

Zafira Evelma da Rocha Gurgel

Aplicabilidade de marcadores microssatélites na
análise de resposta de populações de *Tetragonisca*
angustula (Apoidea, Hymenoptera) à
heterogeneidade de habitats na costa Atlântica.

Salvador

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Zafira Evelma da Rocha Gurgel

Aplicabilidade de marcadores microssatélites na
análise de resposta de populações de *Tetragonisca*
angustula (Apoidea, Hymenoptera) à
heterogeneidade de habitats na costa Atlântica.

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade Federal
da Bahia, para a obtenção de Título
de Mestre em Ecologia e
Biomonitoramento.

Orientador (a): Mauro Ramalho

Salvador

2009

Sistema de Bibliotecas - UFBA

Gurgel, Zafira Evelma da Rocha.

Aplicabilidade de marcadores microssatélites na análise de resposta de populações de *Tetragonisca angustula* (Apoidea, Hymenoptera) à heterogeneidade de habitats na costa Atlântica / Zafira Evelma da Rocha Gurgel. - 2009.

69 f. : il.

Orientador: Profº Dr. Mauro Ramalho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Biologia, Salvador, 2009.

1. Abelha sem ferrão. 2. Marcadores biológicos. 3. Polimorfismo (Zoologia).
4. Animais - População. 5. Genética de populações. I. Ramalho, Mauro.
II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Biologia. III. Título.

CDD - 595.799

CDU - 595.799

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).Maria Cristina Arias

Prof. Dr. Marco Antônio Costa

1

2

3

Prof. Dr .Mauro Ramalho

4

Orientador(a)

5

Dedicatória

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

Aos meus pais Vera e Maninho que sempre acreditaram no meu potencial e a Dudu pelo amor, auxílio e incentivo nesta conquista, dedico.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

Epígrafe

"O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada,
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher."

Cora Coralina

Agradecimentos

1
2
3
4
5 Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Biomonitoramento do
6 IBIO/UFBA pela oportunidade de desenvolver esse projeto.

7 À FAPESB pela concessão da bolsa de estudos.

8 As Plantações Michelin da Bahia por disponibilizar o local para as
9 coletas e recurso que viabilizou o desenvolvimento do projeto.

10 Ao professor Dr. Mauro Ramalho, por ter aceitado me orientar e por
11 suas contribuições ao longo desses dois anos.

12 Aos membros da banca Dr^a Maria Cristina Arias e Dr. Marco Antônio
13 Costa por terem aceitado participar da banca, por cederem *primers* para testes,
14 e por sempre terem se mostrado solícitos.

15 Ao Msc. Carlos Eduardo Sampaio Guedes, Dudu, por todo amor,
16 atenção, incentivo e ajuda ao longo desses dois anos.

17 Ao professor Dr. José Geraldo de Assis Aquino que intermediou o
18 contato com o Dr. Mauro e que sempre procurou me ajudar no trabalho.

19 A professora Dr^a Luciana Veiga por suas contribuições no
20 desenvolvimento da etapa molecular do trabalho.

21 A professora Dr^a Renata Lúcia Leite Ferreira de Lima pela sua atenção
22 ao me ensinar e ajustar a metodologia relacionada aos microssatélites.

23 A professora Dr^a Patrícia Domingues de Freitas pela ajuda nas análises
24 estatísticas.

25 A Dr^a Favísia de Oliveira Freitas por identificar as abelhas.

26 Aos amigos e companheiros de laboratório Jaqueline, João e Marília por
27 todos os momentos de descontração, por dividirmos as angústias e o trabalho
28 de campo e pelas contribuições ao meu trabalho.

1 A todos que me ajudaram na árdua tarefa de procurar ninhos: Ciro, PC,
2 Perdigão, Marli, Dudu, Camilão, Dani Marília, Mauro, Jaque, João e Daniel.

3 À Dr^a Ruth Brito, ao Dr. Flávio de O. Francisco e ao Msc. Marcelo
4 Magalhães por elucidarem minhas dúvidas sobre os microssatélites.

5 A Maíse, Oscar, Camila, Ludmila e Paulo integrantes do ECOPOL que
6 me proporcionaram bons momentos de descontração.

7 Aos colegas dos Laboratórios de Biologia Molecular, de Cultura de
8 Tecidos Vegetais e de Genética Humana e Mutagênese: Geruza, Pablo,
9 Rosane, Prof^a Moema, Sheila, Nazaré, Cássia, Mariana, Layla, Iago e Manuela
10 que sempre me ajudaram e me proporcionaram ótimos momentos.

11 A todos os meus colegas de mestrado, em especial a Jaque, João,
12 Regina, Fernanda e Cyntia com quem dividi as minhas angústias e alegrias.

13 Aos meus pais que sempre compreenderam a minha correria e ausência
14 para concluir este trabalho.

15 A minha irmã Carol e a minha sobrinha Gabriela que sempre me
16 apoiaram e também me atrapalharam bastante, mas que eu amo.

17 A todos os funcionários da Reserva Ecológica da Michelin, em especial
18 à D. Sonia, D. Cristina e família que sempre me trataram com muito carinho
19 fazendo eu me sentir em casa e a Sr. Sarapião e Sr. Raimundo pela amizade e
20 pela enorme ajuda no campo.

21 Aos colegas Carine, Alan, Cláudia e Cristiane pelo incentivo no final
22 deste trabalho.

23 A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste
24 trabalho.

25

26

27

28

Índice

1		
2		
3		
4	Introdução geral -----	09
5	Objetivos -----	19
6	Referências -----	20
7	Artigo: Avaliação da transferência de <i>primers</i> de microssatélites	
8	heterólogos para estudo de estrutura espacial de populações em mosaico	
9	de <i>Tetragonisca angustula</i> (Meliponini, Apoidea) -----	25
10	<i>Abstract/Resumo</i> -----	27
11	1.1. Introdução -----	29
12	1.2. Materiais e Métodos -----	33
13	1.2.1 Área de Estudo -----	33
14	1.2.2. Material biológico -----	33
15	1.2.3. Extração de DNA -----	34
16	1.2.4 Transferência dos Primers Microssatélites -----	34
17	1.2.5Obtenção dos Dados Microssatélites -----	35
18	1.2.6 Análise dos dados -----	37
19	1.3. Resultados -----	38
20	1.4. Discussão -----	40
21		
22	Conclusões -----	56
23	Referências -----	57
24		

Introdução Geral

1. As abelhas sem ferrão

A tribo Meliponini pertence à família Apidae (Apoidea, Hymenoptera) que se destaca como a mais diversificada e com distribuição mais ampla no mundo (Silveira *et al.*, 2002). Das 19 tribos da sub-família Apinae, Meliponini e Apini agrupam as abelhas com comportamento eusocial, o mais alto nível de organização social (Michener, 2000).

As abelhas Meliponini apresentam ampla distribuição nos trópicos de todo o mundo (Michener, 2000). A região neotropical contém o maior número de espécies de meliponíneos apresentando 32 gêneros exclusivos (Camargo e Pedro, 2007) do total de 56 gêneros da tribo distribuídos no mundo (Costa *et al.*, 2003).

Essas abelhas são visitantes florais numericamente dominantes em várias formações vegetais, destacando-se particularmente nas florestas tropicais pluviais. Na Mata Atlântica, os meliponíneos aparecem associados especialmente às floradas maciças (*mass-flowerings*), desempenhando papel central na biologia reprodutiva de árvores do dossel (Ramalho, 2004; Monteiro e Ramalho, 2009).

Nos meliponíneos, a reprodução e fundação de uma nova colônia perene são feitas por um conjunto de abelhas (rainha e operárias) e ocorre através de um processo de enxameagem progressiva, com longo período de

1 contato entre colônia mãe e filha, ao contrário da ruptura abrupta observada
2 em *Apis* (Nogueira-Neto, 1997; Velthuis *et al.*, 1997). As operárias nascidas
3 na colônia mãe passam vários dias abastecendo o novo ninho com materiais
4 de construção (cerúmen) e alimento (Nogueira-Neto, 1997). Esta característica
5 pode limitar a formação de novas colônias aos sítios de nidificação mais
6 próximos ao ninho materno (Batista *et al.*, 2003). Apesar dos meliponíneos
7 apresentarem ampla diversidade de substrato de nidificação a maioria das
8 espécies necessitam de cavidades pré-existentes em ocos de árvores (Roubik,
9 1989; Michener, 2000; Batista *et al.*, 2003). Por isso, as espécies deste grupo
10 de abelhas podem ser bastante suscetíveis à fragmentação da floresta.

11 A manutenção das abelhas sociais sem ferrão para a conservação da
12 Mata Atlântica se deve à importância dessas abelhas como agentes
13 polinizadores de árvores nativas. A redução brusca dos meliponíneos
14 ocasionadas por desmatamentos ou por ação predatória pode gerar redução na
15 diversidade de espécies destes indivíduos e, conseqüentemente redução de
16 espécies de plantas dependente destas abelhas (Roubik, 1993).

17

18 **2. A espécie *Tetragonisca angustula***

19 A espécie *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) é uma das abelhas
20 mais comuns com uma ampla distribuição geográfica na América Tropical
21 (Moure, 2007), apresentando um importante papel na polinização da flora
22 nativa (Oliveira *et al.*, 2004).

1 *T. angustula* é uma espécie generalista na ocupação dos habitats e
2 também no uso de fontes florais e locais de nidificação (Batista *et al.*, 2003).
3 Adapta-se bem a diversos substratos de nidificação, ocupando cavidades pré-
4 existentes em troncos de árvores vivas ou mortas, construções humanas, solo,
5 etc. Ao contrário de espécies de Meliponini mais estreitamente associadas à
6 floresta, *T. angustula* comporta-se como generalista, ocupando vários habitats
7 em ambientes modificados, incluindo áreas urbanas (Batista *et al.*, 2003;
8 Ramalho e Batista 2005).

9

10 **3. Fragmentação do habitat**

11 A fragmentação de habitats naturais tem sido uma das causas mais
12 importantes para o decréscimo populacional local e perda de biodiversidade
13 regional. Os fragmentos naturais geralmente formam paisagens em mosaico,
14 onde a dinâmica das populações agora também em mosaico e os processos
15 ecológicos podem estar sob forte pressão de fatores dependentes da escala
16 espacial e das características das matrizes modificadas (Andren, 1994; Wiens,
17 1995).

18 A Mata Atlântica foi reduzida em mais de 90% da sua extensão original
19 e os fragmentos florestados remanescentes estão pulverizados na ampla área
20 de distribuição (Guedes *et al.*, 2005), de modo que a conectividade funcional
21 se tornou uma variável chave para preservação da biodiversidade. Em áreas
22 como o litoral da Bahia, na porção norte, a maioria dos remanescentes

1 florestados tem menos de 100 ha, e a conectividade funcional é o problema
2 central que atinge as populações de meliponíneos (Ramalho e Batista, 2005).
3 A preservação da biodiversidade em longo prazo na região demanda medidas
4 de maior escala espacial, como os corredores ecológicos (Zaú, 1998).
5 Operacionalmente os corredores estão associados à idéia de conectividade
6 física - ou melhor, da matriz interveniente entre os fragmentos - mas o aspecto
7 relevante é o nível de conectividade funcional alcançada: ou seja, de que
8 forma a estrutura de populações de organismos focais e processos ecológicos
9 associados são afetados nestas escalas espaciais.

10

11 **4. Marcadores Moleculares**

12 O estudo de polimorfismos até a década de 60 foi baseado em variações
13 fenotípicas. Essas eram pouco perceptíveis e limitavam a percepção de
14 diferenças significativas entre as populações (Futuyma, 1992) ou suas
15 respostas sutis às variações espaciais. Ensaio subseqüentes com marcadores
16 moleculares evidenciaram locos polimórficos que não seriam identificados
17 com observações fenotípicas. A primeira técnica utilizada foi a eletroforese de
18 proteínas, desenvolvida por Harris (1966) e Hubby e Lewontin (1966). Os
19 marcadores isoenzimáticos foram muito usadas em estudos de dispersão de
20 espécies e na análise de filogenia e sua difusão ocorreu a partir do
21 desenvolvimento de métodos eficientes de visualização do produto enzimático
22 (Ferreira e Gratapaglia, 1998). As isoenzimas foram utilizadas em estudos

1 com abelhas inclusive com *T. angustula* (Castanheira e Contel (1995 e 2005).
2 Em 1968 foram descobertas as enzimas de restrição houve um
3 desenvolvimento da técnica de RFLP (Restriction Fragment Length
4 Polymorphism). Esta técnica oferecia vantagens em relação à anterior e podia
5 ser utilizada em estudos populacionais.

6 Atualmente existem vários tipos descritos de marcadores moleculares
7 que podem ser utilizados em estudos populacionais comportamentais e
8 filogenéticos. O marcador é escolhido de acordo com o problema a ser
9 analisado e com a disponibilidade de recursos (Avisé, 1989).

10 Os marcadores co-dominantes são mais indicados para estudos
11 populacionais, pois, nesses casos, oferece maior precisão e vantagens técnicas
12 do que os marcadores dominantes (Sunnucks, 2000; Arias *et al.*, 2006). Entre
13 as características que tornam os marcadores co-dominantes mais versáteis e
14 precisos, destacam-se: i) grande abundância e distribuição uniforme por todo o
15 genoma; ii) são multi-alélicos e, portanto, maior conteúdo informativo por
16 loco (Ferreira e Gratapaglia, 1998). Os microsatélites são marcadores
17 moleculares, que permitem acessar uma ampla gama de diferenciações e
18 abordar os processos ecológicos e evolutivos subjacentes, sendo por isso
19 adequados para estudos populacionais (Arias *et al.*, 2006).

