

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Estudo populacional e molecular de
***Nannotrigona testaceicornis* Cockerell (Hymenoptera,**
Apidae, Meliponini) através do DNA mitocondrial

AMANDA FREIRE DE ASSIS

RIBEIRÃO PRETO - SP

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

AMANDA FREIRE DE ASSIS

**Estudo populacional e molecular de
Nannotrigona testaceicornis Cockerell (Hymenoptera,
Apidae, Meliponini) através do DNA mitocondrial**

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Genética

ORIENTADOR: PROF. DR. ADEMILSON ESPENCER E. SOARES

RIBEIRÃO PRETO – SP

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Assis, Amanda Freire.

Estudo populacional e molecular de *Nannotrigona testaceicornis* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) através do DNA mitocondrial. Amanda Freire de Assis; orientador: Ademilson Espencer Egea Soares.

--Ribeirão Preto, 2010

x+66p

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Área de Concentração: Genética

Orientador: Soares, Ademilson Espencer Egea

1. *Nannotrigona testaceicornis*.
2. Meliponíneos.
3. Genética de populações.
4. DNA mitocondrial.
5. PCR+RFLP.
6. CO I.
7. Sequenciamento

*Este trabalho é dedicado aos meus pais,
Antonio e Zeni e aos meus irmãos, Adriano e
Alessandra; minha querida família que sempre
esteve do meu lado para o que der e vier...*



SERÁ QUE VALE A PENA?

Essa foi a frase da semana. Dos últimos dias e dos dias que virão.
Entre nossos encontros, soa agora a despedida.
Primeiro encontro, um desconhecido.
Conquista. Novos amigos. Novos horizontes.
Novo despertar no amanhecer de nossas vidas.
Daqui para frente. Um gosto de despedida. Gosto na boca, à saliva da vida.

Chegamos cá, vislumbrados com o que estava por vir.
Será que vale a pena?
Inicialmente, sem dúvidas. Vale tudo. Serei eu. Farei. Conquistarei. Serei melhor. Darei o melhor de mim. É o que eu quero. É o que eu posso fazer por mim.

Será que vale a pena?
O que antes não existia. Agora há dúvidas.
Dúvida do que está por vir. Dúvida da nova conquista.
Não era o que estimava ser o incontestável? O desejável?
Agora há dúvidas?

Será que vale a pena?
Noites longas, mal dormidas. Sonhos. Pesadelos. Sopas de letras. Letras cá, letras lá. Dores de cabeça... de barriga... nas pernas... nos ombros... no peito... no corpo.
Será que vale a pena?

Nós compramos em espécie ou não. Neste caso... é o preço do que se quis.
Pagamos pelo o que se quer deste ponto em diante.
O passo maior será dado agora.
Fui o que pude ser. Fiz. Conquistei. Tentei ser o melhor. Dei o melhor de mim.
Valeu tudo. É o que pude fazer por mim.
Será que vale a pena?

Tenho o gosto da saliva da vida. Gosto de despedida. Gosto de saudade.
Saudades das noites longas... das risadas... dos choros... das dores... dos meus amigos que deixarei no cercado do meu coração.
Latifúndio de saudade.
Será que vale a pena?
Ainda há dúvidas?

O gosto de despedida impregnado nos lábios, na língua, na boca.
A saudade nascente aperta meu peito, rasga minhas entranhas.
Sentirei saudades dos meus amigos.
Valeu a pena.

