observação no i-ésimo genótipo para a j-ésima localidade.

Posteriormente, procedeu-se a análise de agrupamento empregando o método UPGMA (média aritmética não ponderada) para a obtenção do dendrograma. A projeção tridimensional das distâncias no plano também foi realizada para avaliar a dissimilaridade existente entre as populações analisadas.

A distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações foi avaliada pela estatística F (Wright, 1951; 1978). A diferenciação genética das populações foi estimada a partir de três coeficientes de fixação que

segundo Nei (1977) podem ser definidos como razões entre as estatísticas H (definidas por Nei, 1973). Assim, tem-se que:

- F_{IT} mede o desvio das freqüências genotípicas da população total em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_O}{H_T}$$

- F_{ST} mede estes desvios entre as subpopulações

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

- F_{IS} mede a fixação ao nível de indivíduos

$$F_{IS} = \frac{H_S - H_O}{H_S}$$

Considerando-se que:

H_T : corresponde à diversidade genética (ou heterozigosidade) na população total, dada por:

$$H_T = 1 - \frac{\left[\left(\sum_{l=1}^a \sum_{k=1}^a x_{ilk} \right) / s \right]^2}{I}$$

H_S : corresponde à diversidade genética (ou heterozigosidade) esperada entre subpopulações, dada por:

$$H_S = 1 - \frac{\left(\sum_{i=1}^a \sum_{l=1}^a \sum_{k=1}^a x_{ilk}^2 \right)}{Is}$$

H_O : corresponde à diversidade genética (ou heterozigosidade) observada dentro de subpopulações, dada por:

$$H_O = 1 - \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{l=1}^a x_{il}}{Is}$$

sendo,

x_{il} = frequência de heterozigotos do loco l na população i

x_{ilk} = frequência do alelo k do loco l na população i

s = número de populações

l = número de locos

A análise de variância molecular (AMOVA – Excoffier *et al.*, 1992) também foi realizada para estimar a variabilidade genética entre e dentro das populações, empregando um nível hierárquico para a análise de cada colônia coletada em uma dada localidade e dois níveis hierárquicos para a análise que continha as colônias agrupadas conforme a localidade de coleta.

O programa Genes, versão Windows (Cruz, 2007) foi utilizado para a realização de todas as análises estatísticas.

4. RESULTADOS

4.1 - Condições de amplificação

Dez “primers” microssatélites foram selecionados para as análises genéticas das populações a serem avaliadas no presente trabalho. A seleção foi realizada a partir da análise do padrão de amplificação obtido com cada “primer”, após a realização de testes de variação de temperatura e número de ciclos. O número de ciclos de amplificação foi determinado baseando-se inicialmente naqueles utilizados por Peters *et al.* (1998) e Brito (2005). Na Tabela 3 encontram-se as adaptações das condições de amplificação realizadas.

Tabela 3. Condições de amplificação dos locos microssatélites em *P. helleri*. Ta (°C): temperatura de pareamento dos “primers”, N° ciclos: número de ciclos executados para cada “primer”.

“Primers”	Ta ¹ (°C)*	N° Ciclos ^{1*}	Ta ² (°C)*	N° Ciclos ^{2*}	Ta ³ (°C)*	N° Ciclos ^{3*}
Mbi 11	55	40	55	30	55	40
Mbi 28	57,5	40	60	30	56,5	40
Mbi 32	57,5	40	65	30	65	30
Mbi 33	60	40	65	30	63,2	40
Mbi 201	60	40	65	30	63,2	30
Mbi 215	57,5	40	65	30	65	30
Mbi 219	57,5	40	-	-	55	30
Mbi 254	55	40	-	-	63,2	30
Mbi 278	60	40	65	30	60,6	40
Mbi 522	60	40	-	-	55,3	30

* Ta¹ e N° Ciclos¹ – temperatura de pareamento e número de ciclos de amplificação utilizados para *M. bicolor* (Peters *et al.*, 1998);

Ta² e N° Ciclos² – temperatura de pareamento e número de ciclos de amplificação utilizados para *P. helleri* (Brito, 2005);

Ta³ e N° Ciclos³ – temperatura de pareamento e número de ciclos de amplificação utilizados no presente trabalho.

(-) - “primer” não utilizado.

4.2 - Análise populacional

A diversidade alélica acessada nas 66 colônias analisadas e caracterizadas com os dez locos microssatélites selecionados, mostrou um baixo nível de polimorfismo genético. O número de alelos/loco variou de um a três, com um número médio de 1,5 alelos/loco. Dos dez “primers” utilizados, quatro (Mbi 32, Mbi 215, Mbi 254 e Mbi 278) foram polimórficos em todas as colônias analisadas, com exceção daquelas amostradas em Rio Vermelho e Porto Firme para as quais o loco Mbi 32 foi monomórfico (Tabela 4). Portanto, considerando-se o critério utilizado do loco ser polimórfico quando o alelo mais comum apresentar frequência menor que 95%, verificou-se que a porcentagem de locos polimórficos foi de 40%. Apenas nos locos Mbi 215 e Mbi 254 foram detectados genótipos heterozigotos (Figuras 2 e 3).

Tabela 4. Variabilidade genética estimada nas populações de *P. helleri* analisadas.

Locos	Alelos	São Miguel do Anta	Teixeiras	Rio Vermelho	Porto Firme	Viçosa
Mbi 32	A	0,276	0,138			0,368
	B	0,724	0,862	1,000	1,000	0,632
Mbi 215	A	0,203	0,325	0,208	0,409	0,532
	B	0,797	0,675	0,792	0,591	0,468
Mbi 254	A	0,732	0,758	0,383	0,629	0,500
	B	0,155	0,142	0,300	0,333	0,011
	C	0,113	0,100	0,317	0,038	0,489
Mbi 278	A	0,283	0,603	0,467	0,727	0,095
	B	0,717	0,397	0,533	0,273	0,905
H_E		0,155	0,155	0,149	0,137	0,164
H_O		0,083	0,060	0,100	0,101	0,162
PIC		0,130	0,127	0,123	0,108	0,127

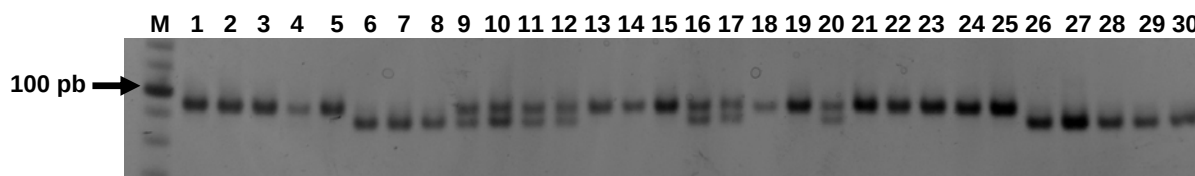


Figura 2. Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida a 8% apresentando alguns dos genótipos do loco Mbi 215 verificados em operárias de *P. helleri* coletadas em Porto Firme. M - marcador molecular de 10 pb.

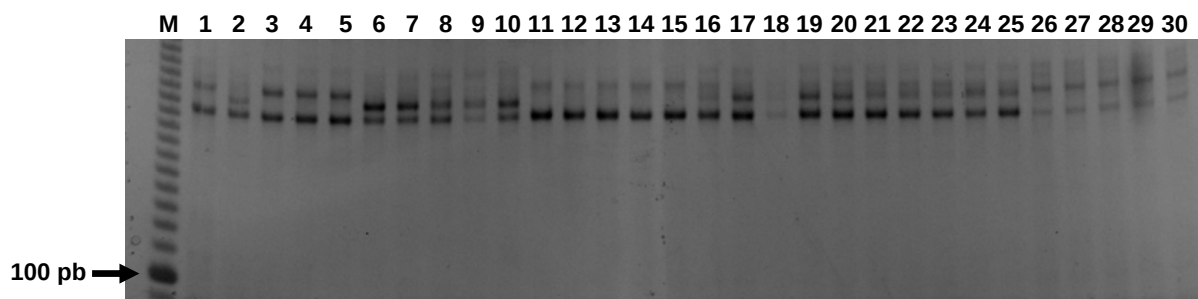


Figura 3. Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida a 8% apresentando alguns dos genótipos do loco Mbi 254 verificados em operárias de *P. helleri* coletadas em Porto Firme. M - marcador molecular de 10 pb.