20

21

22

1 **3.1 Microssatélites**

2 Os marcadores microssatélites também são denominados SSRs (Simple
3 Sequence Repeats) ou STRs (Short Tandem Repeats). Inicialmente, o termo
4 microssatélite foi utilizado apenas para designar repetições CA (ou CG) (Brito
5 2005 *apud* Litt; Luty, 1989) e os termos “Simple Sequence Repeats” ou
6 “Short Tandem Repeats” eram utilizados para as outras repetições.
7 Atualmente o termo microssatélite é utilizado para quaisquer repetições que
8 envolvam um pequeno número de pares de bases (Oliveira *et al.*, 2006).

9 Assim, os microssatélites constituem uma curta seqüência repetida em
10 *tandem* (em “fila”), com um tamanho de 1-6 nucleotídeos, distribuídos
11 aleatoriamente pelo genoma da maioria dos organismos. Essas seqüências
12 podem se repetir por até algumas dezenas de vezes e, freqüentemente, exibem
13 polimorfismo multi-alélico (Ferreira e Gratapaglia 1998) .

14 Para visualizar o polimorfismo nos microssatélites é realizada a
15 amplificação das seqüências repetidas pela reação em cadeia da polimerase
16 (PCR), que utiliza pequenas seqüências de nucleotídeos como *primers* (Farah,
17 2000). Para isso, é mais indicado a seleção de *primers* específicos ou a
18 transferência de *primers* heterólogos previamente testados (Francisco *et al.*
19 2006).

20 Os microssatélites podem ser separados em quatro classes: (i) perfeito,
21 quando as seqüências são repetidas sem interrupção (GTGTGTGTGT); (ii)
22 imperfeito, quando uma ou outra repetição apresenta uma base que não

1 pertence à repetição (GTGTCGTGT); (iii) interrompido, quando há a inserção
2 de um pequeno número de pares de bases entre as seqüências repetidas
3 (GTGTGTAAAGTGT); e (iv) composto: quando dois ou mais microssatélites
4 estão justapostos (CACACAGTGTGT) (Oliveira *et al.*, 2006). Estas
5 interrupções do tipo “ii, iii e iv” parecem estabilizar os microssatélites, visto
6 que se observa menor incidência de erros durante a replicação nesses casos
7 (Weber, 1990).

8 Os microssatélites têm sido extremamente úteis em estudos
9 populacionais, principalmente no que se refere às análises de relações de
10 parentesco, variações espaciais intra-específicas e filogeografia (Sunnucks,
11 2000; Moritz e Hills, 1996; Avise, 1989).

12 A transferência de *primers* heterólogos de microssatélites é uma
13 alternativa para a redução de tempo e de custos de seleção de *primers*
14 específicos. Esta transferência se torna possível pela conservação de regiões
15 que flanqueiam os microssatélites em espécies taxonomicamente próximas
16 (Ferreira e Grattapaglia, 1998), mas há riscos de insucesso, sobretudo na
17 detecção de alelos polimórficos.

18 Atualmente há um grande número de estudos com microssatélites,
19 incluindo vários com abelhas Meliponini (Chung *et al.*, 1993; Butcher *et al.*,
20 2001; Paxton *et al.*, 2003; Peters, 2003; Jean-Christophe *et al.*, 2005; Francisco
21 *et al.*, 2006; Carvalho-Zilse e Kerr, 2006; Steiner *et al.*, 2006; Thorén *et al.*,
22 2007; Souza *et al.*, 2007). Em muitos casos a transferência de *primers* entre

1 espécies gerou resultados satisfatórios. Chung *et al.*(1993) transferiu com
2 sucesso *primers* de bovinos para caprinos; Francisco *et al.* (2006) ressaltou
3 que a transferência de *primers* heterólogos para *Plebeia remota* foi eficiente,
4 apesar de revelar poucos alelos por loco; Carvalho-Zilse e Kerr (2006)
5 utilizaram *primers* heterólogos entre espécies do gênero *Melipona* e o
6 resultado foi satisfatório.

7

8 **3.2 Estudos Populacionais Envolvendo Microssatélites**

9 Recentemente, a utilização dos microssatélites como marcadores
10 moleculares em estudos populacionais e evolutivos tem sido bem sucedida em
11 diversos organismos (Simonsen *et al.*, 1998, Haavi *et al.*, 2000, Clémencet *et*
12 *al.*, 2005). Arias *et al.* (2006) descreveram vários exemplos em que
13 microssatélites e DNA mitocondrial (DNAMt) foram aplicados ao estudo de
14 espécies de abelhas sociais. Os resultados obtidos já permitem formular
15 hipóteses a cerca da filogenia, dinâmica populacional e evolução dos grupos
16 de abelhas.

17 Widmer *et al.* (1998) puderam constatar que populações de abelhas
18 *Bombus* (Bombini) das ilhas Canárias (*Bombus canariensis*) e Madeira
19 (*Bombus maderensis*) apresentavam grandes diferenças de afinidade com
20 populações do continente próximo (*Bombus terrestris*), usando
21 microssatélites e um loco do DNA mitocondrial do citocromo b. Com uso de
22 microssatélites. Widmer e Schmid-Hempel (1999) detectaram diferenças

1 consistentes entre 16 populações de *Bombus pascuorum*, que sustentavam o
2 argumento de isolamento por processo de vicariância, causado pelo
3 soerguimento dos Alpes.

4 Em Meliponini, Francisco (2002) fez análises de DNAm e
5 microssatélites em *Plebeia remota* para estudos populacionais. O trabalho
6 identificou diferenças genéticas entre amostras de populações de diferentes
7 estados brasileiros (São Paulo, Paraná e Santa Catarina). Entretanto, mostrou
8 que houve um baixo polimorfismo na transferência de *primers* entre espécies.
9 Werneck (2008) avaliou a influência de alelos nulos no sucesso sobre a
10 transferência de sete *primers* para *Melipona mandacaia*, desenvolvidos para
11 *Melipona bicolor*.

12 Em estudos de populações de *Partamona mulata* e *Partamona helleri*
13 (Meliponini), Brito (2005) observou baixa variabilidade genética nos locos de
14 microssatélites de ambas as espécies e discreta estruturação genética dentro
15 das populações locais. Segundo a autora, este último aspecto poderia ser
16 consequência da fragmentação dos habitats de floresta ou de cerrados, áreas de
17 distribuição das espécies.

18 Em síntese, os microssatélites são muito úteis no estudo de
19 diferenciações nas populações em grande escala ou escala geográfica e,
20 provavelmente, também podem ser aplicados com sucesso na análise de
21 estrutura de populações em menor escala espacial (populações locais ou em
22 mosaico). No entanto, nos estudos com abelhas Meliponini tem sido

1 observado baixo polimorfismo com a utilização de *primers* heterólogos, o que
2 pode demandar maior esforço de caracterização de marcadores específicos em
3 número adequado para análises robustas de estrutura espacial de populações.

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

Objetivos

Objetivo Geral:

- Verificar a aplicabilidade de marcadores microssatélites, para caracterização da variabilidade genética em populações locais em mosaico de uma espécie generalista de Meliponini, em resposta à fragmentação e heterogeneidade de habitats da costa Atlântica.

Objetivos específicos:

- Avaliar a transferência de *primers* desenvolvidos para *Melipona bicolor* e *Scaptotrigona postica* em populações de *Tetragonisca angustula*.
- Comparar a variabilidade espacial intra-populacional de *Tetragonisca angustula* na costa Atlântica, em área de silvicultura de seringueira, em mosaico com Mata Atlântica.

Referências

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

- Avise JC (1989) A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. *Trends in Ecology and Evolution* 4:279-281.
- Andren H (1994) Effects of Habitat Fragmentation on Birds and Mammals in Landscapes with Different Proportions of Suitable Habitat - a Review. *Oikos* 71: 355-366.
- Arias MC, Brito RM, Francisco FO, Moretto G, De Oliveira FF, Silvestre D and Sheppard WS (2006) Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. *Apidologie* 37: 259-274.
- Batista, MA, Ramalho, M. and Soares A.E.E. 2003 Nesting sites and abundance of meliponini (Hymenoptera: Apidae) in heterogenous habitats of the Atlântic Rain Forest, Bahia, Brazil *Revista Lundiana* 4(1): 19-23
- Brito RM (2005) Análise Molecular e populacional de *Partamona mulata* (Moura e Camargo, 1980) e *Partamona heleri* (Fiese, 1900) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) PhD thesis, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Butcher RDJ, Hubbard SF and Whitfield WGF (2001) Microsatellite frequency and size variation in the parthenogenetic parasitic wasp *Venturia canescens* (Gravenhorst) (Hymenoptera: Ichneumonidae) *Insect Molecular Biology* 9:375-384.
- Camargo, J.M.F. and Pedro, S.R.M. (2007) Meliponini Lepeletier, 1836. "In": Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropiacal Region. Moure, J.S.; Urban, D. and Melo, G. A. R. (Orgs.). Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia, 1058p.
- Carvalho-Zilse GA and Kerr WE (2006) Utilização de marcadores microsatélites para estudos populacionais em *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). *Magistra* 18: 213-220.
- Castanheira EB and Contel EPB (1995) Isoenzimas related to Flight Activity in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae): Evidence of Postranslational Modification of the Hexokinase and

- 1 Detection os New Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase Variants.
2 Biochemical Genetics 33: 365-375.
3
- 4 Castanheira EB and Contel EPB (2005) Geographic variation in *Tetragonisca*
5 *angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Journal of Apicultural
6 Research 44: 101-105.
7
- 8 Chung M, Ranum LPW and Duvick LA, Servadio A, Zoghbi and Orr (1993)
9 Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG
10 repeat instability in spinocerebellar ataxia type I. Nature Genetics
11 5:254-258.
12
- 13 Clemencet J, Viginier B and Doums C (2005) Hierarchical analysis of
14 population genetic structure in the monogynous ant *Cataglyphis cursor*
15 using microsatellite and mitochondrial DNA markers. Molecular
16 Ecology 14: 3735-3744.
17
- 18 Costa MA, Del Lama MA, Melo GAR and Sheppard WS (2003) Molecular
19 phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred
20 from mitochondrial 16S rDNA sequences. Apidologie 34, 73-84.
21
- 22 Farah SB (2000) DNA Segredos e Mistérios . Savier. São Paulo.
23
- 24 Ferreira ME and Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores
25 moleculares em análise genética 2.ed. EMBRAPA-CENARGEN,
26 Brasília.
27
- 28 Francisco F.O. (2002) Diversidade Genética de populações de Abelhas sem
29 ferrão *Plebeia remota*: análise do DNA mitocondrial e microssatélites,
30 MSc thesis, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São
31 Paulo, SP.
32
- 33 Francisco F. O. Brito R.M. and Arias M.C.(2006) Allele number and
34 heterozigosity for microsatellite loci in diferentes stingless bees species
35 (Hymenoptera: Apidae, Meliponini) Neotropical Entomology
36 35(5):638-643.
37
- 38 Futuyma DJ (1997) Biologia Evolutiva. 2ª Ed. FUNPEC. São Paulo.
39
- 40 Guedes MLS, Batista MA, Ramalho M, Freitas MHB and Silva EM (2005)
41 Breve incursão sobre a biodiversidade da Mata Atl. p.39-92. “In” C.R.