Maria Ignêz Castrillon

- ❖ Ao Professor Dr. **Ademilson Espencer Egea Soares** pela oportunidade e confiança, pela amizade, pela orientação e pelos bons momentos de descontração.
- ❖ Aos docentes do Dep. de Genética e do Programa de Pós-Graduação em Entomologia pelos conhecimentos repassados e contribuição na minha formação.
- ❖ À Professora **Dra. Maria Cristina Arias** (Instituto de Biociências, Dep. de Biologia-USP) pela enorme colaboração na realização deste trabalho, pelos conselhos e ensinamentos e pelo cuidado durante minha estadia em seu laboratório.
- ❖ Ao Professor **Dr. Eddy José Francisco de Oliveira** por toda colaboração, ensinamentos, amizade, incentivo e por me “adotar”.
- ❖ À **Dra. Geusa Simone de Freitas** pela colaboração, ensinamentos, conselhos, amizade e correção da dissertação.
- ❖ Ao doutorando **Mateus Henrique Santos** pela grande ajuda com os programas estatísticos.
- ❖ Ao técnico **Jairo de Souza**, pelo auxílio imprescindível nas coletas, pelas piadas e conversa boa e pela amizade.
- ❖ À **Susie, Maria, Sílvia e Gustavo**, secretários do Dep. de Genética, pela dedicação e trabalho imprescindíveis.
- ❖ Aos **alunos do Dep. de Genética** pela agradável convivência.
- ❖ À todos do **Laboratório de Genética e Evolução de Abelhas (LGEA) do Departamento de Biologia-USP** pelo acolhimento e ajuda nos experimentos e também pela enorme contribuição nos trabalhos de Genética de Populações de meliponíneos.
- ❖ À **todos do Bloco B do Dep. de Genética**, principalmente à **Profa. Eucléia, Bete, Maria, Claudinha, Edna e Rosana**, muito obrigada pelo acolhimento e ajuda.
- ❖ À **todos os abelhudos**, presentes e passados: **Vera, Pedro, Profa. Zilá, Profa. Márcia, Prof. Klaus, Prof. Lionel, Prof. David, Profa. Ana Maria Bonetti, André, Francis, Sávio, Sérgio, Mônica, Juliana, Aline Aleixo, Flávia, Tita, Lili, Vanessa, Lívia, Taty, Rodrigo, Moisés, Michelle Prioli, Michelle Manfrini, Fabrício, Tiago, Daiana, Carlitos, Umberto, Érica, Karina, Marina, Van, Anete, Rogério, Gesline (Nêga), Mipsi**. Foi muito bom ser uma abelhuda também!!!!
- ❖ À **Camila Maia e Michael** pela amizade e ótimos momentos de descontração.

- ❖ Aos também abelhudos e grandes amigos: **Ivan Akatsu, Paulo Emílio, Omar, Weyder, Mauro, Ivan Castro e Rogélio**. Vocês moram no meu coração!!!!
- ❖ À minha grande amiga e companheira de caminhadas **Marcela Ap. F. B. Laure**. Muito obrigada pela amizade, companheirismo, confiança, conversas e conselhos. Você é uma pessoa muito especial!
- ❖ Às melhores amigas do mundo: **Aline Simoneti, Aline Mackert, Ana Rita e Camila**. “Borsas” eu amo muito vocês! Não há palavras que descrevam o quanto vocês são importantes para mim. Muito obrigada por tudo!!!
- ❖ À minha querida “família Raile / Riccardi”: **Helle, Buião, Paula, Vovó Helle, Manoel, Lisa, Murilo e Thiago**, muito obrigada por me acolheram com tanto carinho, pela amizade sincera e por me fazer sentir parte dessa grande família também.
- ❖ Ao meu ♥ **Rafa** ♥ por estar do meu lado me apoiando e me ajudando na finalização deste trabalho, e principalmente pelo amor e alegria em minha vida.
- ❖ À minha família querida: **Mamãe Zeni, Papai Toninho, Lê, Dri e Kiko**, pela paciência e apoio irrestritos.
- ❖ À Deus pela minha vida “com muita emoção”!
- ❖ Aos membros da banca examinadora pela contribuição ao trabalho.
- ❖ À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto Biota.
- ❖ Ao CNPq pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS ABELHAS	2
1.2 TRIBO MELIPONINI	5
1.3 A ESPÉCIE <i>Nannotrigona testaceicornis</i>	8
1.4 A GENÉTICA DE POPULAÇÕES	10
1.4.1 ESTUDOS POPULACIONAIS ATRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES ..	12
1.5 O DNA MITOCONDRIAL ANIMAL	15
1.5.1 O DNA MITOCONDRIAL ANIMAL EM ESTUDOS COM ABELHAS	16
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 AMOSTRAGEM DO MATERIAL BIOLÓGICO	32
4.2 PCR+RFLP DO DNA MITOCONDRIAL	33
4.3 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE CO I	41
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