Considerando-se todas as colônias de *P. helleri* analisadas no presente estudo, as heterozigosidades média esperada e observada foram 0,180 e 0,107, respectivamente. Considerando as colônias agrupadas de acordo com as localidades em que foram coletadas, os valores de heterozigosidade média observada (H_o) variaram de 0,060 a 0,162 para as colônias coletadas em Teixeira e Viçosa, respectivamente (Tabela 4 e Figura 4).

O maior valor do conteúdo médio de informação polimórfica (PIC), calculado para estimar a informatividade de cada "primer", foi verificado nas colônias provenientes de São Miguel do Anta (0,130), enquanto o menor valor foi detectado nas colônias coletadas em Porto Firme (0,108) (Tabela 4 e Figura 4).

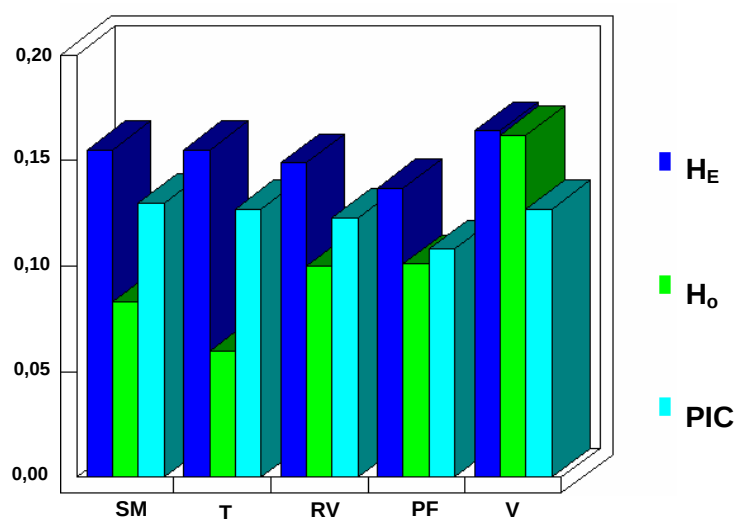


Figura 4. Distribuição das heterozigosidades média esperada (H_E) e observada (H_O) e do conteúdo médio de informação polimórfica (PIC) nas populações de *P. helleri*. SM: São Miguel do Anta, T: Teixeira, RV: Rio Vermelho, PF: Porto Firme e V: Viçosa.

Para estimar os valores da estatística F de Wright considerou-se cada colônia analisada como uma subpopulação. A avaliação desta estatística mostrou alto valor de F_{ST} (0,551) indicando que as subpopulações são geneticamente diferentes. O valor negativo de F_{IS} (-0,363) na maioria das subpopulações mostrou um excesso de heterozigotos em relação às mesmas. Entretanto, verificou-se uma deficiência de heterozigotos em relação à população total, de acordo com o valor positivo de F_{IT} (0,388) (Tabela 5).

Tabela 5. Estimativa da estatística F de Wright e fluxo gênico para as populações de *P. helleri*.

Localidades	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
São Miguel do Anta	-0,243	0,554	0,446
Teixeiras	0,002	0,612	0,612
Rio Vermelho	-0,678	0,544	0,235
Porto Firme	-0,483	0,493	0,248
Viçosa	-0,519	0,423	0,123
População total	-0,363	0,551	0,388

A análise de agrupamento, utilizando o algoritmo UPGMA, demonstrou que as colônias coletadas em Viçosa são geneticamente mais divergentes daquelas coletadas nas demais localidades estudadas (Figura 5). Contudo, ao se analisar as colônias amostradas individualmente, não se verificou a formação de grupos correspondentes a cada localidade estudada (Figura 6).

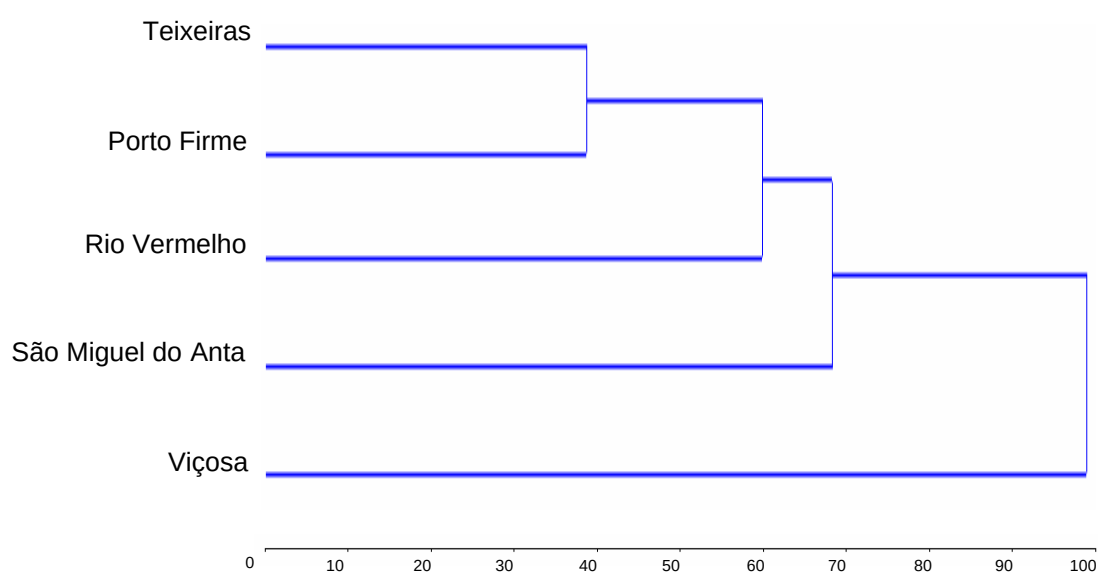


Figura 5. Dendrograma, obtido por UPGMA, ilustrando a distância Euclidiana entre as populações de *P. helleri* analisadas.