- 1 Franke, P.L.B. Rocha, W. Klein and S.L. Gomes, Mata Atlântica e
2 Biodiversidade. EDUFBA. 476p.
3
4
- 5 Haavie J, SÆTRE GP and MOUM T (2000) Discrepancies in population
6 differentiation at microsatellites, mitochondrial DNA and plumage
7 colour in the pied flycatcher inferring evolutionary processes. *Molecular*
8 *Ecology* 9: 1137–1148.
9
- 10 Imperatriz-Fonseca VL, Kleitnert-Giovannini A, Cortopassi-Laurino and
11 Ramalho M (1984) Hábitos de coleta de *Tetragonisca angustula*
12 *angustula* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) *Bolm. Zoll.*
13 *Univ. S. Paulo* 8: 115.
14
- 15 Iwana S and Melhem TS (1979) The pollen spectrum of the honey of
16 *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Apidae, Meliponinae).
17 *Apidologie* 10: 275-295.
18
- 19 Jean-Christophe L, Schrempf A, Lenoir A, Heinze J and Mercier J (2005) Five
20 polymorphic microsatellite markers for the study of *Cardiocondyla*
21 *elegans* (Hymenoptera: Myrmicinae) *Molecular Ecology Notes* 5:565-
22 566.
23
- 24 Michener, C D (2000) The bees of the world. Baltimore: Johns Hopkins.
25
- 26 Monteiro D and Ramalho M (2009) Abelhas Generalistas (Hymenoptera,
27 Apidae, Meliponina) e Sucesso Reprodutivo de Árvores com Florada
28 em Massa de *Stryphnodendron pulcherrimum* (Willd.) Hochr., (Fabales-
29 Mimosaceae) na Mata Atlântica (Bahia). *Neotropical Entomology* – no
30 prelo.
31
- 32 Moritz C and Hillis DM (1996) Molecular systematics: Context and
33 controversies, p. 1-13. “In” Hillis DM, Moritz C and Mable BK (eds),
34 *Molecular systematics*, 2nd edition. Sinauer Associates, Massachusetts,
35 655p.
36
- 37 Moure, JS (2007) Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the
38 Neotropical Region. Moure, JS; Urban, D. and Melo, G. A. R. (Orgs.).
39 Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia, 1058p.
40
- 41 Nogueira-Neto, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. (1997) São
42 Paulo, SP: Nogueirapis. 446 p.
43

- 1 Oliveira EJ, Padua JG, Zucchi MI, Vencovsky R and Vieira MLC (2006)
2 Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics*
3 and *Molecular Biology* 29: 294-307.
4
- 5 Oliveira RC, Nunes FMF, Campos APS, Vasconcelos SM, Roubik D, Goulart
6 LR and Kerr WE (2004) Genetic divergence in *Tetragonisca angustula*
7 Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on rapid
8 markers. *Genetics and Molecular Biology* 27: 181-186.
9
- 10 Paxton RJ, Arévalo E, Field J (2007) Microsatellite loci for the eusocial
11 *Lasioglossum malachurum* and other sweat bees (Hymenoptera,
12 Halictidae) *Molecular Ecology Notes* 3: 82-84.
13
- 14 Peters JM (2003) Microsatellite loci for *Pseudomyrmex pallidus* 25
15 (Hymenoptera: Formicidae) *Molecular Ecology* 9: 887-888.
16
- 17 Ramalho, M. and Batista MA (2005) Polinização na Mata Atlântica:
18 perspectiva ecológica da fragmentação. p.93-142. In C.R. Franke,
19 P.L.B. Rocha, W. Klein and S.L. Gomes, *Mata Atlântica e*
20 *Biodiversidade*. EDUFBA. 476p.
21
- 22 Roubik DM (1989). *Ecology and natural history of tropical bees*. Cambridge
23 University Press. 514p.
24
- 25 Roubik DM (1993) Direct costs of forest reproduction, bee-cycling and
26 efficiency of pollination modes. *J. Bisci* 18: 537-552.
27
- 28 Simonsen BT, Siegismund HR and Arctander P (1998) Population structure of
29 African buffalo inferred from mtDNA sequences and microsatellite
30 loci: high variation but low differentiation. *Molecular Ecology* 7: 225-
31 237.
32
- 33 Silveira FA, Melo GAR. and Almeida EAB (2002) *Abelhas do Brasil:*
34 *Sistemática e Identificação*. Belo Horizonte: edição dos Autores.
35
- 36 Steiner FM, Arthofer W, Schlick-Steiner, Crozier RH and Stauffer C (2006)
37 Eleven microsatellite loci in the sociobiologically enigmatic ant *Lasius*
38 *austriacus* (Hymenoptera: Formicidae). *Molecular Ecology Notes* 7:
39 497-500.
40
- 41 Souza RO, Cervini M, Del Lama MA and Paxton RJ (2007) Microsatellite
42 loci for euglossine bees (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Ecology*
43 *Resources* 17 6: 1352-1356.

1
2 Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. Trends in
3 Ecology and Evolution 15: 199-203.

4
5 Velthuis, H. W. Biologia das abelhas sem ferrão. (1997) São Paulo, SP:
6 Universidade de São Paulo. 33 p.

7
8 Weber JL (1990) Informativeness of humans (dC-dA)_n .(dG-dT)_n
9 polymorphisms. Genomics 7:524-530.

10
11 Werneck MV (2008) Uso de marcadores microssatélites para análise genética
12 de populações de *Melipona mandacaia* SMITH, 1863 (Hymenoptera,
13 Apoidea) no estado da Bahia. Dissertação. Mestrado em Biologia
14 Celular e Estrutura, Universidade Federal de Viçosa, MG.

15
16 Widmer A and Schmid-Hempel P (1999) The population genetic structure of a
17 large temperate pollinator species, *Bombus pascuorum* (Scopoli)
18 (Hymenoptera : Apidae). Molecular Ecology 8: 387-398.

19
20 Widmer A., Schmid-Hempel P., Estoup A. and Scholl A. (1998) Population
21 genetic structure and colonization history of *Bombus terrestris* s.l.
22 (Hymenoptera: Apidae) from the Canary Islands and Madeira. Heredity,
23 81: 563-572.

24
25 Wiens JA (1995) Habitat Fragmentation - Island V Landscape Perspectives on
26 Bird Conservation. Ibis 137, S97-S104.

27
28 Zaú AS (1998) Fragmentação da Mata Atlântica: aspectos teóricos. Floresta e
29 Ambiente 5(1): 160-170.

30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

1 Zafira Evelma da R. Gurgel
2 Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Biomonitoramento
3 Instituto de Biologia - Universidade Federal da Bahia
4 Rua Barão de Jeremoabo, s/n - Ondina
5 CEP: 40170-115 Salvador BA
6

7
8
9
10
11 Avaliação da transferência de *primers* de
12 microssatélites heterólogos para estudo de estrutura
13 espacial de populações em mosaico de *Tetragonisca*
14 *angustula* (Meliponini, Apoidea).
15

16 Zafira Evelma da R. Gurgel

17 zafiragurgel@hotmail.com

18 Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Biomonitoramento
19 Instituto de Biologia - Universidade Federal da Bahia
20 Rua Barão de Jeremoabo, s/n - Ondina
21 CEP: 40170-115 Salvador BA
22
23
24
25
26

27 Manuscrito segue formatação de acordo com as normas da Molecular
28 Ecology.

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10 Avaliação da transferência de *primers* heterólogos
11 para estudo de estrutura espacial de populações em
12 mosaico de *Tetragonisca angustula* (Meliponini,
13 Apoidea).

14

15

16

17

18

19

20

21

22

1 **Evaluation of transfer heterologous microsatellite primers to study the**
2 **spatial structure of mosaic populations of *Tetragonisca angustula***
3 **(Meliponini, Apoidea).**

4
5 *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) is very frequent along the regional
6 distribution of the Atlantic Rain Forest, mainly within second growth forest
7 habitats. In contrast to its generalized nesting habit, the progressive swarming
8 behavior prevent long distance dispersal by limiting nesting foundation to the
9 surroundings of mother colonies. In this study we evaluate the transference of
10 heterologous microsatellite markers to analysis of polymorphism in
11 populations of *T. angustula* in response to local and regional patchy habitat
12 distribution in the northern Atlantic coast. Bee nests surveys were made at
13 forest fragments of Atlantic Rainforest within rubber plantation (REM) and at
14 Salvador city (CSA), 150 Km at northern. In the analysis it was sampled
15 specimens from 13 nests of three REM forested fragments and six nests from
16 CSA. Six heterologous *primers* were tested and only one was polymorphic.
17 The observed differences between the REM and CSA and within the REM
18 forested fragments were insufficient to discuss population spatial structure. It
19 will be necessary to test a higher number of heterologous *primers* with higher
20 polymorphism and searching for species-specific *primers* before proceeding to
21 test effects of habitat fragmentation upon local population spatial structure.

22

23 **KEY WORDS:** stingless bees, microsatellite polymorphism, population
24 structure.

1 **Avaliação da transferência de *primers* microssatélites heterólogos para**
2 **estudo de estrutura espacial de populações em mosaico de *Tetragonisca***
3 ***angustula* (Meliponini, Apoidea).**

4

5 **Resumo:** A abelha social *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) é muito
6 comum ao longo da área de influência da Mata Atlântica, em particular em
7 ambientes com vegetação secundária. Apesar do hábito de nidificação
8 generalista, a reprodução por enxameagem progressiva limita a dispersão
9 desta espécie e de outros Meliponini a poucas centenas de metros ao redor da
10 colônia mãe. O presente estudo teve como objetivo analisar o sucesso de
11 transferência de marcadores microssatélites e sua aplicação na detecção de
12 variabilidade espacial de populações de *T. angustula* em resposta
13 heterogeneidade e fragmentação de habitats na costa Atlântica do nordeste do
14 Brasil. Foram feitos censos de ninhos em remanescentes florestados de Mata
15 Atlântica (REM), em meio à silvicultura de seringueira (*Hevea brasiliensis*), e
16 em área urbana, na cidade de Salvador (CSA), distantes entre si cerca de 150
17 km. Foram amostrados e analisados espécimes de 15 ninhos de três
18 fragmentos florestados da REM e de seis ninhos da CSA. Foram testados seis
19 *primers* heterólogos e apenas um se revelou polimórfico tanto na REM como
20 na CSA. Foram observadas diferenças entre a REM e a CSA e também na
21 escala dos fragmentos florestados da REM, porém os dados são insuficientes
22 para analisar a estrutura espacial da população. Será preciso implementar a
23 transferência de novos *primers* e/ou investir no desenvolvimento de *primers*

1 espécie-específicos para testar hipóteses sobre estruturação espacial da
2 população (em mosaico) em resposta à fragmentação.

3 **PALAVRAS CHAVE:** Abelhas sem ferrão, Microsatélites, Polimorfismo,
4 estrutura populacional.

5

6 **Introdução**

7 As abelhas eusociais Meliponini são visitantes florais numericamente
8 dominantes em várias formações vegetais tropicais (Ramalho, 2004). Estas
9 abelhas utilizam ampla diversidade de substratos de nidificação, no entanto, a
10 grande maioria das espécies necessita de cavidades pré-existentes em ocos de
11 árvores (Roubik, 1989; Michener, 2000; Batista *et al.*, 2003). O
12 comportamento reprodutivo e a fundação de novos ninhos têm influência
13 sobre a ecologia das populações e comunidades de Meliponini, pois cada
14 colônia social é fundada por um conjunto de abelhas (rainha e operárias),
15 através de enxameagem progressiva, com longo período de interdependência
16 entre colônia mãe e filha, ao contrário da ruptura abrupta observada em *Apis*
17 (Nogueira-Neto, 1997).

18 A enxameagem progressiva e dependência de grandes cavidades pré-
19 existentes tendem a limitar o estabelecimento de novas colônias de Meliponini
20 nas proximidades da colônia mãe. Por isso, essas abelhas podem devem ser
21 bastante susceptíveis à fragmentação da floresta (Batista *et al.*, 2003; Ramalho
22 e Batista, 2005).

1 Assumindo a premissa de que os Meliponini são susceptíveis à
2 fragmentação, este estudo explora as possibilidades de uso de marcadores
3 moleculares, no caso microssatélites, para detectar efeitos sobre a estruturação
4 espacial de populações locais em mosaico.

5 Recentemente, a utilização dos microssatélites como marcadores
6 moleculares em estudos populacionais e evolutivos tem sido bem sucedida em
7 diversos organismos (Simonsen *et al.*, 1998, Haavi *et al.*, 2000, Clémencet *et*
8 *al.*, 2005). Arias *et al.* (2006) descreveram vários exemplos em que
9 microssatélites e DNA mitocondrial (DNAmt) foram aplicados ao estudo de
10 espécies de abelhas sociais. Os resultados obtidos já permitem formular
11 hipóteses a cerca da filogenia, dinâmica populacional e evolução dos grupos
12 de abelhas.

13 Widmer *et al.* (1998) puderam constatar que populações de abelhas
14 *Bombus* (Bombini) das ilhas Canárias (*Bombus canariensis*) e Madeira
15 (*Bombus maderensis*) apresentavam grandes diferenças de afinidade com
16 populações do continente próximo (*Bombus terrestris*), usando
17 microssatélites e DNA. Com uso de microssatélites, Widmer e Schmid-
18 Hempel (1999) detectaram diferenças consistentes entre 16 populações de
19 *Bombus pascuorum*, que sustentavam o argumento de isolamento por processo
20 de vicariância, causado pelo soerguimento dos Alpes.

21 Em Meliponini, Francisco (2002) fez análises de DNAmt e
22 microssatélites em *Plebeia remota* e identificou diferenças genéticas entre

1 amostras de populações de diferentes estados brasileiros (São Paulo, Paraná e
2 Santa Catarina). Entretanto, mostrou que houve um baixo polimorfismo na
3 transferência de *primers* entre espécies. Werneck (2008) avaliou a influência
4 de alelos nulos no sucesso sobre a transferência de sete *primers* para *Melipona*
5 *mandacaia*, desenvolvidos para *Melipona bicolor*.

6 Em estudos de populações de *Partamona mulata* e *Partamona helleri*
7 (Meliponini), Brito (2005) observou baixa variabilidade genética nos locos de
8 microssatélites de ambas as espécies e discreta estruturação genética dentro
9 das populações locais. Segundo a autora, este último aspecto poderia ser
10 consequência da fragmentação dos habitats de floresta ou de cerrados, áreas de
11 distribuição das espécies.

12 Em síntese, os microssatélites são úteis no estudo de diferenciações nas
13 populações em grande escala ou escala geográfica e, provavelmente, também
14 podem ser aplicados com sucesso à análise de estrutura de populações em
15 menor escala espacial (populações locais ou em mosaico) e como resultado de
16 fenômenos também em menor escala temporal, como a fragmentação.