ASSIS, A. F. **Estudo populacional e molecular de *Nannotrigona testaceicornis* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) através do DNA mitocondrial.** 2010. x+66p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Nannotrigona testaceicornis é uma espécie de abelha sem ferrão sendo que seus ninhos são largamente encontrados na zona urbana. Os meliponíneos estão entre os principais polinizadores da flora brasileira, no entanto, muitas espécies estão seriamente ameaçadas de extinção em consequência da perda do habitat e isolamento causados principalmente pelo desmatamento, uso indiscriminado de defensivos agrícolas e grandes queimadas, pois tais alterações resultam em ecossistemas fragmentados, formando mosaicos de vegetação remanescente, mergulhados numa paisagem antropizada. Nesse processo, grandes populações são reduzidas e subdivididas, o que pode acarretar alterações ecológicas e genéticas. Estudos populacionais de espécies de meliponíneos ainda são muito escassos, fazendo-se necessário a ampliação desses estudos para uma melhor compreensão da dinâmica populacional dessas abelhas. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo a realização de um estudo populacional em ninhos amostrados nos estados de São Paulo e Minas Gerais, utilizando-se o mtDNA como ferramenta molecular. As análises através de PCR+RFLP de 05 regiões do mtDNA não revelaram polimorfismos nas populações estudadas, sendo detectado apenas um haplótipo. O estudo através do sequenciamento de um fragmento do gene COI I de sessenta operárias provenientes do *campus* da USPRP, Ribeirão Preto, Bonfim Paulista, Franca, Campinas, São Paulo, Uberlândia, Várzea da Palma, Viçosa e Caratinga, revelou a presença de cinco haplótipos nas populações amostradas dos quais três eram exclusivos de uma única população e um era compartilhado por 70% das populações. A média da diversidade haplotípica ($Hd= 0,264$), e a diversidade nucleotídica ($\pi=0,00386$) foram avaliadas revelando uma baixa divergência entre os haplótipos encontrados. As análises estatísticas revelaram que as populações estudadas estão estruturadas em três grupos, sendo esta estruturação um reflexo de eventos antigos em consequência de mudanças climáticas devido às glaciações do Pleistoceno levando a um gargalo populacional e posterior dispersão, juntamente com a barreira geográfica do mosaico de montanhas do complexo da “Serra do Espinhaço” que isolou duas das populações estudadas (Viçosa e Caratinga) levando à diferenciação das mesmas.

Palavras chave: 1. *Nannotrigona testaceicornis*; 2. Meliponíneos; 3. Genética de populações; 4. DNA mitocondrial; 5. PCR+RFLP; 6. CO I; 7. Sequenciamento.

ASSIS, A. F. **Population and molecular study of *N. testaceicornis* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by using of mitochondrial DNA.** (2010). VIII+66p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Nannotrigona testaceicornis is a stingless bee species whose nests are widely found in urban regions. The meliponines are among the most important Brazilian flora pollinators, however, many species are in seriously extinction danger due to habitat loss and isolation caused by deforestation, indiscriminate use of agricultural defensives, and great extent burnings. These changes result in fragmented ecosystems, in small extent of land showing residual vegetation, and in a human impacted landscape. In this process, large populations are reduced and subdivided, leading to ecological and genetic changes. Population studies of meliponine species are still scarce, showing the necessity of more investigation to a better understanding of the population dynamics of these bees. In this context, this work aimed to perform a population study in nests sampled in São Paulo and Minas Gerais states, using the mtDNA as a molecular tool. The PCR+RFLP analyses of five mtDNA regions did not show polymorphisms among the studied populations, and just one haplotype was detected. The study through CO I gene fragment sequencing in sixty workers collected in ten different places from the two Brazilian states mentioned above revealed the presence of five haplotypes. Three of them were exclusive to just one population and one was shared by 70% of the studied populations. The average haplotype diversity ($Hd= 0.264$) and the average nucleotide diversity ($\pi=0.00386$) were estimated and showed low deviation among the haplotypes. The statistical analyses revealed that the studied populations are structured in three groups. This split may be explained as a consequence of ancient events caused by climatic changes due to Pleistocene glaciations resulting in a population bottleneck and later dispersion; in addition to these, a geographical barrier formed by the “Serra do Espinhaço” mountain complex, had isolated two of the studied populations (Viçosa and Caratinga), conducting them to differentiation.