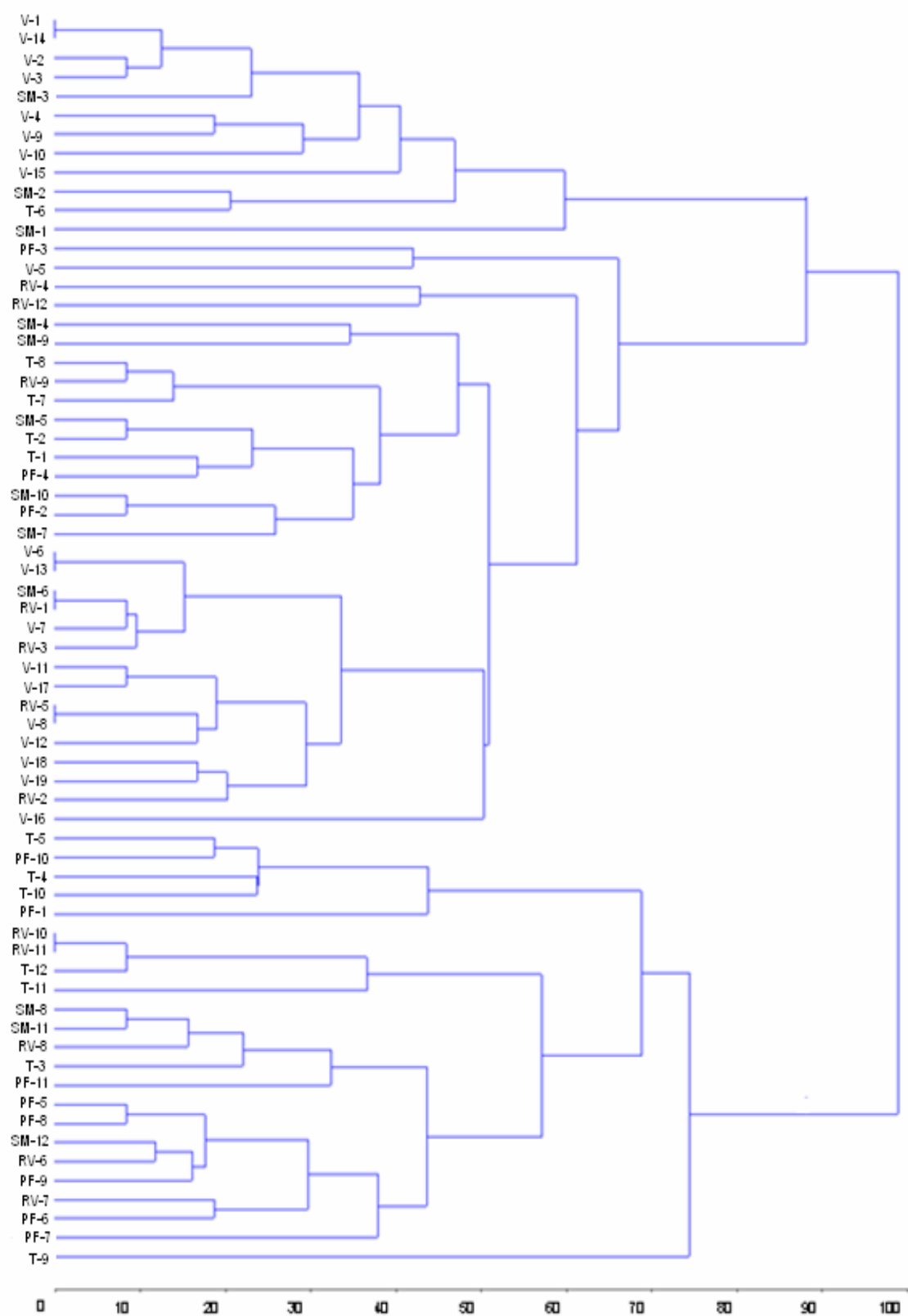


Figura 6. Dendrograma, obtido por UPGMA, ilustrando a distância Euclidiana entre as 66 colônias de *P. helleri* analisadas.

O gráfico de projeção tridimensional da distância no plano (Figura 7) confirma a falta de correspondência entre as colônias analisadas e as localidades em que foram coletadas.

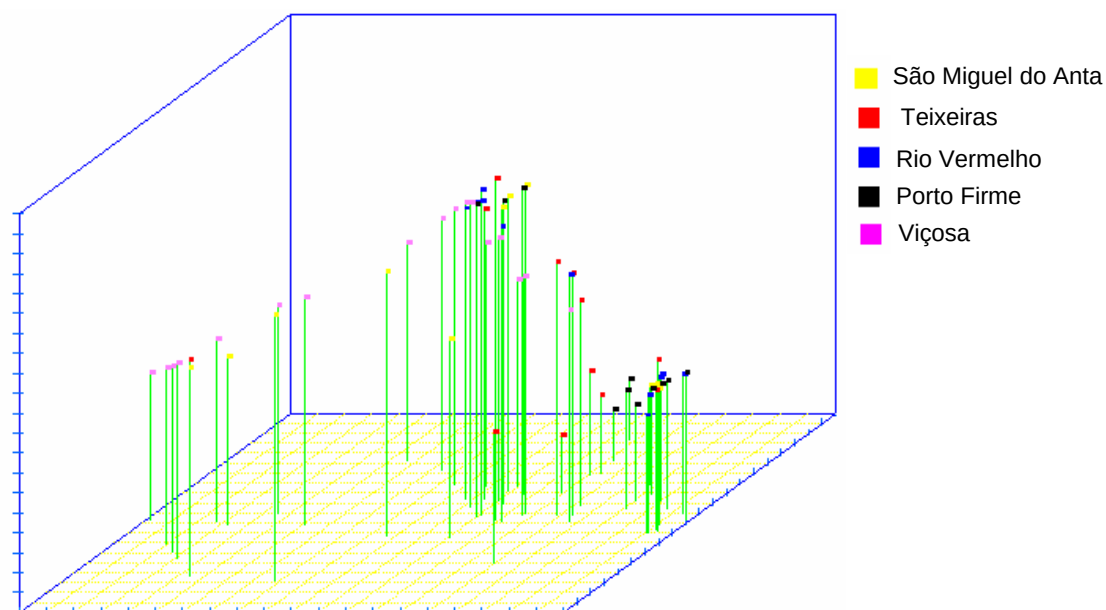


Figura 7. Projeção tridimensional das distâncias no plano para as 66 colônias de *P. helleri* analisadas. Distorção = 11,83%; Estresse = 16,55% e Correlação entre as distâncias originais e estimadas = 0,95.

A análise da variância molecular (AMOVA) confirmou o alto grau de subdivisão das populações de *P. helleri* amostradas nas cinco localidades (Tabela 7). Esta Tabela apresenta que 61,22% da variação genética total é explicada pela diversidade genética existente entre as colônias coletadas nas diferentes localidades, enquanto que 23,24% é devido a variações existentes dentro das próprias colônias.

Tabela 7. Análise da variância molecular (AMOVA) nas 66 colônias de *P. helleri* analisadas. GL: grau de liberdade, SQ: soma de quadrados, QM: quadrado médio e Estimativa: estimativa dos componentes de variância.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Estimativa	%
Localidades	4	35,538	8,884	0,103	15,54
Colônia/Localidade	61	123,595	2,026	0,405	61,22
Dentro da Colônia	264	40,600	0,154	0,154	23,24
TOTAL	329	199,733	0,607	0,662	100,0

A partir deste resultado considerou-se importante conhecer o nível de variabilidade genética existente entre as colônias coletadas em cada localidade separadamente.

A variabilidade genética detectada nas colônias de cada localidade está representada na Figura 8. Os valores de heterozigosidade esperada (H_E) variaram de 0,0 (SM-8) a 0,159 (V-10), enquanto que a heterozigosidade observada (H_O) variou de 0,0 (SM-8, T-9, RV-4, PF-11) a 0,20 (SM-12, RV-5, V-1, V-8, V-10, V-14, V-17 e V-18). O menor valor de PIC foi detectado na colônia SM-8 (0,0), enquanto a colônia V-10 apresentou o maior valor (0,128).

Na Figura 9 encontra-se a projeção tridimensional da distância genética entre as colônias coletadas em cada localidade analisada. Verifica-se que as colônias SM-4 a 12 coletadas em pontos próximos em São Miguel do Anta reuniram-se formando dois grupos distintos, enquanto que SM-1 a 3 reuniram-se em um outro grupo. Em Teixeira, a colônia T-6 ficou isolada das demais que se subdividiram formando dois grupos: no grupo 1 foram incluídas as colônias T-7 a 10 e T-1 a 5, enquanto que no grupo 2 encontram-se outras duas colônias (T-11 e 12).

Com relação às abelhas coletadas em Rio Vermelho, observa-se uma maior proximidade entre as colônias RV-6 a 8 e RV-10 e 11. O mesmo é observado entre as colônias RV-1 a 3, RV-4 e 5 e RV-12. Nota-se ainda, que a colônia RV-9 encontra-se isolada das demais colônias.

Em Porto Firme verifica-se que a colônia PF-3 é geneticamente divergente de PF-2 e 4 que também foram coletadas em um local próximo a PF-3. Similarmente, as colônias PF-9 a 11 se reuniram em grupos distintos, com PF-9 e 11 juntas em um mesmo grupo e PF-10 presente em outro grupo, juntamente com PF-1.