17 Uma das principais limitações deste tipo de marcador molecular é o alto
18 custo e o tempo longo para desenvolvimento de *primers* para cada espécie
19 (Ferreira e Grattapaglia 1998). Em parte por isso, tem se investido na
20 transferência de *primers* bem sucedidos no estudo de uma espécie para outras
21 (*primers* heterólogos). Entretanto, nos estudos com abelhas Meliponini tem

1 sido detectado baixo polimorfismo, com a transferência de *primers*
2 heterólogos. Esta é uma forte restrição da técnica sobre análises robustas da
3 estrutura espacial de populações.

4 Neste estudo sobre estrutura espacial de populações locais, com
5 marcadores moleculares, optou-se pela abelha *Tetragonisca angustula* como
6 modelo, a despeito de seu comportamento generalista no uso de habitats
7 florestados (Batista et al. 2003), por se tratar da espécie com maior número de
8 ninhos previamente inventariados nos remanescentes florestados da região.
9 Como ainda não há dados publicados sobre microsatélites específicos para
10 *T.angustula*, foi testada a transferência de marcadores desenvolvidos para
11 duas outras espécies de Meliponini: *Melipona bicolor* e *Scaptotrigona postica*.
12 Assim, na primeira etapa, o estudo avalia se a transferência de *primers*
13 heterólogos permite a caracterização de locos polimórficos de microsatélites
14 em número suficiente para se proceder as análises de estruturação espacial das
15 populações locais, visando em última instância analisar a questão da
16 conectividade funcional na escala da paisagem regional.

17 O estudo foi conduzido em um mosaico de Mata Atlântica e seringueira
18 (REM) e na área urbana da cidade de Salvador (Bahia) distanciados cerca de
19 150km entre si e tem as seguintes premissas específicas sobre a estrutura
20 espacial das populações: 2) na escala regional espera-se encontrar maior
21 diferença entre as populações do que na escala local; 2) as diferenças em

1 escala local são similares no mosaico de floresta-matriz de seringueira e no
2 mosaico da área urbana, dado o caráter generalista da espécie.

3

4 **Material e Métodos**

5

6 **Área de Estudo e inventário de ninhos**

7 Os ninhos para análise comparativa foram inventariados em fragmentos
8 florestados na Reserva Ecológica da Michelin – REM (13° 50’S e 39° 15’W),
9 localizada em Ituberá, Bahia, Brasil (figura 01), e na área urbana de Salvador
10 (figura 02).

11 Até o ano de 2004, a REM ainda estava exposta ao desmatamento
12 pontual e exploração irregular de madeira, de modo que é possível identificar
13 manchas na floresta contínua em diferentes estágios de regeneração (Flesher,
14 2006). Nos maiores remanescentes, como Pacangê e Pancada Grande, ainda é
15 possível encontrar extensões de floresta primária bem preservada.

16

17 **Material Biológico e escala espacial**

18 O levantamento de ninhos foi realizado em pequenos e grandes
19 fragmentos florestados da REM entre julho de 2007 e dezembro de 2008. Os
20 ninhos foram procurados, entre 08:00 e 14:00 h, através de censos intensivos
21 em áreas amostrais (parcelas) de 25x25 m, que totalizaram 3,4 ha, 3,9 ha e 4,2
22 ha nos grandes remanescentes florestados do Guigó, Pancada Grande e

1 Pacangê, respectivamente; e 1 ha e 0,5 ha nos fragmentos pequenos da Sede e
2 Luis Inácio. Nesta área total de 13 hectares foram encontrados 25 ninhos de *T.*
3 *angustula* em ocos de árvores, dos quais apenas 15 puderam ser amostrados
4 devido a restrições de acesso (altura, obstáculos, riscos para o coletor).

5 Os remanescentes florestados da REM distam entre si 2-3 km e são
6 conectados pela matriz de seringueira. Como controle e visando a comparação
7 preliminar da variabilidade genética também em maior escala espacial, foram
8 amostrados 6 ninhos de ocorrência espontânea na área urbana de Salvador
9 (12°59' S 38° 28' W), cerca de 150 km ao norte.

10 Foram amostrados 20 indivíduos por ninho, que foram sacrificados em
11 álcool absoluto, onde ficavam preservados até a manipulação para a extração
12 de DNA. Outros exemplares foram coletados e sacrificados em acetato de etila
13 para montagem em alfinete entomológico e confirmação da identificação.

14

15 **Extração de DNA**

16 Para a extração de DNA foram utilizadas cinco abelhas por ninho, sendo
17 que cada abelha teve seu DNA extraído separadamente. A extração foi
18 executada segundo o protocolo de Han e McPheron (1997).

19 **Transferência dos *Primers* Microssatélites**

20 Inicialmente foram testados três *primers* derivados de *Melipona bicolor*
21 – Mbi 278, Mbi 254 e Mbi 259 – (Peters *et al.*, 1998) e três derivados de

1 *Scaptotrigona postica* – T4-171, T3-32 e T7-5 – (Paxton *et al.*, 1999). A
2 transferência desses *primers* para *T. angustula* foi realizada com modificações
3 nas condições de amplificação. Cada reação foi submetida inicialmente a uma
4 desnaturação a 93°C por 5 min. Em seguida a 40 ciclos nas seguintes
5 condições: 93° C por 30s para desnaturação, 50s de anelamento (como mostra
6 a tabela 2) e 40s de alongação a 72°C. Ao término desta etapa foi realizado um
7 ciclo extra de alongação a 72°C por 5 min. A temperatura de anelamento para
8 cada *primer* está apresentada na tabela 01.

9 Amplificações com os *primers* T4-171, T3-32 e T7-5 foram submetidos
10 a gradiente de temperatura para adequação da temperatura de anelamento.

11 Ao Término de cada PCR era realizada eletroforese em gel de agarose a
12 1,5 % para visualizar se havia amplificação da banda com tamanho em pares
13 de base igual ou similar ao descrito na literatura. O tamanho das bandas era
14 comparado com o padrão de migração das bandas em relação ao DNA padrão
15 do marcador de peso molecular de 100pb *Fermentas Life Sciences*.

16

17 **Obtenção dos Dados Microssatélites**

18 A amplificação dos fragmentos de microssatélites foram feitas através
19 de reação com o volume final de 20 µl no termociclador Mastercycler® 5333
20 da Eppendorf utilizando o kit da Taq DNA Polimerase (Fermentas Life
21 Sciences). Para cada reação de PCR com um volume final de 20 µl foram
22 utilizados: 2 µl de tampão 1 X; 2,56 µl de MgCl₂ 10 mM; 2 µl de dNTP a 20

1 μM ; 0,4 μl de cada *Primer* F e R a 10 μM ; 1,25 u de Taq polimerase; e 10,14
2 μl H₂O. Ao término de cada PCR, o produto foi separado por eletroforese em
3 gel de agarose e visualizado em transiluminador com UV.

4 Em seguida as amostras foram separadas em gel de poliacrilamida
5 desnaturante e não desnaturante 5,6%. O gel desnaturante mostrou melhor
6 resolução e por isso foi utilizado. A concentração de 5,6% não permitiu uma
7 boa resolução dos microssatélites, sendo necessário o aumento da
8 concentração do gel para 9%, o que permitiu melhor visualização das bandas.
9 O gel foi preparado com 5 ml de solução de acrilamida 40% (19g de
10 acrilamida, 1 g de bis-acrilamida para um volume final de 50 ml); 2,5 ml de
11 TBE 10X, 30,4 ml de H₂O milli-Q. Para um volume final de 50 ml a essa
12 solução foi adicionado 16 g de uréia, 20 μl de TEMED e 400 μl de persulfato
13 de amônio 10%. Os poços foram formados com pente do tipo “dente de
14 tubarão”. Em cada poço foi carregado um volume total de 4 μl , sendo 3 μl do
15 produto da PCR e 1 μl do tampão de carregamento (0,025 g de azul de
16 bromofenol, 0,025 g de xileno cianol e 1,5 g de ficoll sing tipo 400 para um
17 volume final de 10 ml). No poço central foi aplicado 1,6 μg do marcador de
18 peso molecular 10pb (INVITROGEN) juntamente com 2 μl de TE e 1 μl de
19 tampão de carregamento. A revelação do gel procedeu como segue:
20 1. O gel foi imerso em solução fixadora (40 ml de etanol absoluto, 2 ml de
21 ácido acético glacial e diluídos em H₂O destilada para um volume final de 400
22 ml) por 10 minutos;

- 1 2. O gel foi colocado em solução de nitrato de prata (900 ml de H₂O destilada
- 2 e 3 g de nitrato de prata) por 15 minutos;
- 3 3. Foi realizada lavagem por 1 min em H₂O destilada;
- 4 4. O gel foi colocado em solução reveladora (20g de NaOH, 20 ml de
- 5 formaldeído 37% e 580 ml de H₂O destilada).até o surgimento das bandas.

6 Após a revelação cada gel foi fotografado em transiluminador de luz
7 branca para posterior análise das bandas.

8

9 **Análise dos dados**

10 A determinação dos alelos foi realizada observando-se o padrão de
11 migração das bandas em relação ao marcador de peso molecular de 10 pb em
12 gel de Poliacrilamida. Os dados foram organizados de acordo com o tamanho
13 aproximado dos fragmentos. Foi atribuído um número a cada alelo em ordem
14 crescente, correspondendo ao seu tamanho em pares de base, para a confecção
15 da matriz necessária para cálculos do programa estatístico.

16 O programa GENEPOP web version 3.4 foi utilizado para o cálculo do
17 Equilíbrio de Hardy-Weinberg, frequências alélicas e genotípicas e taxa de
18 heterozigotos.

19

20

21

22

23

1 **Resultados**

2

3 **Levantamento dos ninhos**

4 Durante a procura dos ninhos foram encontrados 25 ninhos de *T. angustula*
5 em 13 hectares em áreas de mata da REM. Destes apenas 15 ninhos foram
6 acessíveis. Além desses ninhos foram utilizados seis ninhos encontrados em
7 três bairros distintos da CSA para comparação dos alelos encontrados.

8

9 **Resultados da PCR**

10

11 Os seis *primers* foram submetidos às condições de temperatura de
12 anelamento descrita para *M. bicolor* (Peters, 1998) e *S. postica* (Paxton, 1999)
13 e houve amplificação de outros fragmentos além do esperado.

14 A otimização da temperatura dos *primers* Mbi278, Mbi 254 e Mbi 259
15 já havia sido obtida pelo grupo da Dr^a Maria Cristina Arias que nos forneceu
16 os dados. Os *primers* T4-171 (figura 03 A), T 7-5(figura 03 B) e T3-32 foram
17 submetidos a testes de anelamento em termociclador de gradiente de
18 temperatura. O *primer* T4-171 amplificou apenas a banda desejada a partir de
19 58,1 °C (figura 03 A) e o T3-32 a 65°C. Entretanto o *primer* T7-5 foi
20 submetido duas vezes ao gradiente de temperatura variando de 50,7°C a 60°C
21 e de 60° a 70,5°C e posteriormente foi submetido a uma temperatura de
22 anelamento de 75°C e ainda assim continuou apresentando ampliações

1 inespecíficas que impossibilitaram a análise em gel de poliacrilamida e por
2 isso esse *primer* não foi usado.

3

4 **Locos Polimórficos**

5

6 Dos seis locos testados apenas um, T4-171, apresentou-se polimórfico
7 para a espécie (Figura 05).

8 Os locos Mbi 254, Mbi 259 o T3-32 não foram selecionados para
9 análise. Os dois primeiros por apresentarem-se monomórficos e o T3-32,
10 apesar de possuir dois alelos, todos os indivíduos apresentaram o genótipo
11 heterozigoto (Figura 4A).

12 Para análise dos dados somente o loco polimórfico foi utilizado.
13 Consideramos as seguintes populações amostrais: Guigó, Pacangê, Pancada
14 Grande e Sede – localizadas na REM – e Bonfim, Ondina e Pituba –
15 localizadas em CSA. Os genótipos encontrados e sua distribuição podem ser
16 observados na tabela 02.

17 Utilizando o programa Genepop web version 3.4 foi possível
18 visualizar a distribuição alélica nas populações amostrais. Esses resultados
19 podem ser conferidos nas tabelas 3 e 4. Observando a tabela 3 percebemos
20 que para o loco Mbi278 somente o alelo dois ocorre nas populações de SSA,
21 estando os demais alelos presentes nas populações da REM. Os alelos três e
22 quatro apareceram em um único indivíduo da população Pancada Grande com
23 o genótipo heterozigoto. Provavelmente, trata-se de alelos raros na população

1 estudada, visto que o número de indivíduos amostrados na população Guigó
2 foi superior ao amostrado na população no qual foram encontrados.

3 Analisando a tabela 5 percebemos uma distribuição mais homogênea
4 dos alelos. Notamos que apesar do alelo 40 não estar presente nas populações
5 de SSA, os demais alelos encontram-se distribuídos nas populações da REM e
6 de SSA de forma equilibrada ao relacionar os dados obtidos com o número de
7 ninhos que compõem a população amostral.

8 **Discussão**

9 **Polimorfismo nos locos**

10 A caracterização de microssatélites permite identificar a presença de
11 alelos polimórficos em uma população. (Frankham *et al.*, 2008) e portanto, é
12 uma medida muito útil de sua diversidade genética. *Primers* desenvolvidos
13 para uma espécie (heterólogos) podem ser transferidos para a análise de
14 microssatélites em outras espécies (Ferreira and Gratapaglia 1998),
15 principalmente por serem mais viáveis economicamente, e este tem sido o
16 caminho mais explorado em Meliponini (Francisco, 2002; Brito 2005;
17 Carvalho-Zilse e Kerr, 2006; Costa Pinto, 2007; Werneck, 2008).