Key words: 1. *Nannotrigona testaceicornis*; 2. Meliponines; 3. Population Genetics; 4. Mitochondrial DNA; 5. PCR+RFLP; 6. CO I; 7. Sequencing.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS ABELHAS

As abelhas são insetos que pertencem à ordem Hymenoptera cujo nome é derivado do grego (*hymem* = membrana; *ptera* = asas), com as espécies deste grupo apresentando dois pares de asas membranosas, sendo as asas anteriores maiores que as posteriores; outra característica dos insetos desta ordem é que as fêmeas possuem um ovipositor típico que permite a perfuração do hospedeiro ou acessar locais inacessíveis, estando aquele muitas vezes modificado em um ferrão; o desenvolvimento é do tipo holometábolo, apresentando os estágios de ovo, larva, pupa e inseto adulto. O principal e maior grupo da ordem Hymenoptera é o Aculeata, himenópteros cujas fêmeas possuem ferrão – uma modificação do ovipositor dos grupos ancestrais. Os Aculeata incluem além das abelhas, as vespas e as formigas (MICHENER, 2007).

As abelhas constituem um grupo monofilético (MELO, 1999; MICHENER, 2007) que se diferenciou à partir de vespas cujas fêmeas, em vez de capturarem outros artrópodes como alimento, passaram a coletar pólen e néctar diretamente nas flores para alimentarem suas larvas. Embora as abelhas pareçam muito distintas de outros grupos de himenópteros aculeados, elas guardam estreita relação com um grande conjunto de vespas tradicionalmente chamadas de vespas esfecóides ou esfecóideas (SILVEIRA *et al.*, 2002). As abelhas e as vespas esfecóides juntas constituem a superfamília Apoidea, que é dividida em dois grupos: os das vespas esfecóides, ou Spheciformes e o grupo das abelhas, ou Apiformes (BROTHERS, 1975 *apud* MICHENER, 2007). Visto que as vespas Spheciformes são claramente um grupo parafilético em relação aos Apiformes, MELO (1999) propõe uma classificação da superfamília Apoidea onde reconhece quatro famílias para as vespas Spheciformes – Ampulicidae, Heterogynaidae, Sphecidae e Crabronidae – e uma única família para as abelhas – Apidae, sendo que dentre as vespas esfecóides o grupo mais próximo das abelhas (seu grupo irmão) é o Crabronidae. De fato, as abelhas guardam muitas semelhanças morfológicas e comportamentais com estas vespas, o que sugere um período relativamente longo de evolução comum antes de sua divergência. Vários cenários evolutivos têm sido apresentados para descrever as possíveis etapas na diferenciação das abelhas a partir das

vespas esfecóides. MICHENER (1944, *apud* SILVEIRA *et al.*, 2002) sugere que as abelhas não teriam surgido a partir de nenhum dos grupos atuais de vespas esfecóides. MALYSHEV (1968, *apud* SILVEIRA *et al.*, 2002) propôs que as abelhas teriam se originado a partir de um ancestral comum com vespas da subfamília *Pemphredoninae* (Crabronidae), porém análises filogenéticas conduzidas por MELO (1999) não corroboraram esta hipótese, favorecendo a posição de Michener.

A classificação das abelhas e as relações filogenéticas entre elas sempre foram questões muito controversas, sofrendo alterações conforme o autor e os métodos adotados. Neste trabalho adotaremos a classificação proposta por MICHENER (2000; 2007), a qual divide as abelhas em um número de táxons à nível de família. Nesta classificação as abelhas corbiculadas da família Apidae estão reunidas na subfamília Apinae e divididas em quatro tribos: Apini, Bombini, Euglossini e Meliponini; dentre essas Apini, Bombini e Meliponini apresentam indivíduos com grau de comportamento social mais avançado – a eussocialidade, enquanto os Euglossini apresentam indivíduos subsociais.