Colônias coletadas em um mesmo local em Viçosa também não se reuniram em um mesmo grupo, como demonstrado pelas colônias que estão incluídas nos grupos 1 (V-1 e 2) e 2 (V-3 e 4), assim como as colônias, V-11 a 19 que se encontram distribuídas nos grupos 1 (V-14 e 15) e 3 (V-11 a 13 e V-16 a 19).

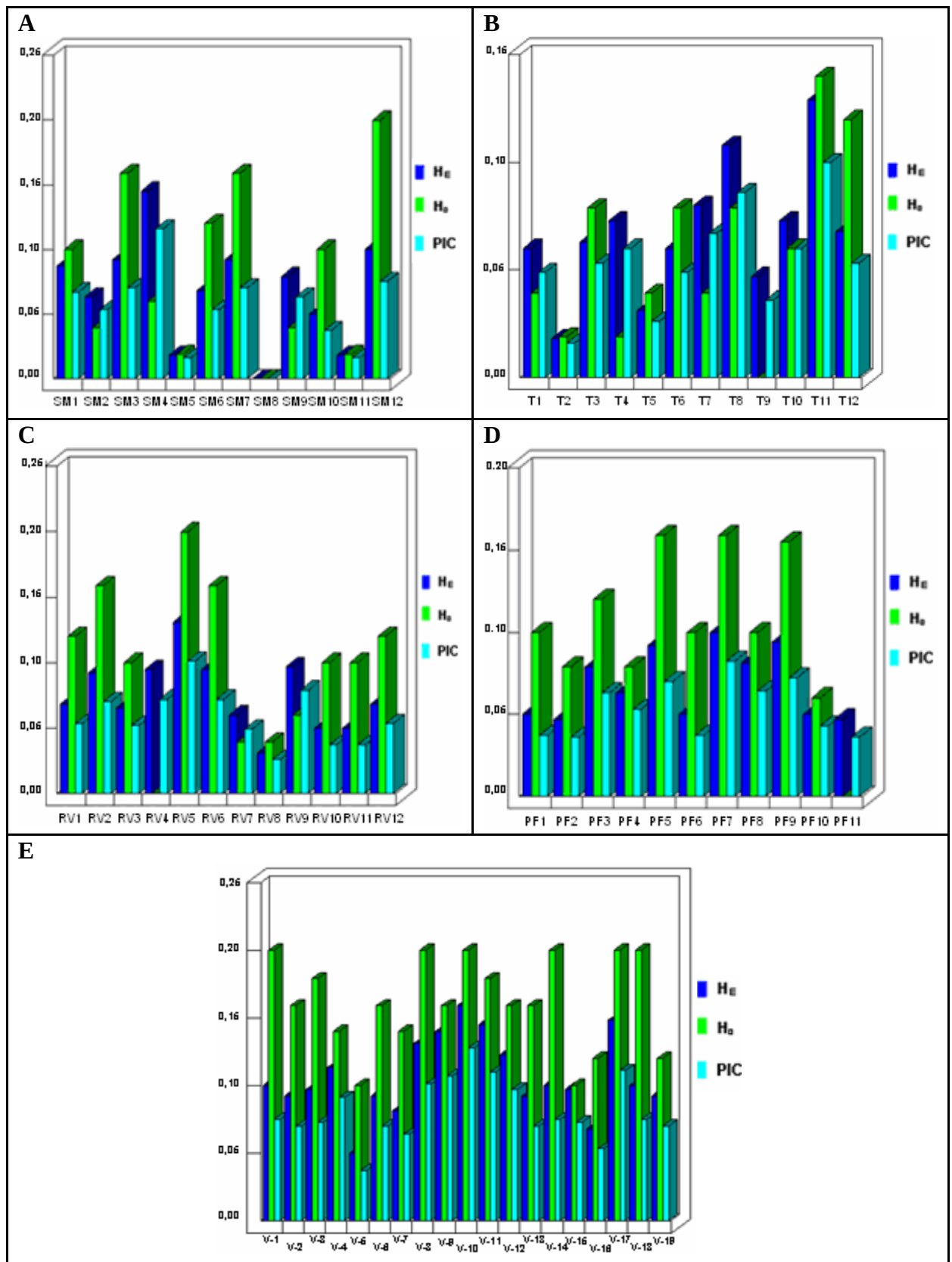


Figura 8. Distribuição das heterozigosidades esperada (H_E) e observada (H_O) e conteúdo médio de informação polimórfica (PIC) das colônias de *P. helleri* coletadas em São Miguel do Anta (A), Teixeira (B), Rio Vermelho (C), Porto Firme (D) e Viçosa (E).

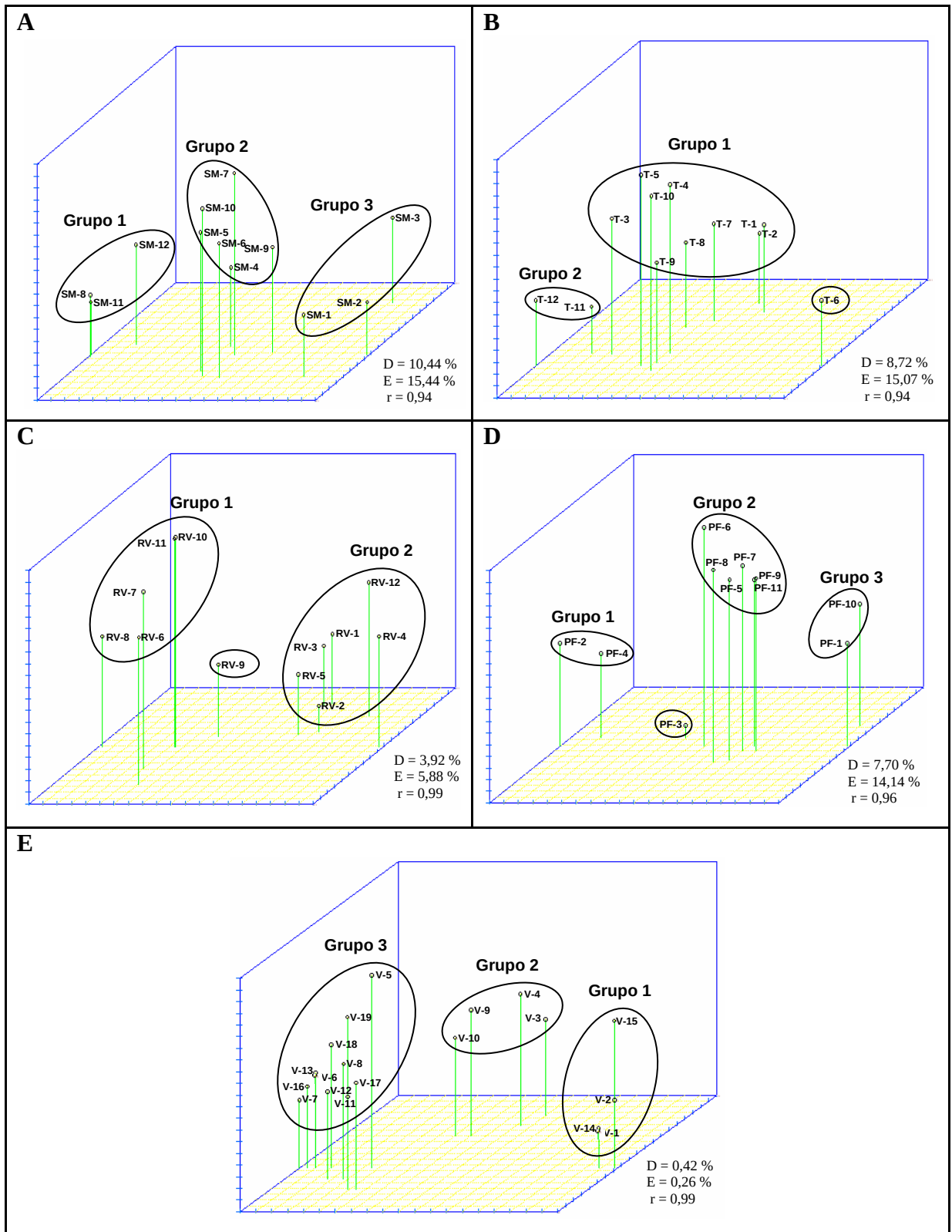


Figura 9. Projeção tridimensional das distâncias genéticas para as colônias de *P. helleri* coletadas em São Miguel do Anta (A), Teixeira (B), Rio Vermelho (C), Porto Firme (D) e Viçosa (E). D: distorção, E: estresse e r: correlação entre as distâncias originais e estimadas.