18 Dos seis locos analisado dois apresentaram-se monomórficos: Mbi 254
19 e Mbi 259. Estes locos são microssatélites perfeitos na espécie de origem o
20 que teoricamente deveria ser uma característica favorável ao polimorfismo,
21 visto que, quando há introdução de uma ou mais bases entre as seqüências

1 repetidas os microssatélites tendem a se estabilizar e o erro da polimerase
2 durante a replicação do DNA é reduzido (Weber, 1990). Entretanto, o que se
3 observou no presente trabalho foi que a maioria dos locos que eram perfeitos
4 para a espécie, ao qual o *primer* foi desenvolvido, (três de quatro)
5 apresentaram baixo polimorfismo. Isto é evidenciado pelo fato de dois locos
6 terem sido monomórficos (Mbi 254 e Mbi 259) e um ter apresentado dois
7 alelos (T3-32) que expressavam apenas o genótipo heterozigoto em todos os
8 indivíduos analisados. Esse resultado contrasta com o que foi encontrado por
9 Chung *et al.*, (1993) e Pépin *et al.*(1995) com estudos que demonstraram que a
10 inserção de bases influencia estabilidade dos microssatélites.

11 Os locos Mbi 278 e T4-171 foram polimórficos para *T. angustula*
12 verificamos que o número de alelos foi pequeno. Porém, quando se compara
13 com trabalhos de Meliponini que também utilizaram *primers* heterólogos,
14 (Francisco, 2002; Lopes, 2004; Brito 2005; Werneck, 2008) verificamos que
15 esse tipo de resultado é freqüente. Ou seja, mesmo com uma transferência
16 bem sucedida, podemos detectar um menor grau de polimorfismo.

17 O loco Mbi 278 é composto em *Melipona bicolor* e o T4-171 perfeito
18 em *Scaptotrigona postica*, as respectivas espécies de origem. Isto pode
19 explicar o fato do T4-171 ter um número maior de alelos nas populações de
20 origem. Neste caso, o maior número de alelos observados também em *T.*
21 *angustula* pode ser explicado por o loco T4-171 ser formado pela repetição de
22 apenas dois pares de bases. Segundo Chakraborty *et al.*, (1997), os

1 microssatélites de repetições dinucleotídicas são mais suscetíveis a mutações
2 do que os formados por tri ou tetranucleotídeos.

3 Em contraste, o alelo T3-32 de *S. postica*, também formado por
4 repetições dinucleotídicas, apresentou um único alelo em *T. angustula*. Esse
5 resultado deve ser considerado com cautela, pois o polimorfismo pode estar
6 presente, mas mesmo assim não ser detectado, principalmente quando envolve
7 uma diferença pequena de repetições, por exemplo, até quatro pares de bases.

8 O mesmo loco pode ter um comportamento diferente em espécies
9 diferentes. Por exemplo, Francisco (2002) sequenciou o loco T3-32 em
10 *Plebeia remota* e identificou que nesta espécie ele é imperfeito, enquanto em
11 *S. postica* é perfeito. Dessa forma, seria aconselhável fazer o seqüenciamento
12 do loco antes de afirmar que o mesmo é monomórfico. Mesmo conhecendo as
13 características de cada microssatélite não se pode prever com segurança se
14 haverá maior ou menor probabilidade de apresentar polimorfismo. Assim,
15 também é coerente persistir no teste de locos de microssatélites na busca de
16 polimorfismo, principalmente quando se está usando *primers* heterólogos.

17 Um problema básico da transferência de *primers* interespecíficos é a
18 redução na detecção de locos polimórficos, em relação ao observado na
19 espécie de origem (Francisco, 2002; Brito 2005; Werneck, 2008; Lopes,
20 2004). Apesar de viabilizarem inferências sobre a estrutura populacional,
21 Francisco *et al.*, (2006) ressaltaram que os resultados de transferência de
22 *primers* heterólogos devem ser interpretados com cautela.

1 A transferência tem mais chances de produzir bons resultados quanto
2 mais próximos taxonomicamente os organismos envolvidos (Carvalho-Zilse
3 and Kerr, 2006). Trabalhos de filogenia evidenciaram que o gênero
4 *Tetragonisca* apresenta uma relação mais distante com *Melipona* (Michener,
5 2000, Costa *et al.*, 2003 e Guedes, 2007), e uma relação mais próxima com
6 *Scaptotrigona* (Costa *et al.*, 2003 e Guedes, 2007) explicação parcial para o
7 resultado encontrado no presente estudo.

8

9 **Fluxo gênico entre as populações**

10 A fragmentação avançada dos habitats de floresta, como se observa na
11 área da REM (Flesher, 2006) predispõe as (sub) populações em mosaico à
12 endogamia. Este fenômeno pode ser caracterizado em uma população pela
13 redução nas taxas de heretozigotos em relação à frequência esperada em 15
14 cruzamentos aleatórios (Hartl, 2008; Frankham *et al.*, 2008).

15 A subdivisão populacional é um dos principais fatores que levam à
16 deficiência de heterozigotos, de acordo com o principio de Hard-Weinberg
17 (Callen *et al.*, 1993). De maneira análoga, a baixa frequência de homozigose
18 em vários locos significaria que as (sub) populações locais de *T. angustula*
19 estariam se intercruzando e mantendo o fluxo entre os fragmentos. Esta é uma
20 das premissas do estudo, dado que a espécie focal ocupa vários sítios de
21 nidificação e tipos de habitats (Batista, 2003; Ramalho e Batista, 2005). O
22 teste para a verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg indicou que a

1 maioria das populações amostrais de *T. angustula* encontra-se em equilíbrio.
2 Entretanto, como esse é o resultado da análise de um único loco polimórfico,
3 não é possível ainda avaliar o grau de fluxo gênico entre as populações da
4 REM.

5 Ainda assim, dada a fragmentação física dos habitats na REM, o fato de
6 alguns alelos estarem presentes apenas em uma das (sub) populações
7 estudadas sugere perda de conectividade funcional na paisagem o que foi
8 observado no loco T4-171.

9 Apesar do hábito generalista de *T. angustula*, a fundação bem sucedida
10 de novos ninhos depende da oferta de cavidades pré-existentes nos habitats
11 naturais ou modificados, nas proximidades do ninho materno. Assim,
12 dependendo da qualidade da mudança na paisagem com o desmatamento e
13 plantio extensivo da seringueira, pode haver perda de conectividade funcional
14 entre os fragmentos florestados, o que forneceria uma explicação para a
15 ocorrência de alelos exclusivos em alguns fragmentos da REM

16 Apesar da impossibilidade de aprofundar as análises quantitativas, dado
17 o número de locos polimórficos detectados até o momento, ainda assim os
18 dois locos (Mbi278 e T4-171) sugerem que não há maior estruturação espacial
19 na população urbana da CSA do que na REM, embora haja diferenças
20 aparentes entre as duas populações. Assim, as premissas básicas do estudo
21 devem ser mantidas até que se possa melhorar a análise quantitativa : 1) a
22 estruturação espacial das populações dentro da REM não difere da

1 estruturação espacial dentro da CSA; ou seja, os efeitos da fragmentação em
2 meio à matriz de seringueira são equivalentes aos efeitos de habitats urbanos,
3 nesta espécie generalista; 2) há menos polimorfismo na CSA e isto seria
4 resultado de efeito fundador na área urbana e, não necessariamente, da maior
5 perda de conectividade neste tipo de hábitat.

6

7 **Agradecimentos**

8 A Plantações Michelin da Bahia pelo auxílio financeiro ao trabalho. À
9 Dr^a Maria Cristina Arias e ao Dr. Marco Antônio Costa por cederem alíquotas
10 de *primers* para testes. À Dr^a Luciana Veiga e à Dr.^a Renata Lima pelo auxílio
11 nos Laboratório de Biologia Molecular Carmem Lemos e Laboratório de
12 Genética Humana do IBIO-UFBA, respectivamente. À Dr^a Patrícia
13 Domingues de Freitas pelo auxílio nas análises estatísticas. A todos os
14 componentes do Laboratório de Ecologia da polinização pelo suporte no
15 campo.

16

17

18

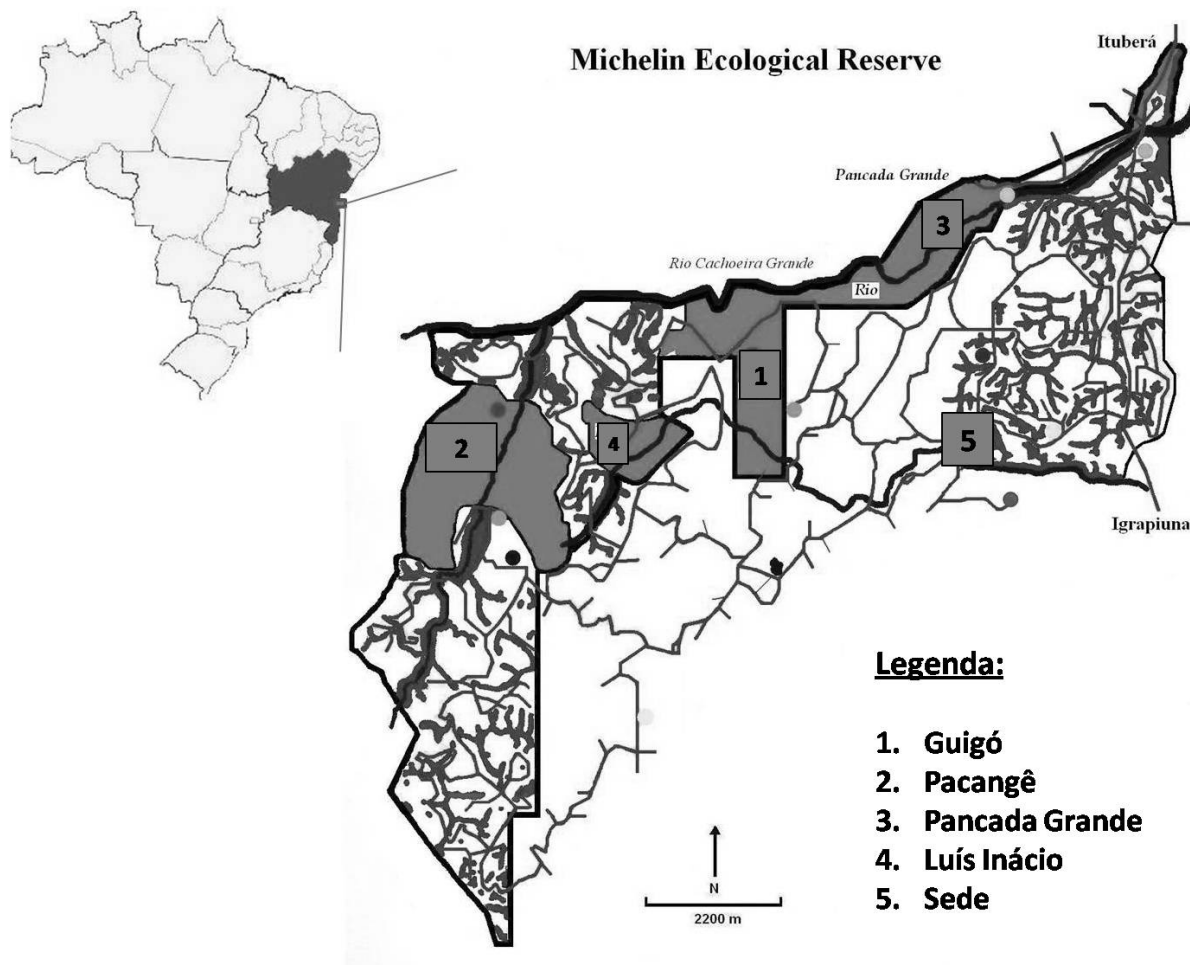
19

20

21

22

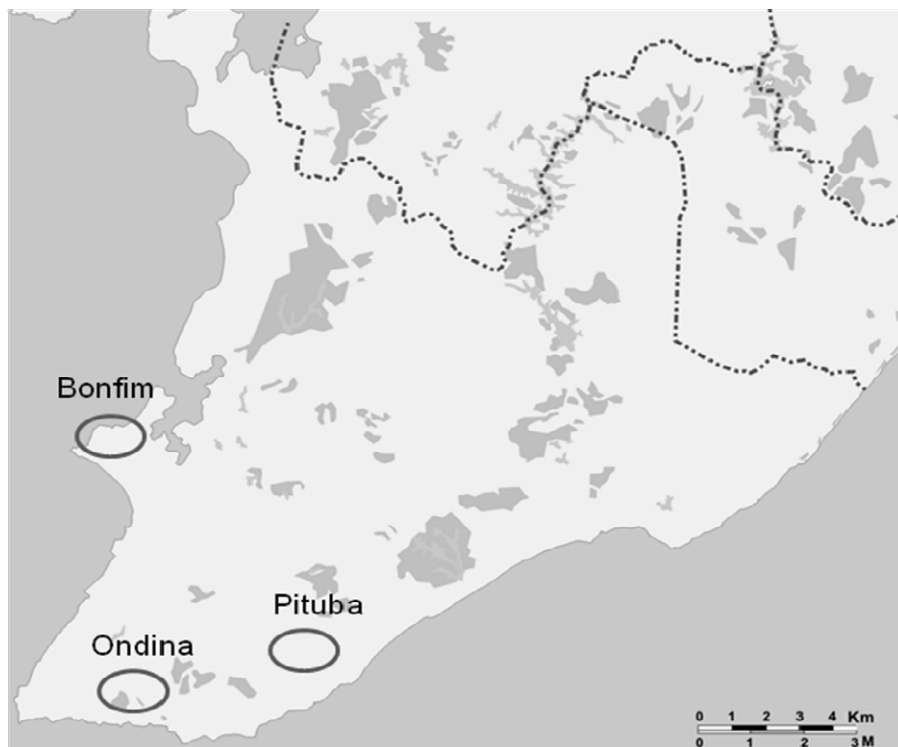
1 **Figura 01:** Mapa da Reserva Ecológica da Michelin com a localização dos ninhos.