A origem da relação estreita entre abelhas e angiospermas tem também despertado bastante interesse. A idéia mais aceita é que as abelhas teriam surgido após a origem das angiospermas, há cerca de 125 milhões de anos. Se essa hipótese é correta, a primeira grande diversificação das abelhas teria ocorrido concomitantemente à grande radiação das plantas floríferas, que se deu aproximadamente entre 130 e 90 milhões de anos atrás. Uma evidência disto é o mais antigo fóssil de abelha, datado de aproximadamente 100 milhões de anos atrás (Early Cretaceous) o qual apresentava várias características derivadas das abelhas tais como estruturas morfológicas associadas à coleta de pólen. Tal fóssil foi encontrado na Birmânia preservado em âmbar e foi descrito como uma nova espécie - *Melittosphex burmensis* – e nova família – Melittosphecidae (POINAR & DANFORTH, 2006), além disso, uma das mais antigas abelhas fósseis conhecidas – *Cretotrigona prisca* (MICHENER & GRIMALDI, 1988) – cuja idade é estimada em cerca de 65 milhões de anos, é um meliponíneo típico e, como os meliponíneos são um dos grupos de abelhas mais derivados, presume-se que grande parte da diversidade morfológica e comportamental exibida pelas abelhas, hoje, já havia surgido ao final do Cretáceo (SILVEIRA, *et al.*, 2002).

As abelhas se destacam por sua grande diversidade de comportamentos sociais e por suas múltiplas relações com plantas e animais. A imensa maioria das espécies de abelhas tem no néctar e no pólen das flores sua principal fonte de energia e proteínas, respectivamente, e seu hábito forrageiro tem importância fundamental na polinização da vegetação natural e das plantas cultivadas (NOGUEIRA-NETO, 1997). Podemos citar também os produtos das abelhas melíferas como a cera, mel, própolis e geléia real, mas sem dúvida a maior importância das abelhas em termos de benefícios para os humanos está em seu papel como agentes polinizadores. A maioria das espécies de árvores das florestas tropicais é polinizada por abelhas. Em climas temperados, a maioria das árvores florestais (pinheiros, carvalhos, entre outros) é polinizada pelo vento, mas muitos tipos de arbustos, árvores de pequeno porte, plantas herbáceas e flores selvagens são polinizadas por abelhas. Áreas desérticas e com vegetação xerófita são extremamente ricas em plantas polinizadas por abelhas cuja preservação e reprodução são essenciais em prevenir erosões e outros problemas, e em prover alimentos e abrigo para a vida selvagem. Portanto a conservação de muitos habitat depende da preservação das populações de abelhas, pois se as abelhas desaparecerem a reprodução da grande maioria dos elementos da flora estaria severamente limitada (MICHENER, 2007).

Atualmente são descritas mais de 20000 espécies de abelhas e a maioria destas são solitárias (NOGUEIRA-NETO, 1997; GRIMALDI & ENGEL, 2005).

1.2 TRIBO MELIPONINI

A tribo Meliponini compreende as abelhas conhecidas como “abelhas indígenas sem ferrão”, essas abelhas são encontradas em áreas tropicais e subtropicais do mundo, mas sua maior diversidade é observada nas regiões neotropicais (com mais de 300 espécies descritas) e na região Indo-Malaia (com cerca de 60 espécies), sendo que certos táxons são restritos às regiões subtropicais do hemisfério sul (CAMARGO & PEDRO, 1992). No Brasil, onde foram descritas aproximadamente 192 espécies pertencentes a 27 gêneros, essa tribo é bastante representativa (SILVEIRA *et al.*, 2002). De acordo com a revisão de CAMARGO & PEDRO para a publicação do livro “*Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region*” (2007), são reconhecidos 33 gêneros de meliponíneos, exclusivamente neotropicais, sendo um deles o extinto gênero *Proplebeia*.

As espécies variam muito de tamanho e todas apresentam comportamento eussocial, embora algumas espécies como no gênero *Lestrimelitta* sejam cleptobióticas (SILVEIRA *et al.*, 2002). Elas são encontradas em colônias que variam de poucas dúzias a 100.000 ou mais operárias. Assim como as *Apis mellifera* (tribo Apini) e ao contrário das outras abelhas, elas vivem em colônias “permanentes” e apresentam castas fêmeas comportamentais e morfologicamente diferentes, denominadas operárias e rainhas (MICHENER, 2000; MICHENER, 2007).