A análise da variância molecular (AMOVA) realizada com as colônias coletadas em cada localidade revelou que, no mínimo 64% da variação genética total é atribuída à variação existente entre as colônias, conforme mostrado na Tabela 8.

Tabela 8. Análise da variância molecular (AMOVA) das populações de *P. helleri* coletadas em cada localidade analisada. GL: grau de liberdade, SQ: soma de quadrados, QM: quadrado médio e Estimativa: estimativa dos componentes de variância.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Estimativa	%
<i>São Miguel do Anta</i>					
Entre Colônias	11	19,983	1,818	0,337	72,321
Dentro de Colônias	48	6,200	0,129	0,129	27,678
TOTAL	59	26,183	0,444	0,466	100,0
<i>Teixeiras</i>					
Entre Colônias	11	26,200	2,382	0,429	64,808
Dentro de Colônias	48	11,200	0,233	0,233	35,192
TOTAL	59	37,400	0,634	0,663	100,0
<i>Rio Vermelho</i>					
Entre Colônias	11	26,983	2,453	0,469	81,233
Dentro de Colônias	48	5,200	0,108	0,108	18,766
TOTAL	59	32,183	0,545	0,577	100,0
<i>Porto Firme</i>					
Entre Colônias	10	17,818	1,782	0,338	78,813
Dentro de Colônias	44	4,000	0,091	0,091	21,186
TOTAL	54	21,818	0,404	0,429	100,0
<i>Viçosa</i>					
Entre Colônias	18	37,073	2,059	0,371	64,372
Dentro de Colônias	76	15,600	0,205	0,205	35,627
TOTAL	94	52,673	0,560	0,576	100,0

5. DISCUSSÃO

Baixos níveis de variabilidade genética foram detectados nas populações de *P. helleri* estudadas, o que pode estar relacionado com o pequeno número de locos microssatélites analisados. Segundo Nei e Roychoudhury (1974) é aconselhável utilizar, no mínimo, 20 locos para estimar a diversidade genética, pois diferentes locos apresentam níveis distintos de heterozigosidade. No presente trabalho, entretanto, analisou-se um menor número de locos porque, de 25 “primers” microssatélites descritos para *M. bicolor* testados, apenas 10 apresentaram produtos de amplificação satisfatórios e destes, somente quatro foram polimórficos. Resultado semelhante foi obtido por Brito (2005) e Francisco *et al.* (2006) ao analisar populações de *P. helleri* coletadas em diferentes estados brasileiros.

Com relação ao número médio de alelos por loco, os valores obtidos novamente se assemelham com aqueles encontrados por Brito (2005) e Francisco *et al.* (2006). A baixa diversidade alélica detectada pode estar relacionada com o uso de “primers” heterólogos, visto que um maior número de alelos pode ser identificado quando se emprega “primers” homoespecíficos. Tal fato pode ser confirmado a partir da análise de trabalhos de isolamento e caracterização de locos microssatélites para diferentes espécies de abelha e trabalhos que utilizam estes “primers” para a análise de espécies proximalmente relacionadas (Peters *et al.*, 1998; Paxton *et al.*, 1999; Azuma *et al.*, 2001, Green *et al.*, 2001). Paxton *et al.* (1999), por exemplo, desenvolveram cinco “primers” microssatélites para *Scaptotrigona postica* e verificaram uma média de 6,6 alelos por loco para esta espécie. Ao comparar este valor com aquele obtido em outras espécies de abelhas pertencentes ao mesmo gênero, estes autores observaram uma redução significativa no número médio de alelos por loco. A espécie *Scaptotrigona pectoralis* apresentou uma média de 2,2 alelos/loco, enquanto que 1,8 alelos/loco foi verificado para *Scaptotrigona tubida*.

O loco Mbi 254 que corresponde a um microssatélite perfeito em *M. bicolor*, foi o que apresentou o maior número de alelos em *P. helleri* (3 alelos). Esta informação corrobora a proposta de que microssatélites perfeitos apresentam mais alelos do que microssatélites interrompidos

(Pépin *et al.*, 1995). Acredita-se que a presença de bases extras interrompendo a estrutura repetitiva possa estabilizar as regiões microssatélites, reduzindo a ocorrência de erros da DNA polimerase durante a replicação ou reparo e, conseqüentemente, possam resultar em menores níveis de polimorfismos (Pépin *et al.*, 1995; Jin *et al.*, 1996). Entretanto, somente após análise de sequenciamento deste loco é que se pode certificar que ele também corresponde a um microssatélite perfeito em *P. helleri*.

Nei (1987) discute que aumentando-se o número de indivíduos analisados, um maior número de alelos pode ser identificado. Contudo, de acordo com o tipo de reprodução da maioria dos meliponíneos, o mais aconselhável seria aumentar o número de colônias por localidade. Isto porque, considerando-se que a rainha tenha se acasalado com um único macho e que seja heterozigota para um determinado loco e o macho apresente um alelo diferente do seu, poderão ser detectados nesta colônia, no máximo, três alelos para o loco microssatélite em análise. Em contrapartida, operárias produzidas do acasalamento entre rainha homozigota e macho com um alelo diferente da rainha apresentarão o mesmo genótipo, evidenciando assim a existência de apenas dois alelos na colônia. Portanto, verifica-se que o aumento no número de indivíduos amostrados para cada colônia não solucionará o problema do número de alelos detectados.

A otimização do protocolo para separação dos fragmentos de microssatélites seria outra alternativa para se detectar um maior número de alelos. A separação de alelos cujos tamanhos sejam diferentes em apenas um ou dois nucleotídeos é mais difícil de ser visualizada em géis nativos de poliacrilamida, visto que estes apresentam menor poder de separação quando comparados com géis desnaturantes de poliacrilamida (Bertini, 2004). Os géis desnaturantes permitem analisar os produtos de PCR de acordo com suas seqüências de pares de bases e não a partir de diferenças no tamanho dos produtos. Moléculas de DNA com o mesmo tamanho, mas com seqüências de nucleotídeos diferentes apresentam comportamento eletroforético diferente quando expostas aos agentes desnaturantes (uréia e formamida). A seqüência de nucleotídeos de um fragmento de DNA definirá

a posição em que o DNA de fita dupla irá desnaturar-se passando a fita simples, interrompendo sua migração no gel (Muyzer *et al.*, 1993).

De forma geral, os himenópteros apresentam baixos níveis de variabilidade genética (Packer e Owen, 1992). Contudo, a heterozigosidade média observada nas populações de *P. helleri* revelou valores muito menores do que aqueles encontrados em trabalhos com insetos pertencentes a esta ordem utilizando marcadores microssatélites (Paxton *et al.*, 1996; Widmer *et al.*, 1998; De La Rúa *et al.*, 2001, 2003). O baixo nível de heterozigosidade observada também pode ser decorrente dos poucos locos microssatélites polimórficos obtidos no presente trabalho, pois dos dez locos analisados, quatro foram polimórficos e destes, apenas em dois foram detectados genótipos heterozigotos.