- Legenda:**
- 1. Guigó
 - 2. Pacangê
 - 3. Pancada Grande
 - 4. Luís Inácio
 - 5. Sede

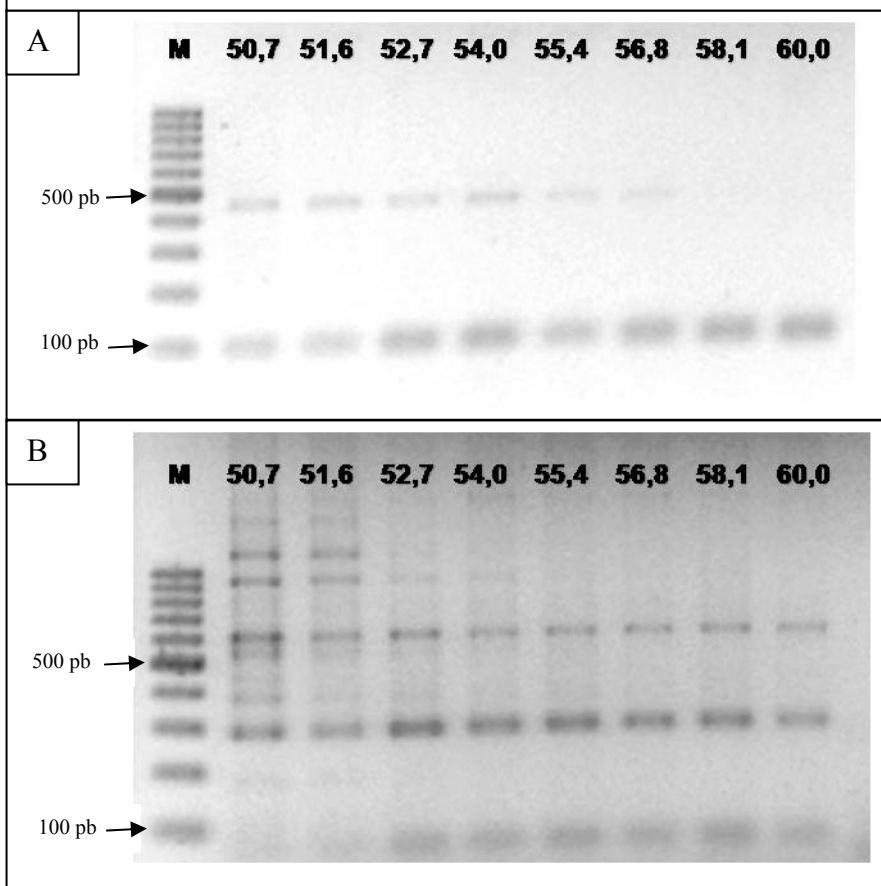
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

- 1 **Figura 02:** Mapa da Cidade do Salvador com a localização dos bairros onde foram
2 coletados indivíduos.
3

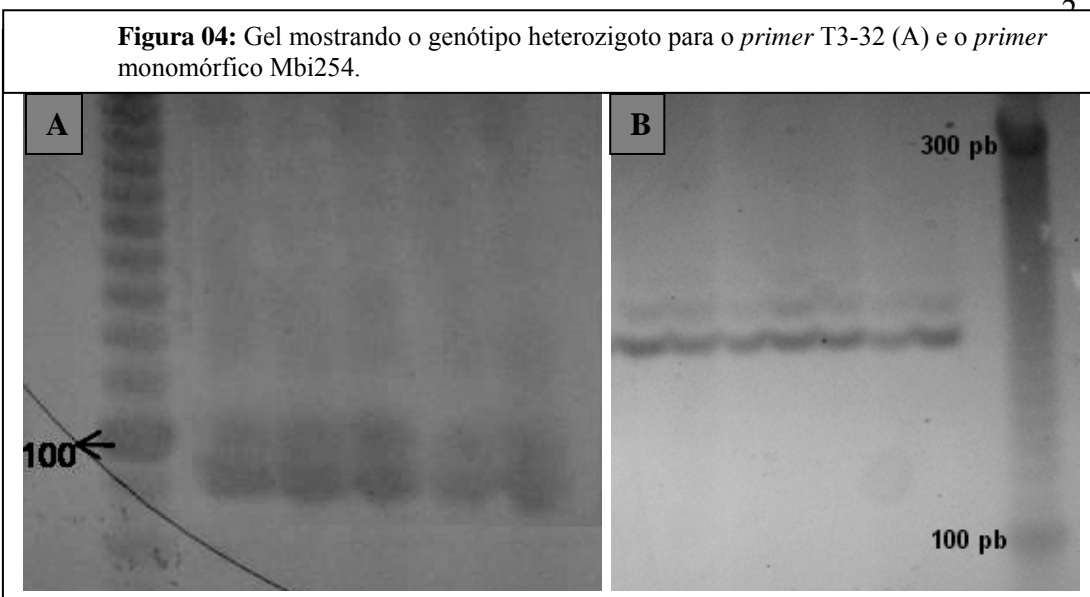


- 4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

Figura 03: Gradiente de temperatura em °C para o *primer* T4-171 (A) e para o *primer* T7-5(B) evidenciando a presença de bandas inespecíficas. M refere-se ao marcador de peso molecular; os números representam a temperatura de anelamento utilizada no gradiente.



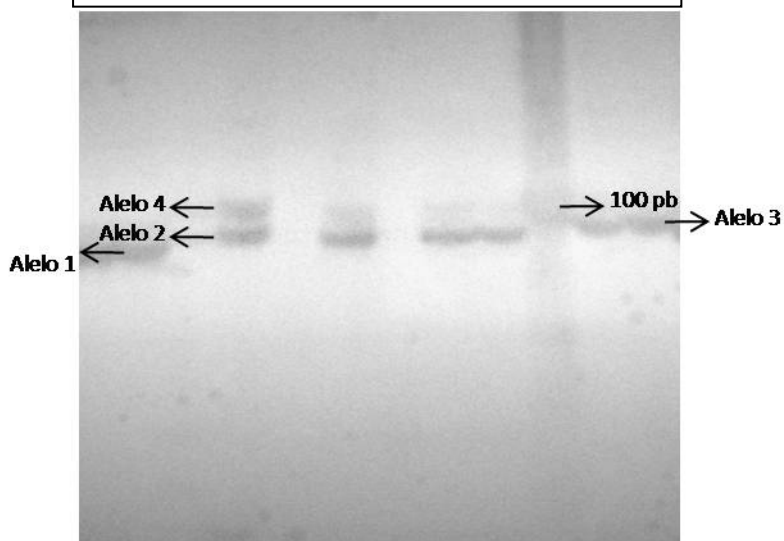
1



- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44

1
2

Figura 05: Gel mostrando os alelos do Loco T4-171



3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

1 **Tabela 01: Temperaturas de anelamento (Ta) para cada loco testado.**

Loco	Ta (°C)
Mbi 278	60
Mbi 254	65
Mbi 259	60
T3-32	65
T4-171*	58,1
T7-5 **	75

2 * Loco com mais de dois alelos

3 ** Apresentou amplificações inespecíficas

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

1 **Tabela 2:** N° de genótipos por loco em cada local de coleta.

Local Loco	REM			SSA		
	Guigó	Pancada	Pacangê	Bonfim	Ondina	Pituba
Mbi278	2	3	1	1	1	1
Mbi254	1	1	1	1	1	1
Mbi259	1	1	1	1	1	1
T4-171*	6	4	1	1	4	2
T3-32	1	1	1	1	1	1
T7-5	-	-	-	-	-	-

2

3

* Loco utilizado para análise estatística.

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

1 **Tabela 03** : Frequência alélica para o loco Mbi 278 por população amostral.

Populações	Alelos			
	1	2	3	4
Guigó*	0,7	0,3	0	0
Pancada*	0,82	0,13	0,25	0,25
Pacangê*	1	0	0	0
Sede*	0	1	0	0
Bonfim**	0	1	0	0
Ondina**	0	1	0	0
Pituba**	0	1	0	0

2 *Populações da Reserva da Michelin

3 ** Populações de Salvador

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

1 **Tabela 04** : Frequência alélica para o loco T4-171 por população amostral

Populações	Alelos			
	10	20	30	40
Guigó*	0,22	0,3	0	0
Pancada*	0,42	0,13	0,25	0,25
Pacangê*	0	0	0,5	0,5
Sede*	-	-	-	-
Bonfim**	0,5	0	0,5	0
Ondina**	0,78	0,11	0,11	0
Pituba**	0,55	0,45	0	0

2 *Populações da Reserva da Michelin

3 ** Populações de Salvador

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

1 **Tabela 05:** Análise do loco T4-171: **Na** – número de alelos, **Ni**: Número de ninhos, **N**:
 2 Número de indivíduos amostrados, **He**: Heterozigozidade esperada, **Ho**: Heterozigozidade
 3 observada. **P** < 0,05.

4

Populações	Na	Ni	N	P	He	Ho
Guigó*	4	7	35	0,031	0,73	0,56
Pancada*	3	5	25	0,006	0,67	0,42
Pacangê*	1	1	5	1	0,57	1
Sede*	-	-	-	-	-	-
Bonfim**	2	1	5	1	0,67	1
Ondina**	3	3	15	0,214	0,10	0,29
Pituba**	2	2	10	0,003	0,52	0

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

Conclusões

1

2

3

4

5

• A utilização de microssatélites é boa para estudos de ecologia, principalmente quando se aborda temáticas ligadas à conservação, no entanto, para se obter respostas mais precisas é melhor utilizar *primers* específicos;

8

9

• Serão necessários estudos com um maior número de *primers* polimórficos para poder avaliar se o fluxo gênico está sendo prejudicado pela paisagem em mosaico presente na Reserva ecológica da Michelin.

10

11

12

13

Referências Bibliográficas

- 1
2
3 Andren H (1994) Effects of Habitat Fragmentation on Birds and Mammals in
4 Landscapes with Different Proportions of Suitable Habitat - a Review.
5 *Oikos* 71: 355-366.
6
7 Arias MC, Brito RM and Francisco FO, *et al.* (2006) Molecular markers as a
8 tool for population and evolutionary studies of stingless bees.
9 *Apidologie* 37: 259-274.
10
11 Batista MA, Ramalho M and Soares AEE (2003) Nesting sites and abundance
12 of Meliponini (Hymenoptera: Apidae) in heterogenous habitats of the
13 Atlântic Rain Forest, Bahia, Brazil. *Lundiana* 4(1): 19-23
14
15 Brito RM (2005) Análise Molecular e populacional de *Partamona mulata*
16 (Moura e Camargo, 1980) e *Partamona heleri* (Fiese, 1900)
17 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) PhD thesis, Instituto de
18 Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
19
20 Callen DL, Thompson AD and Philips HA *et al.* (1993) Incidence and origin
21 of “null” alleles in the (AC)_n microsatellites markers. *American Journal*
22 *of Human Genetics* 52: 922-927.
23
24 Carvalho-Zilse GA and Kerr WE (2006) Utilização de marcadores
25 microsatélites para estudos populacionais em *Melipona scutellaris*
26 (Apidae, Meliponini). *Magistra* 18: 213-220.
27
28 Castanheira EB and Contel EPB (2005) Geographic variation in *Tetragonisca*
29 *angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Journal of Apicultural*
30 *Research* 44: 101-105.
31
32 Costa MA, Del Lama MA, Melo GAR and Sheppard WS (2003) Molecular
33 phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred
34 from mitochondrial 16S rDNA sequences. *Apidologie* 34, 73-84.
35
36 Costa-Pinto MFF (2007) Caracterização de locos microssatélites em duas
37 espécies de abelhas da região amazônica: *Melipona compressipes* e
38 *Melipona seminigra* (Hymenoptera: Apidae: Meliponina), MSc thesis ,
39 Instituto de Pesquisas da Amazônia.
40