Os meliponíneos são distinguíveis das outras abelhas pela redução e fragilidade da venação das asas, atrofia do ferrão e presença de penicílio na tíbia (conjunto de cerdas grossas, e longas, localizadas na tíbia posterior) (MOURE, 1961; SAKAGAMI, 1982; WILLE, 1983; CAMARGO, 1989; MICHENER, 1990; CAMARGO & PEDRO, 1992; MICHENER, 2000; MICHENER 2007).

A maioria das espécies de meliponíneos faz seus ninhos preferencialmente em ocos de árvores, porém utilizam também cavidades no solo, em cupinzeiros ou formigueiros abandonados e paredes de alvenaria. Algumas espécies constroem ninhos expostos ou semi-expostos em galhos de árvores ou fendas de rochas. Outras espécies vivem em partes de ninhos ocupados por cupins ou formiga, tais como: *Partamona spp* que nidifica em

termiteiros de *Constrictotermes* (LOREZON *et al.*, 1999); *Trigona (Trigona) cilipes* nidifica em ninhos de formigas do gênero *Azteca* e em cupinzeiros, no estado do Amazonas, Brasil (KERR *et al.*, 1967); *Scaura latitarsis* nidifica em termiteiros do gênero *Nasutitermes*. Os ninhos geralmente são bem isolados do meio por grossas paredes de batume (mistura de cera, resina e às vezes pedaços de folhas) (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Cada espécie tem uma estrutura arquitetônica peculiar na entrada do ninho, que geralmente a identifica. A entrada do ninho é formada por um tubo de cera ou cerume, cujo comprimento varia com a espécie, e em algumas é ausente. Este grupo necessita de alimento durante todo o ano, ao contrário das espécies solitárias que entram em diapausa durante períodos de escassez de alimento (FREITAS, 2001).

Algumas espécies são conhecidas pelo excelente mel que produzem, por exemplo, a Jataí (*Tetragonisca angustula*), sendo geralmente criadas para esta finalidade (CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 2006). Porém, o papel ecológico fundamental dessas abelhas é na manutenção da biodiversidade de espécies vegetais (durante suas visitas às flores, ocorre a transferência do pólen de uma flor para outra, promovendo a polinização cruzada). A polinização para o visitante floral é uma consequência da coleta de um recurso alimentar (pólen e/ou néctar), mas para a planta é uma maneira de aumentar ao máximo o fluxo de genes. Segundo KERR *et al.* (1996) os meliponíneos seriam responsáveis pela polinização de 40 a 90% das árvores nativas, dependendo do ecossistema.

MALAGODI-BRAGA & KLEINERT (2004) consideraram que os meliponíneos possuem diversas características importantes para sua utilização na polinização de plantas cultivadas, entre as quais se destacam:

- O hábito alimentar generalista: visitam as flores das mais variadas famílias de plantas;
- A domesticação: as colônias podem ser mantidas em colméias e estas podem ser manejadas;
- A ausência de ferrão funcional que facilita a instalação e manejo das colônias;

- Colônias são perenes;
- Incapacidade de abandono de ninhos (a rainha fecundada perde a capacidade de voar após adquirir a fisogastria);
- Podem armazenar grande quantidade relativa de alimento no ninho.

Os meliponíneos são muito frágeis quando expostos à destruição de seus habitat, pelo fato de nidificarem em ocos de árvores que vêm sendo intensamente derrubadas. Estes insetos também são muito suscetíveis à redução do tamanho populacional, no sentido de que processos endogâmicos podem levar a conseqüências danosas, como o aumento na produção de machos diplóides por meio de cruzamentos endogâmicos (KERR *et al.*, 1996).

1.3 A ESPÉCIE *Nannotrigona testaceicornis*

Nannotrigona testaceicornis é conhecida popularmente como **Iraí**. Trata-se de uma abelha que mede cerca de 4 mm de comprimento, é preta, possui pilosidade grisalha e asas esfumadas no terço apical (MONTEIRO, 2001) (FIGURA 1). Embora pareçam bastantes diferentes umas das outras, *Nannotrigona* e *Scaptotrigona* compartilham várias características presumindo-se uma estreita relação de parentesco entre elas (MICHENER, 2007).