Francisco *et al.* (2006) encontraram resultado semelhante ao analisar populações de três espécies de abelhas sem ferrão utilizando “primers” heterólogos. Portanto, estes dados corroboram a proposta de Pépin *et al.* (1995) de que o uso destes “primers” pode contribuir para a redução da detecção dos reais níveis de heterozigosidade das populações analisadas. Além desta explicação, os autores ressaltam a possibilidade da ocorrência de alelos nulos que potencialmente podem resultar em erros de genotipagem. A presença destes alelos está associada com falhas durante o processo de amplificação, devido a alterações dos nucleotídeos no sítio de ligação dos “primers”, resultando em redução ou perda completa do produto de PCR (Paetkau e Strobeck, 1995). De acordo com Callen *et al.* (1993), alelos nulos e subdivisão de populações são os principais fatores que dificultam a detecção de heterozigotos, enquanto que endogamia e deriva genética são os fatores responsáveis pela redução de heterozigotos em uma população.

Brito (2005) sugere que a baixa variabilidade genética encontrada nas populações de *P. helleri* coletadas em diferentes estados brasileiros esteja relacionada com a presença de alelos nulos e discute a importância de se confeccionar “primers” específicos para esta espécie. A autora ainda sugere que a degradação das coberturas vegetais nas áreas de endemismo desta espécie pode estar afetando a estrutura genética das populações de *P.*

helleri, porém isto parece improvável, visto que esta abelha pode ser encontrada em ambientes naturais e perturbados.

Os elevados valores de F_{ST} encontrados para as colônias analisadas indicam que as populações coletadas em cada localidade são geneticamente divergentes. Este resultado é coerente com aquele obtido por Araújo *et al.* (2004) ao analisar as implicações espaciais da distância máxima de vôo para algumas espécies de meliponíneos. Os autores verificaram que a distância máxima de vôo das abelhas está relacionada ao tamanho corporal, especialmente ao tamanho generalizado das asas. Discute-se ainda que o tamanho corporal pode ser um fator limitante para a capacidade de dispersão das populações e atividade de enxameagem. Dentre as espécies de meliponíneos analisadas, *P. cupira* apresentou distância máxima de vôo de 1710 m. Considerando-se que *P. cupira* e *P. helleri* apresentam tamanho corporal semelhante, esta informação da capacidade de vôo pode ser estendida a *P. helleri*, o que justifica a alta estruturação observada.

A análise de agrupamento demonstrou que as populações de São Miguel do Anta, Teixeiras e Porto Firme são geneticamente mais próximas da população de Rio Vermelho, do que da população de Viçosa, apesar de Rio Vermelho estar geograficamente mais afastado destas localidades do que Viçosa.

De acordo com os genótipos observados nestas colônias, pode-se considerar que todas as populações analisadas sejam similares, pois compartilham alelos. Porém, conforme discutido acima seria improvável que abelhas da região de Viçosa tenham se dispersado até a localidade de Rio Vermelho e/ou vice-versa. Adicionalmente, considerando-se que as taxas de mutação nos locos microssatélites são da ordem de 10^{-6} a 10^{-2} (Dallas, 1992), pode-se supor que os alelos presentes em Rio Vermelho, tenham surgido de modo independente, nesta localidade e, muito provavelmente, não representem os mesmos alelos encontrados nas outras localidades. Assim, o sequenciamento dos locos microssatélites das colônias coletadas nas diferentes localidades confirmaria esta hipótese, evidenciado melhor a relação entre as mesmas.

A análise da projeção tridimensional da distância no plano confirmou que as colônias não se agruparam de acordo com a localidade na qual foram coletadas e, mesmo quando se analisou as colônias de cada localidade separadamente, ainda assim não se verificou um agrupamento, preferencial, entre as colônias presentes em um mesmo ponto de coleta. Porém, a projeção tridimensional apresentou valores de eficiência adequados, com níveis de distorção e estresse inferiores a 20% e correlação entre as distâncias originais e estimadas superior a 0,95, o que demonstra que a dispersão gráfica representa bem as distâncias genéticas entre as colônias. Assim, este resultado sugere que rainhas virgens não aparentadas podem ter fundado seus ninhos, um próximo do outro, e que não necessariamente os ninhos existentes em um mesmo ponto de coleta, correspondam a subdivisões de um único ninho.

Portanto, a partir dos dados obtidos, estudos mais detalhados, envolvendo um maior número de colônias e utilizando “primers” homoespecíficos devem ser realizados para que se possa obter dados mais conclusivos a respeito da estrutura genética das populações de *P. helleri*.

6. CONCLUSÕES GERAIS

- Baixos níveis de variabilidade genética foram detectados nas colônias de *P. helleri* analisadas.
- Devido ao pequeno número de locos polimórficos, não foi possível diferenciar as populações coletadas nas cinco localidades analisadas.
- Foi verificada uma forte estruturação genética entre as colônias analisadas.
- A análise de um maior número de colônias e a utilização de “primers” homoespecíficos poderão fornecer dados mais conclusivos sobre a estrutura genética das populações de *P. helleri*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOZE, M.E., DREZEN, J.M., RENALT, S., PREIQUET G. (1994). Analysis of the reproductive potential of diploid males in the wasp *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera: Ichneumonidae). Bull. Entomol. Res. 84:213-218.
- ARAÚJO, E.D., COSTA, M., CHAUD-NETO, J., FOWLER, H.G. (2004). Body size and flight distance in stingless bees (Hymenoptera: Meliponini): inference of flight range and possible ecological implications. Braz. J. Biol. 64(3B): 563-568.
- AZEVEDO, G.G. (1997). Atividade de vôo e determinação do número de instares larvais em *Partamona helleri* (Friese) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Viçosa, UFV, Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 64p.
- AZEVEDO, G.G., ZUCCHI, R. (2000). Relações etológicas entre *Partamona* Schwarz e *Parapartamona* Schwarz (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Anais do IV Encontro sobre Abelhas. Ribeirão Preto – SP. 258-264.
- AZUMA, N., TAKAILASIH. J., KIDOKORO, M., HIGASIH, S. (2005). Isolation and characterization of microsatellite loci in the bee *Ceratina flavipes*. Mol. Ecol. Notes 5:433-435.
- BALLOUX, F., LUGON-MOULIN, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Mol. Ecol. 11:155-165.
- BAWA, K.S., BULLOCK, S.H., PERRY, D.R., COVILLE, R.E., GRAYUM, M.H. (1985). Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. II. Pollination mechanisms. Am. J. Bot. 72:346-356.
- BAWA, K.S. (1990). Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. An. Rev. Ecol. Syst. 21:399-422.
- BERKELHAMER, R.C. (1983). Intraspecific genetic variation and haplodiploidy, eusociality, and polygyny in the Hymenoptera. Evolution 37:540-545.
- BERTINI, C.H.C.M. (2004). Caracterização e análise de diversidade genética em algodoeiro herbáceo por marcadores microssatélites e genealogia. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. 109p.

- BEYE, M., HASSELMANN, M., FONDRK. M.K., PAGE, R.E., OMHOLT, S.W. (2003). The gene CSD is the primary signal for sexual development in the honey bee and encodes a new SR-type protein. *Cell* 114:419-429.
- BICHARA, M., PINET, I., SCHUMACHER, S., FUCHS, R. (2000). Mechanisms of dinucleotide repeat instability in *Escherichia coli*. *Genetics* 154:533-542.
- BIGGIN, M.D., TJIAN, R. (1988). Transcription factors that activate the ultrabithorax promoter in developmentally staged extracts. *Cell* 53:699-711.
- BLOUIN, M.S. (2003). DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends Ecol. Evol.* 18:503-511.
- BOATO, A., BATTISTI, A. (1996). High genetic variability despite haplodiploidy in primitive sawflies of the genus *Cephaleia* (Hymenoptera, Pompilidae). *Experientia* 52:516-521.
- BORASCHI, D., DEL LAMA, M.A. (2004). Populational genetic structure and sociogenetic structure of cocoon masses of *Digelasinus diversipes* (Kirby, 1882) (Hymenoptera: Symphyta: Argidae). *Gen. Mol. Biol.* 27(3):385-390.
- BRITO, R.M., COSTA, M.A., POMPOLO, S.G. (1997). Characterization and distribution of supernumerary chromosomes in 23 colonies of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Braz. J. Genet.* 20:185-188.
- BRITO, R.M. (2005). Análise molecular e populacional de *Partamona mulata* (Moure in Camargo, 1980) e *Partamona helleri* (Fries, 1900) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 189p.
- BRITO-RIBON, R.M., MIYAZAWA, C.S., POMPOLO, S.G. (1999). First karyotype characterization of four species of *Partamona* (Fries, 1900) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) in Mato Grosso State, Brazil. *Cytobios.* 100:19-26.
- BROWN, M.J.F., SCHMID-HEMPEL, R., SCHMID-HEMPEL, P. (2003). Queen-controlled sex ratios and worker reproduction in the bumble bee *Bombus hypnorum*, as revealed by microsatellites. *Mol. Ecol.* 12:1599-1605.