- 1 Chakraborty R, Kimmel M and Stivers DM, *et al.* (1997) Relative mutation
2 rates di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. Proceedings of the
3 National Academy of Science of the USA 94: 1041-1046.
4
- 5 Chung M, Ranum LPW and Duvick LA, *et al.* (1993) Evidence for a
6 mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in
7 spinocerebellar ataxia type I. Nature Genetics 5:254-258.
8
- 9 Farah SB (2000) DNA Segredos e Mistérios . Savier. São Paulo. SP
10
- 11 Flesher, K.M. (2006). The biogeography of the medium and large mammals in
12 a undominated landscape in the Atlantic Forest of Bahia, Brazil:
13 evidence of the role of agroforestry systems as wildlife habitat. Tese .
14 Program in Ecology and Evolution. School-New Brunswick Rutgers,
15 The State University New Jersey.
- 16 Ferreira ME and Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores
17 moleculares em análise genética 2.ed. EMBRAPA-CENARGEN,
18 Brasília.
19
- 20 Francisco F.O. (2002) Diversidade Genética de populações de Abelhas sem
21 ferrão *Plebeia remota*: análise do DNA mitocondrial e microssatélites.
22 Dissertação, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São
23 Paulo, SP.
24
- 25 Francisco F. O. Brito R.M. and Arias M.C.(2006) Allele number and
26 heterozygosity for microsatellite loci in diferentes stingless bees species
27 (Hymenoptera: Apidae, Meliponini) Neotropical Entomology
28 35(5):638-643.
29
- 30 Frankham R, Ballou J D, Briscoe DA (2008) Fundamentos da genética da
31 Conservação. Editora da Sociedade Brasileira de genética, 280 p.
32
- 33 Guedes MLS, Batista MA, Ramalho M, Freitas MHB and Silva EM (2005)
34 Breve incursão sobre a biodiversidade da Mata Atl. p.39-92. “In” C.R.
35 Franke, P.L.B. Rocha, W. Klein and S.L. Gomes, Mata Atlântica e
36 Biodiversidade. EDUFBA. 476p.
37
- 38 Haavie J, SÆTRE GP and MOUM T (2000) Discrepancies in population
39 differentiation at microsatellites, mitochondrial DNA and plumage
40 colour in the pied flycatcher inferring evolutionary processes. Molecular
41 Ecology 9: 1137–1148.
42

- 1
2 Han HY and McPherson BA (1997) Molecular Phylogenetic Study of
3 Tephritidae (Insecta: Diptera) Using Partial Sequences of the
4 Mitochondrial 16S Ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and*
5 *Evolution*. v.7, n.1, p.17-32.
6
7
8 Harlt DL, Clark AG (1997) *Principles of Population Genetics*. 3^a ed. Sinauer
9 Associates, Inc. Publishers, Canadá.
10
11 Guedes CES (2007) *Filogenia Molecular da abelhas indígenas sem ferrão*
12 *Hymenoptera: Apidae: Meliponini*- Dissertação –Departamento de
13 *Ciências Biológicas – universidade estadual de Santa Cruz*.
14
15 Lopes DM (2004) *Diversidade e Estrutura Genética em Populações de*
16 *Melipona rufiventris e Melipona mondury (Hymenoptera: Apidae) por*
17 *análise de microssatélites*. Dissertação - Mestrado em Genética e
18 *Melhoramento Universidade Federal de Viçosa*.
19
20 Michener CD (2000) *The bees of the world* .Baltimore: Johns Hopkins.
21
22 Monteiro D and Ramalho M (2009) *Abelhas Generalistas (Hymenoptera,*
23 *Apidae, Meliponina) e Sucesso Reprodutivo de Árvores com Florada*
24 *em Massa de *Stryphnodendron pulcherrimum* (Willd.) Hochr., (Fabales-*
25 *Mimosaceae) na Mata Atlântica (Bahia)*. *Neotropical Entomology – no*
26 *prelo*.
27
28 Nogueira-Neto P (1997) *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. São
29 Paulo, SP: Nogueirapis. 446 p.
30
31 Oliveira RC, Nunes FMF and Campos APS *et al.* (2004) Genetic divergence
32 in *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae,
33 Trigonini) based on RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*
34 27, 181-186.
35
36 Paxton RJ, Weibschuh N and Engels W, *et al.* (1999) Characterization of
37 dinucleotide microsatellite locos for stingless bees. *Molecular Ecology*
38 8: 511-519.
39
40 Pépin L, Amigues Y and Lépling A *et al.* (1995) Sequence conservation of
41 microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and
42 related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny
43 analysis. *Heredity* 74:53-61.

- 1
2 Peters JM, Queller DC and Imperatriz-Fonseca VL *et al.* (1998) Microsatellite
3 locos for stingless bees. *Molecular Ecology* **7**:783-792.
4
- 5 Primmer CR and Merilä J (2000) A low rate of cross-species microsatellite
6 amplification success in Ranid frogs. *Conservation Genetics* **3**:445-449.
7
- 8 Ramalho, M. (2004) Stingless bees and mass flowering trees in the canopy of
9 atlantic forest: a tight relationship. *acta bot. bras.*, **18**:37-47.
10
- 11 Ramalho M and Batista MB (2005) Polinização na Mata Atlântica:
12 perspectiva ecológica da fragmentação. p.93-142. "In" C.R. Franke,
13 P.L.B. Rocha, W. Klein and S.L. Gomes, *Mata Atlântica e*
14 *Biodiversidade*. EDUFBA. 476p.
15
- 16 Roubik DM (1989). *Ecology and natural history of tropical bees*. Cambridge
17 University Press. 514p.
18
- 19 Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends in*
20 *Ecology and Evolution* **15**, 199-203.
21
- 22 Vilela PMS (2004) Caracterização genética de populações de jacaré-de-papo-
23 amarelo (*Caiman latirostris*), utilizando marcadores microssatélites.
24 MSc thesis, Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo,
25 São Paulo, SP.
26
- 27 Velthuis H W (1997) *Biologia das abelhas sem ferrão*. São Paulo, SP:
28 Universidade de São Paulo. 33 p
29
- 30 Weber JL (1990) Informativeness of humans (dC-dA)_n .(dG-dT)_n
31 polymorphisms. *Genomics* **7**:524-530.
32
- 33 Werneck MV (2008) Uso de marcadores microssatélites para análise genética
34 de populações de *Melipona mandacaia* SMITH, 1863 (Hymenoptera,
35 Apoidea) no estado da Bahia. Dissertação. Mestrado em Biologia
36 Celular e Estrutura, Universidade Federal de Viçosa, MG.
37
- 38 Wiens JA (1995) Habitat Fragmentation - Island V Landscape Perspectives on
39 Bird Conservation. *Ibis* **137**, S97-S104.
40
- 41 Zaú AS (1998) Fragmentação da Mata Atlântica: aspectos teóricos. *Floresta e*
42 *Ambiente* **5**(1): 160-170.
43

1 **Anexo: Instruções aos autores para publicação na revista *Molecular***
2 ***Ecology***

3 ***Molecular Ecology***

4 **Edited by:**

5 Loren Rieseberg

6 **Print ISSN:** 0962-1083

7 **Online ISSN:** 1365-294X

8 **Frequency:** Twice Monthly

9 **Current Volume:** 18 / 2009

10 **ISI Journal Citation Reports® Ranking:** 2007: 47/263 (Biochemistry & Molecular
11 Biology); 6/116 (Ecology); 5/35 (Evolutionary Biology)

12 **Impact Factor:** 5.169

13 **Author Guidelines**

14 **General Information**

15 Molecular Ecology publishes papers that utilise molecular genetic techniques to address
16 consequential questions in ecology, evolution, behaviour and conservation. We discourage
17 papers that are primarily descriptive and relevant only to the taxon being studied, or those
18 that employ RAPD markers (except in certain cases: see below for details). Studies may
19 employ neutral markers for inference about ecological and evolutionary processes or
20 examine ecologically important genes and their products directly. Molecular Ecology
21 concentrates on primary research articles (i.e. Original Articles) but operates a flexible
22 policy regarding other submissions, including Reviews, Opinion Articles and Comments.
23 We also publish Technical, Computer and Primer notes in our companion publication,
24 Molecular Ecology Resources <http://www.blackwellpublishing.com/mer>. We recommend
25 that papers with a strongly applied focus be directed to Evolutionary Applications
26 <http://www.blackwellpublishing.com/eva>. We aim for primary editorial decision times of 2-
27 3 months and publication times after receipt of final accepted manuscripts similarly of 2-3
28 months.

29 **Editorial Office**

30 Managing Editor Dr Tim Vines

31 email: managing.editor@molecol.com

32 **Molecular Ecology Editorial Office**

33 6270 University Blvd

34 Vancouver, BC

35 V6T 1Z4

36 Canada

37 email: editorial.office@molecol.com

38 **Types of articles published**

39 Molecular Ecology will consider several types of articles. Papers in all categories may,
40 where appropriate, present supplementary material for web-only publication.

1 *Original Articles*

2 Our principal function is to publish primary research papers. Such papers are reports of
3 research projects that are complete to the extent that they yield valuable insights into topics
4 within our coverage. About 90% of all papers we publish are in this category. Original
5 Articles have limits of 8000 words per paper (all text excluding tables and figure legends).

6 *Fast-Track Papers*

7 Fast-Track is a special category of submission, introduced in 2004, reserved for
8 manuscripts of exceptional interest to a wide audience and that address significant
9 questions in ecology, evolution, behaviour or conservation. We aim for receipt-to-decision
10 times of a month or less, and accepted papers will have priority for publication in the next
11 available issue of *Molecular Ecology*. Upon receipt, the Fast Track Editor will immediately
12 review submissions for content and impact. Submissions that do not meet stringent
13 standards will be returned at that stage without review, or they will be invited for
14 resubmission as regular full papers. Fast-Track manuscripts must be brief and focused, in
15 4000 words or less, with up to 5 display items (tables and figures). Two colour figures will
16 be allowed free of charge.

17 *Opinion Articles*

18 We will occasionally publish articles presenting points of view that are relevant and
19 potentially controversial as a means of encouraging debate. Such manuscripts may present
20 speculative and provocative viewpoints, although they must be conditioned by the normal
21 standards of scientific objectivity and will be subject to peer review. Opinion Articles
22 should not present new data.

23 *Comments*

24 Comments on published papers, principally those published in *Molecular Ecology*, will be
25 considered by the editors and published after consultation and possible rebuttal by the
26 original author(s). Such manuscripts should be as brief as possible.

27 *Review Articles*

28 The editors occasionally invite commissioned reviews from individuals who have major
29 contributions to make to the field of molecular ecology. All colour figures in review articles
30 are published free of charge. We will consider unsolicited reviews, but authors wishing to
31 present such papers should contact the Managing Editor in advance.

32 NOTE: *Molecular Ecology* no longer accepts Short Communications for publication.

33 **Guidelines for Manuscript Submission**

34 *Molecular Ecology* now accepts manuscripts via Manuscript Central, an online submission
35 system. This system streamlines the submission process and ensures all authors' work is
36 processed quickly and efficiently. If an author cannot submit the MS using the electronic
37 procedures outlined below, they should contact the Managing Editor by email to ascertain
38 whether or not an exception can be made.

39 **Submission Procedure**

40 To submit your article, first create an account on Manuscript Central. This can be done at
41 <http://mc.manuscriptcentral.com/mec>. Access the 'Author Centre', click on the 'submit new
42 manuscript' link, and follow the instructions to submit your manuscript. The procedure
43 consists of seven simple steps, which you are guided through by our online system. The
44 help function is always available for any questions

1 you might have. If you have any questions that cannot be addressed by the online help,
2 please direct them to the Editorial Office at editorial.office@molecol.com.

3 **Preparing Manuscripts for Submission**

4 Questions: If you have any questions that cannot be addressed by the online help, please
5 contact the Editorial Office at editorial.office@molecol.com.

6 *Covering Letter*

7 A brief message addressed to the Managing Editor should indicate you wish to submit your
8 manuscript for consideration, along with any relevant information you wish to convey to
9 the subject editor. If the MS is a resubmission of a previous manuscript, details of the
10 changes made should be placed in the 'response to reviewers' box in step 1 of the
11 resubmission process.

12 *Manuscript File*

13 The standard procedure is for you to prepare the MS using Microsoft Word. Except for the
14 situation outlined below, manuscripts submitted in PDF form will not be accepted, as our
15 typesetting programs cannot access data in PDF files.

16 If your MS contains complex mathematical symbols not covered by standard versions of
17 Word, (e.g., if the MS has been prepared in LaTeX) please ensure that you upload all
18 additional files required to read your document, as well as providing a PDF proof for our
19 typesetters to use as reference. Authors can upload their LaTeX and EPS (figure) source
20 files to MS Central, designating them "LaTeX support files". These will be used for
21 typesetting purposes and must be re-uploaded with each version of a paper. A single .zip
22 file containing all source files should be uploaded. The accompanying PDF should be
23 designated as the "main document" during the file submission stage.

24 Keep the file as small as possible to facilitate information transmission (max 50 MB). Do
25 not use any form of compression or zipping, excepting with LaTeX support files as outlined
26 above, as these can interfere with our uploading process.

27 *Format*

28 To facilitate viewing on screen, please format your manuscript with 2.5 cm side margins, 3
29 cm top and bottom margins, and clear paragraph delimitations. All manuscripts must be
30 double-spaced with page numbers and continuous line numbers.

31 *Text*

32 The first text page should contain: 1. Title; 2. Author's names with initials; 3. Full postal
33 address(es); 4. Four to six keywords for indexing purposes; 5. Name, address, fax number
34 and electronic mail address of corresponding author, to whom proofs will be sent; 6.
35 Running title of no more than 45 characters, including spaces.

36
37 The second page should contain the Abstract, which should be less than 250 words for Full
38 Papers and 100 Words for Fast-Track articles and Opinion articles. Note that these word
39 limits are within, not additional to, the total limit for the MS category. Comments should
40 not have abstracts. Each MS should normally comprise: Title, Abstract, Introduction,
41 Materials and Methods, Results, Discussion, References, Acknowledgements, Figure
42 Legends, Tables and Figures, in this order.

43 *Tables and Figures*

44 Tables and figures can be submitted separately, and they will appear after the main

1 document. Colour images are welcome, but authors are charged for colour production (see
2 Final MS Preparation). In the full-text online edition of the journal, figure legends may be
3 truncated in abbreviated links to the full screen version. Therefore, the first 100 characters
4 of any legend should inform the reader of key aspects of the figure. Table captions should
5 be integral with and appear above the data tables. Footnotes for tables should be given
6 below the table.

7 *Preparation of Figures*

8 Please ensure that electronic artwork is prepared such that, after reduction to fit across one
9 column, two-thirds page width, or two columns (80 mm, 112 mm, or 169 mm, respectively)
10 as required, all lettering and symbols will be clear and easy to read, i.e. no axes labels
11 should be too large or too small. Figure files should be supplied as follows. Photographic
12 figures should be saved in tif format at 300 d.p.i. (or failing that in jpg format with low
13 compression). Line figures should be saved as vector graphics (i.e. composed of lines,
14 curves, points and fonts; not pixels) in eps or pdf format, or embedded as such in Word, as
15 this enhances their display when published online. Combination figures (those composed of
16 vector and pixel/raster elements) should also be saved in eps or pdf format where possible
17 (or embedded as such in Word). If line figures and combination figures cannot be saved in
18 vector graphics format, they should be saved in tif format at high resolution (i.e. 600 d.p.i.).
19 Do not save them in jpg format. If you are unsure about the resolution of your tif files,
20 please zoom in and check that fonts, curves and diagonal lines are smooth-edged and do not
21 appear blocky when viewed at high magnification. Note that line and combination figures
22 supplied in tif format are downsampled for online publication and so authors should
23 preferentially opt for vector graphic formats for these figure types (full resolution tif files
24 are used for print publication). Further details are available at
25 <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp>.

26 *Supporting Information*

27 Supporting Information give authors the opportunity to present data in different formats
28 than traditional print media. Large datasets can be submitted as separate files for on-line
29 publication as Supporting Data. Supporting Data must be submitted during the review
30 process. Please note that supporting data should be uploaded in a separate file and given the
31 file designation "Supporting Information for online publication only".
32 For more information on preparing supporting data, please see:
33 <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/suppmat.asp>

34 *References*

35 Authors should use the Harvard system. When there is a single author, references should be
36 indicated in the text by the surname of the author with the year of publication, for example
37 (Healy 1998). References to more than one publication by an author in the same year
38 should be distinguished with lower-case letters, for example (King 1990a,b). The reference
39 should be placed in parentheses unless the name forms part of the text, for example
40 "Cowles (1982) has demonstrated that..." If no person is named as author, the name of the
41 appropriate body should be used, for example (Genetical Society 1977). When there are
42 two authors, use both names and the year, for example (Ribble & Ballew 1997). When
43 there are more than two authors, use the first author followed by et al. Unpublished studies
44 and personal communications should be referred to in the text only using the author's
45 initials, surname, institution and city.

1 Journal titles should not be abbreviated in the References. The full list of references should
2 be typed in alphabetical order, formatted with a hanging intent, and double-spaced at the
3 end of the article, as shown in the following examples. Where there are six or more authors,
4 only the first three should be listed, followed by et al.

5 Gray IC (1991) *Polymorphic tandemly repeated sequences in human DNA*. PhD thesis,
6 University of Leicester.

7 Milligan B (1992) Plant DNA isolation. In: *Molecular Genetic Analysis of Populations: a*
8 *Practical Approach* (ed. Hoelzel AR), pp. 59-88. IRL Press, Oxford.

9 Saito I, Stark GR (1986) Charomids: cosmid vectors for the efficient cloning and mapping
10 of large or small restriction fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*
11 *the USA*, **83**, 8664-8668.

12 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 2nd
13 edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

14 *References in Articles*

15 We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference
16 management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here:

17 <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

18 Reference Manager reference styles can be searched for here:

19 <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

20 *Cover Images*

21 Molecular Ecology uses images associated with published papers as covers for the journal.
22 Authors are invited to submit candidate images, either with their manuscript or separately,
23 preferably in electronic form, for consideration for the cover. Images should be no larger
24 than 600 dpi. We prefer images in landscape format as this fills the space on the journal
25 cover most effectively. Images should seek to be aesthetically pleasing and, wherever
26 possible, to present a message related to the specific topic of the paper or the general
27 coverage of the journal. Montages are particularly welcomed. It is important that authors
28 submit a suitable brief caption to the image together with a photo-credit where appropriate.
29 Images submitted as prints or transparencies will be returned to authors, if requested.

30
31 Copyright forms *must* be signed before your cover image is published. Please provide the
32 cover image copyright release form when submitting a cover image suggestion. This form
33 can be found here: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/mec_cover.pdf. If your image
34 is not selected, your form and image will not be used for any other purpose. Please note that
35 failure to provide a cover image release form may result in your image not being selected to
36 go to press.

37 *Author Information Box*

38 Authors are invited to include a brief Author Information Box, which should appear at the
39 end of the paper. This is not mandatory. The box provides an opportunity to present brief
40 details of the authors and the overall research projects within which the published work has
41 been carried out. The boxes are not intended to replace standard acknowledgments, but
42 rather to provide readers with an outline of the structure and objectives of the research
43 teams, or groups, responsible for the work. It should be a maximum of 100 words in length.
44 Submitting authors should consult a recent issue of the Journal for guidance.

1 **Notes for Accepted Manuscripts**

2 The following items must be provided before your submission can be published. These files
3 can either be uploaded during the revision process, or e-mailed to the editorial office at
4 editorial.office@molecol.com.

5 1. Copyright Transfer Agreement: www.wiley.com/go/ctaaglobal

6 2. Colour Work Agreement*:

7 http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_F_CoW.pdf

8 *All colour figures are published free of charge online. It is the policy of Molecular
9 Ecology for authors to pay the full cost for print reproduction of colour artwork. This cost
10 is £150 for the first colour figure and £50 per additional figure.

11 You are therefore required to complete a colour work agreement form before your paper
12 can be published if your manuscript contains any colour images.

13 In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures in the
14 printed version of the journal, Molecular Ecology offers authors the opportunity to
15 reproduce the figures in colour for free in the online version of the article (but they will still
16 appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this
17 free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office to ensure that
18 the appropriate documentation is completed for the Publisher.

19 Once these two items have been signed by the corresponding author (or other institutional
20 authority) scan the completed document and upload the image file, designating the file type
21 to correspond with the appropriate form during the uploading stage of the revision process.

22 **Publishing Information**

23 *Exclusivity and Copyright*

24 Manuscripts must be submitted exclusively to Molecular Ecology and we will only
25 consider them for publication on the understanding that they have not been, nor will be,
26 published elsewhere. If accepted, the copyright to papers is assigned to the journal. A
27 statement confirming that all authors give formal consent to publication should accompany
28 manuscripts in the covering letter. Permission to use published material elsewhere will be
29 granted on request.

30 *Copyright Transfer Agreement*

31 Authors will be required to sign an Copyright Transfer Agreement (CTA) for all papers
32 accepted for publication. Signature of the CTA is a condition of publication and papers will
33 not be passed to the publisher for production unless a signed form has been received. Please
34 note that signature of the Copyright Transfer Agreement does not affect ownership of
35 copyright in the material. (Government employees need to complete the Author Warranty
36 sections, although copyright in such cases does not need to be assigned).

37 After submission authors will retain the right to publish their paper in various
38 medium/circumstances (please see the form for further details). To assist authors, an
39 appropriate form will be supplied by the Editorial Office. Correspondence to the journal is
40 accepted on the understanding that the contributing author licences the publisher to publish
41 the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights
42 relating to the journal and its contents. Please download the CTA form [here](#).

43 *OnlineOpen*

44 OnlineOpen is a pay-to-publish service from Blackwell that offers authors whose papers
45 are accepted for publication the opportunity to pay up-front for their manuscript to become
46 open access (i.e. free for all to view and download) via the Wiley Interscience website.

1 Each OnlineOpen article will be subject to a one-off fee of \$3000 US to be met by or on
2 behalf of the author in advance of publication. Upon online publication, the article (both
3 full-text and PDF versions) will be available to all for viewing and download free of
4 charge. The print version of the article will also be branded as OnlineOpen and will draw
5 attention to the fact that the paper can be downloaded for free via the Wiley Interscience
6 service. Papers published OnlineOpen are, by default, sent onto PubMed Central.

7 Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the
8 combined payment and copyright licence form available from our website at:

9 http://www.blackwellpublishing.com/pdf/MEC_OOF.pdf.

10 Once complete this form should be sent to the Editorial Office along with the rest of the
11 manuscript materials at the time of acceptance or as soon as possible after that (preferably
12 within 24 hours to avoid any delays in processing). Do not inform the Editorial Office that
13 you intend to publish your paper OnlineOpen before acceptance. The copyright statement
14 for OnlineOpen authors will read:

15 © [date] The Author(s) Journal compilation

16 © [date] Blackwell Publishing Ltd

17 *Early View*

18 Molecular Ecology is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View
19 articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a
20 printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having
21 to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They
22 have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final
23 corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be
24 made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet
25 have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the
26 traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows
27 the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication,
28 the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More
29 information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

30 *Colour Artwork and Photographs*

31 In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures in the
32 printed version of the journal, Molecular Ecology offers authors the opportunity to
33 reproduce the figures in colour for free in the online version of the article (but they will still
34 appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this
35 free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office to ensure that
36 the appropriate documentation is completed for the Publisher.

37 *NIH-funded authors and Molecular Ecology*

38 From April 2008, the NIH is mandating grant-holders to deposit their published papers in
39 PubMed Central within 12 months of publication. Molecular Ecology complies with the
40 NIH mandate in allowing authors to post the accepted version of their article i.e. the version
41 incorporating any amendments made during peer review, 12 months after publication
42 (please see the 'After acceptance' bullet points on page 1 of the exclusive license form for
43 full details). In doing so authors will be meeting the terms of their grant
44 (<http://publicaccess.nih.gov/FAQ.htm#general>).

45 As an alternative, NIH-funded authors may use the Online Open service

46 (<http://www.blackwellpublishing.com/static/onlineopen.asp>). This service grants free and

1 immediate availability of the article on publication, and deposition of the final pdf version
2 with PubMed Central.

3 *Author Services*

4 Author services enables authors to track their article - once it has been accepted - through
5 the production process to publication online and in print. Authors can check the status of
6 their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production so
7 they don't need to contact the production editor to check on progress. Visit
8 www.blackwellpublishing.com/bauthor for more details on online production tracking and
9 for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and
10 more.

11 *Proofs*

12 Authors will be sent an e-mail alerting them that PDF proofs are available to download
13 from our secure designated author website. Therefore, the corresponding author should
14 supply their email address when they submit their manuscript. Corrections must be returned
15 to the Production Editor within 3 days of receipt; fax should be used to facilitate
16 communication and minor corrections can be advised by e-mail ensuring that journal title,
17 paper reference number and corresponding authors name are given in the body of the
18 message. Authors should note that proof corrections should be marked as clearly as
19 possible, and should be kept to a minimum. If the Editors consider that significant changes
20 have been introduced at the proof stage, the right is reserved either to levy the costs to
21 authors, or to request resubmission of the manuscript. The corresponding author will be
22 sent a form with their proofs to enable copies of offprints to be ordered.

23 *Offprints*

24 A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the
25 corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and
26 conditions. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via
27 the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints
28 are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is
29 specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to
30 eight weeks to arrive after publication of the journal. For order enquiries please email:
31 offprint@cosprinters.com.

32 *Registration of sequences*

33 DNA sequences published in Molecular Ecology should be deposited in the
34 EMBL/GenBank/DDBJ Nucleotide Sequence Databases. An accession number for each
35 sequence must be included in the manuscript before publication.

36 *Policy on the use of RAPD/ISSR markers*

37 The appropriateness of RAPD or ISSR markers for population genetic inference is
38 increasingly questioned by our reviewers and editors because of concerns about
39 reproducibility, dominance, and homology. Given these worries, and the ready availability
40 of other kinds of markers that do not suffer from all of these problems, studies based
41 primarily on RAPD/ISSR rarely pass the scrutiny of peer review in Molecular Ecology. Of
42 course, there may be situations in which these markers are appropriate, such as in genetic
43 mapping studies or in searches for diagnostic markers for a given species or trait. These
44 latter kinds of studies will continue to be reviewed by the journal.

1 *Compliance with International Conventions and Regulations*

2 We strongly recommend that papers submitted to Molecular Ecology comply with the
3 Convention on Biological Diversity and the Convention on International Trade in
4 Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CBD and CITES). Within the CBD we ask
5 that authors follow the Access to Benefit Sharing (ABS) guidelines and give credit and
6 equal access to benefits to countries, academic institutions and scientists that participated in
7 the collection and analysis of data. Under the CITES convention, we request that authors
8 observe the need for permits for the import and export of specimens that fall under CITES
9 guidelines.

10 Link: <http://www.wiley.com/bw/submit.asp?ref=0962-1083&site=1>

11

12

13

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)