- CALLEN, D.F., THOMPSON, A.D., SHEN, Y., PHILLIPS, H.A., RICHARDS, R.I., MULLEY, J.C., SUTHERLAND, G.R. (1993). Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellites markers. *Am. J. Hum. Genet.* 52:922-927.
- CAMARGO, J.M.F., PEDRO, S.R.M. (1992). Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hym., Apidae): a mini review. *Apidologie*, 23:1-32.
- CAMERON, E.C., FRANCK, P., OLDROYD, P. (2004). Genetic structure of nest aggregations and drone congregations of the southeast Asian stingless bee *Trigona collina*. *Mol. Ecol.* 13:2357-2364.
- CAMPOS, L.A.O. (1998). *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836. In: Machado, A.B.M., Fonseca, G.A.B., Machado, R.B., Aguiar, L.M., Lins, L.V. Livro Vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais. Belo Horizonte. Fundação Biodiversitas. 608p.
- CHOUDHARY, M., STRASSMANN, J.E., SOLÍS, C.R., QUELLER, D.C. (1993). Microsatellite variation in a social insect. *Biochem. Genet.* 31:87-96.
- COOK, J.M., CROZIER, R.H. (1995). Sex determination and population biology of the Hymenoptera. *Trends Ecol. Evol.* 10:281-286.
- COSTA, M.A., POMPOLO, S.G., CAMPOS, L.A.O. (1992). Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Rev. Bras. Genet.* 15:801-806.
- CRUZ, C.D. (2007). Programa Genes: Aplicativo Computacional em Genética e Estatística. Versão Windows – 2007. Viçosa, UFV.
- DALLAS, J.F. (1992). Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse, *Mamm. Genome* 3:452-456.
- DE LA RÚA, P., GALIÁN, J., SERRANO, J., MORITZ, F.A. (2001). Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands. *Mol. Ecol.* 10:1733-1742.
- DE LA RÚA, P., GALIÁN, J., SERRANO, J., MORITZ, F.A. (2003). Genetic structure of Balearic honeybee populations based on microsatellite polymorphism. *Genet. Sel. Evol.* 35:339-350.

- ERIKSSON, O., BREMER, B. (1992). Polination systems, dispersal modes, life forms, and diversification rates in angiosperms families. *Evolution* 46:258-266.
- ESTOUP, A., SOLIGNAC, M., HARRY, M., CORNUET, J.M. (1993). Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatélites in two insects species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Res.* 21: 1427-1431.
- EVANS, J.D. (1993). Parentage analyses in ant colonies using simple sequence repeat loci. *Mol. Ecol.* 2:393-397.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E., QUATTRO, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- FARIA, G.M. (1994). A flora e a fauna apícola de um ecossistema de campo rupestre, Serra do Cipó/MG, Brasil: composição, fenologia e suas interações. Dissertação de Doutorado. UNESP, Rio Claro, 239p.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. (1998). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CERNAGEM, 220p.
- FIELD, D., WILLS, C. (1998). Long polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proc. Royal Soc. Lon.* 263:209-215.
- FRANCISCO, F.O. (2002). Diversidade genética de populações da abelha sem ferrão *Plebeia remota*: análise do DNA mitocondrial e microsatélites. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. 147p.
- FRANCISCO, F.O., BRITO, R.M., ARIAS, M.C. (2006). Allele number and heterozygosity for microsatellite loci in different stingless bee species (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). *Neotrop. Entomol.* 35(5):638-643.
- GERTSCH, P., PAMILO, P., VARVIO, S.L. (1995). Microsatellite reveal high genetic diversity within colonies of *Camponotus* ants. *Mol. Ecol.* 4:257-260.
- GILMOUR, D.S., THOMAS, G.H., ELGIN, S.C. (1989). *Drosophila* nuclear proteins bind to regions of alternating C and T residues in gene promoters. *Science* 245:1487-1490.

- GOSLDSTEIN, D.B., SCHLÖTTERER, C. (1999), Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press. New York, 368p.
- GRAUR, D. (1985). Gene diversity in Hymenoptera. *Evolution* 39(1):190-199.
- GREEN, C.L., FRANCK, P., OLDROYD, P. (2001). Characterization of microsatellite loci for *Trigona carbonaria*, a stingless bee endemic to Australia. *Mol. Ecol.* 1:89-92.
- GREEN, C.L., OLDROYD, B.P. (2002). Queen mating frequency, maternity of males and diploid male production in the stingless bee *Trigona carbonaria*. *Insectes Soc.* 49:196-202.
- HALL, H.G. (1991) .Genetic characterization of honeybees through DNA analysis. In: The "African" honeybee. (M. Spivak, D.J.C., Fletcher, M.D., Breed, Eds.) Westview Press, Boulder, CO. 45-73.
- HAMADA, H., PETRINO, M.G., KAKUNAGA,T. (1982). A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionary diverse eukariotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:6465-6469.
- HENDERSON, S.T., PETES, T.D. (1992). Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 12:2749-2757.
- HUGHES, C.R., QUELLER, D.C. (1993). Detection of highly polymorphic microsatellite loci a species with little allozyme polymorphism. *Mol. Ecol.* 2:131-137.
- JIN, L., MACAUBAS, C., HALLMAYER, J., KIMURA, A., MIGNOT, E. (1996). Mutation rate varies among alleles at a microsatellite locus: phylogenetic evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:15285-15288.
- KERR, W.E., CARVALHO, G.A., NASCIMENTO, V.A. (1996). Abelha Uruçu. Biologia, Manejo e Conservação. Coleção Manejo da vida Silvestre. nº. 2. Belo Horizonte, Acangaú.
- KRESOVICH, S., SZEWC-McFADDEN, A.K., BLIEK, S.M. (1995). Abundance and characterization of simple-sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). *Theor. Appl. Genet.* 91:206-211.
- LA SALLE, J., GAULD,I.D. (1993). Hymenoptera: Their diversity and their impact on the diversity of other organisms. In: LaSalle, j., Gauld, I.D. (Eds.) Hymenoptera and Biodiversity. Wallingford, UK. 348p.

- LESTER, L.J., SELANDER, R.K. (1979). Population genetic soft haplodiploid insects. *Genetics* 92:1329-1345.
- LOPES, D.M. (2004). Diversidade e estrutura genética em populações de *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae) por análise de microssatélites. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 64p.
- MARTINS, C.C.C., DUARTE, O.M.P., SANTANA, S.E.A., DOMINGUES, A.M.T., COSTA, M.A., ALVES, R.N.O., SILVA-JÚNIOR, J.C., WALDSCHMIDT, A.M. (2005). Caracterização citogenética da abelha sem ferrão *Partamona rustica* (Pedro e Camargo, 2003 Hymenoptera, Apidae). Resumos do 51º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil.
- MOORE, S.S., SARGEANT, L.L., KING, T.J., MATTINCK, J.S., GEORGES, M., HETZEL, D.J.S. (1991). The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics* 10:654-660.
- MORGANTE, M. HANAFEY, M., POWELL, W. (2002). Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat. Genet.* 30:194-200.
- MUYZER, G., WALL, E.C., UITTERLINDEN, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *App. Env, Microbiol.* 59: 695-700.
- NEFF, J.L., SIMPSON, B.B. (1993). Bees, pollination system and plant diversity. In: J. LaSalle and I.D. Gauld (eds.). *Hymenoptera and Biodiversity*. C.A.B. International, Wallingford, UK. 143-167.
- NEI, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70:3321-3323.
- NEI, M., ROYCHOUDHURY, A.K. (1974). Genic variation within and between the three major races of man, Caucasoids, Negroids, and Mongoloids. *Am. J. Hum. Genet.* 26:421-443.

- NEI, M. (1977). F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Human Gen.* 41: 225-233.
- NEI, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York. 512p.
- O'DONNELL, K.H., CHEN, C.T., WENSINK, C. (1994). Insulation DNA directs ubiquitous transcription of the *Drosophila melanogaster* alpha 1 tubulin gene. *Mol. Cell Biol.* 14:6398-6408.
- OWEN, R.E. (1985). Difficulties with the interpretation of patterns of genetic variation in the eusocial Hymenoptera. *Evolution* 39:201-205.
- PACKER, L., OWEN, R.E. (1992). Variable enzyme systems in the Hymenoptera. *Biochem. Syst. Ecol.* 20:1-7.
- PACKER, L., OLATEAUX-QUÉNU, C., OWEN, R.E. (1992). Electrophoretic evidence that *Lasioglossum (Evylaeus) mediterraneum* (Blüthgen) is a species distinct from *L. (E.) laticeps* (Schenck) (Hymenoptera, Halictidae) with notes on its phylogenetic position. *Can. Ent.* 124:371-380.
- PACKER, L., OWEN, R.E. (2001). Population genetic aspects of pollinator decline. *Conserv. Ecol.* 5(1):4. <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art4/>
- PAETKAU, D., STROBECK, C. (1995). The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. *Mol. Ecol.* 4:519-520.
- PAGE, R. E. (1980). The evolution of multiple mating behaviour by honey bee queens (*Apis mellifera*). *Genetics* 96:263-273.
- PALMER, K.A, OLDROYD, P., QUEZADA-EUÁN, J.J.G., PAXTON, R.J., MAY-ITZA, W.J. (2002). Paternity frequency and maternity of males in some stingless bee species. *Mol. Ecol.* 11:2107-2113.
- PAXTON, R.J., THORÉN, P.A., TENGO, J., ESTOUP, A., PAMILO, P. (1996). Mating structure and nestmate relatedness in a communal bee, *Andrena jacobii* (Hymenoptera, Andrenidae), using microsatellites. *Mol. Ecol.* 5:511-519.
- PAXTON, R.J., WEIBSCHUH, N., ENGELS, W., QUEZADA-EUÁN, J.J.G. (1999). Characterization of dinucleotide microsatellite locos for stingless bees. *Mol. Ecol.* 8:685-702.

- PAXTON, R.J. (2000) .Genetic structure of colonies and a male aggregation in the stingless bee *S. postica*, as revealed by microsatellites analysis. *Insectes Soc.* 47:63-69.
- PEDRO, S.R.M., CAMARGO J.M.F. (2003). Meliponini Neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae). *Rev. Bras. Entomol.* 47(1):1-117.
- PÉPIN, L., AMIGUES, Y., LÉPINGLE, A., BERTHIER, J.L., BENSALD, A., VAIMAN, D. (1995). Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. *Heredity* 74:53-61.
- PETERS, J.M., QUELLER, D.C., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L., STRASSMAN, J.E. (1998). Microsatellite loci for stingless bees. *Mol. Ecol.* 7:783-792.
- PETERS, J.M., QUELLER, D.C., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L., ROUBIK, D.W., STRASSMANN, J.E. (1999). Mate number, kin selection and social conflicts in stingless bees and honeybees. *Proc. R. Soc. London* 266:379-384.
- PLOWRIGHT, R.C., PALLET, M.J. (1979). Worker-male conflict and inbreeding in bumble bees (Hymenoptera: Apidae). *Can. Entomol.* 111:289-294.
- ROSENMEIER, L., PACKER, L. (1993). A comparison of genetic variation in two sibling species pairs of haplodiploid insects. *Biochem. Genet.* 31: 185-200.
- ROSS, K.G., VARGO, E.L., FLETCHER, D.J.C. (1987) Comparative biochemical genetics of three fire ant species in North America, with special reference to the two social forms of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Evolution* 41 (3):979-990.
- ROSS, K.G. VARGO, E.L., KELLER, L., TRAGER, J.C. (1993). Effects of a founder event on variation in the genetic sex-determining system of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Genetics* 135:843-854.
- ROWE, D.J., RINDERER, T.E., STELZER, J.A., OLDROYD, B.P., CROZIER, R.H. (1997). Seven polymorphic microsatellite loci in honeybees (*Apis mellifera*). *Insectes Soc.* 44:85-93.

- SCHWARZ, H. F. (1939). A substitute name for *Patera* Schwarz (Hymenoptera: Meliponidae). Entomological News 50:23.
- SHEPPARD, W.S., HEYDON, S.L. (1986). High levels of genetic variability in three male-haploid species (Hymenoptera: Argidae, Tenthredinidae). Evolution 40:1350-1353.
- SIA, E., JINKS-ROBERTSON, S. PETES, T.D. (1997). Genetic control of microsatellite stability. Mut. Res. 383:61-70.
- SIA, E.A., BUTLER, C.A., DOMINSKA, M. GREENWELL, P., FOX, T.D., PETES, T.D. (2000). Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Nat. Acad. Sci. 97:250-255.
- SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I., GOTTSBERGER, G. (1988). A polinização de plantas do cerrado. Rev. Bras. Biol. 48:651-663.
- STOUTHAMER, R., LUCK, R.F., WERREN, J.H. (1992). Genetics of sex determination and the improvement of biological control using parasitoids. Environ. Entomol. 21:427-435.
- STRAND, M., PROLLA, T.A., LISKAY, R.M. PETES, T.D. (1993). Destabilization of tract of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. Nature 365:274-276.
- TOSTA, V.C., WALDSCHMIDT, A.M., GOOD-GOD, P.I.V., POMPOLO, S.G., BARROS, E.G., CAMPOS, L.A.O. (1998). Uso de marcadores moleculares para o estudo de cromossomos supranumerários em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Genet. Mol. Biol. 21 (Suppl) 83.
- TOSTA, V.C. (2001). Marcador molecular associado a cromossomos B em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 55p.
- TOSTA, V.C., FERNANDES-SALOMÃO, T.M., TAVARES, M.G., POMPOLO, S.G., BARROS, E.G., CAMPOS, L.A.O. (2004). A RAPD marker associated with B chromosomes in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). Cytogenet. Genome Res. 106:279-283.
- TOSTA, V.C. (2005). Análise da origem molecular dos cromossomos B, e de seus possíveis efeitos fenotípicos em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. 94p.

- TÓTH, G., GÁSPARI, A., JURKA, J. (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genet. Res.* 10:967-981.
- VAN VALEN, L. (1965). Morphological variation and width of ecological niche. *Am. Nat.* 99:377-390.
- WALDSCHMIDT, A.M., SALOMÃO, T.M.F., BARROS, E.G., CAMPOS, L.A.O. (1997). Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Braz. J. Genet.* 20:421-423.
- WIDMER, A., SCHMID-HEMPEL, P., ESTOUP, A., SCHOLL, A. (1998). Population genetic structure and colonization history of *Bombus terrestris* (Hymenoptera, Apidae) from the Canary Islands and Madeira. *Heredity* 81:563-572.
- WRIGHT, S. (1951). The genetical structure of populations. *An. Eugenics* 15: 323-354.
- WRIGHT, S. (1978). *Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations.* University of Chicago Press, Chicago.
- ZAYED, A., PACKER, L. (2001). High levels of diploid male production in a primitively eusocial bee (Hymenoptera: Halictidae). *Heredity* 87:631-636.