Figura 1: *Nannotrigona testaceicornis*: a) tubo de entrada do ninho com as abelhas “guarda” (Fonte: Camila C. M. Souza); b) abelha coletando pólen (Fonte: Eddy. J. F. Olivieria); c) vista do interior do ninho (Fonte: Laboratório de Abelhas – USP)

São abelhas totalmente mansas, sociais, cujos ninhos são encontrados em ocos (de árvores, moirões de cerca, paredes de alvenaria, etc.), os quais raramente são ocupados inteiramente, o que também ocorre em colméias artificiais: Parte da cavidade é isolada da região ocupada pela colônia por meio de um batume crivado de cerume. A entrada do ninho é geralmente curta e construída com cerume, sendo fechada à noite (FIGURA 1). Os favos de cria são helicoidais, mas podem ocorrer favos horizontais e há células reais, sendo também relatado por IMPERATRIZ-FONSECA *et al.* (1994) rainhas miniaturas. O ninho apresenta um exoinvólucro resinoso e duro, às vezes crivado, para permitir aeração. O exoinvólucro limita o ninho na cavidade. As células de cria construídas em baterias, isto é, muitas células são

simultaneamente construídas pelas operárias, a rainha põe o ovo nelas em seqüência e as células são fechadas também em seqüência. Os potes de alimento são pequenos e ovóides, com cerca de 1 a 2cm de diâmetro. Produz um invólucro composto por várias camadas de cerume fino e claro ao redor do favo. Esta espécie produz depósitos de própolis viscoso, puro (NOGUEIRA-NETO, 1970).

As colônias apresentam de 2.000 a 3.000 abelhas (LINDAUER & KERR, 1960). Essa espécie pode ser diferenciada de outros Meliponini por construir, na periferia dos ninhos velhos, muitas lamelas ou membranas de cerume espesso, escuro, endurecido e quebradiço, contendo provavelmente muita resina. Essas membranas formam túneis e passagens nas quais podem ser encontradas inúmeras abelhas (NOGUEIRA NETO, 1970).

No Brasil esta espécie é encontrada nos estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (MOURE; URBAN; MELO, 2007).

Vários estudos abrangendo a espécie *N. testaceicornis* têm sido publicados. Exemplos são as análises de padrões de comportamento de postura, oviposição e aprovisionamento; análise do número de cromossomos; produção glandular, estruturas sensoriais das antenas; e muitos estudos em nível ecológico, principalmente no que diz respeito à sua atuação como agente polinizador; já foi comprovada a efetividade de polinização desta abelha em muitas espécies vegetais de interesse econômico, tais como acerola (MARTINS *et al.*, 1999), morango (MAETA *et al.*, 1992; ROSELINO *et al.*, 2004) e pepino (RIBEIRO, 2004).

1.4 A GENÉTICA DE POPULAÇÕES

“A genética de populações é o estudo de como as leis de Mendel e outros princípios de genética se aplicam as populações e das várias forças que resultam nas mudanças evolutivas através do tempo.”

HARTL & CLARK (2007)

As populações naturais apresentam grande diversidade fenotípica e a genética de populações trabalha com essa diversidade que pode ser causada pelas diferenças genotípicas entre os indivíduos. Vale ressaltar que, segundo HARTL & CLARK (2007), em genética de populações, a palavra população refere-se a uma **deme**, ou seja, um grupo de organismos da mesma espécie vivendo dentro de uma área geográfica suficientemente restrita de modo que qualquer membro possa potencialmente acasalar-se com outro membro do sexo oposto.

A quantidade de variação genética e a explicação da origem, manutenção e importância evolutiva desta variação compõem o campo de atuação da genética de populações. Uma população sofre os efeitos de vários fatores genético-evolutivos tais como seleção, mutação e deriva genética. As populações são frequentemente subdivididas em pequenas unidades por fatores geográficos, ecológicos ou comportamentais. Estas subdivisões da população podem exercer consideráveis influências sobre o fluxo gênico entre estas subpopulações ou agrupamento. O alto fluxo gênico entre estas subpopulações homogeneiza as variações genéticas encontradas nestes grupos, enquanto o baixo fluxo gênico leva a um processo de diferenciação genética entre os grupos pelos efeitos da seleção, mutação e deriva genética (HARTL, 1981; HARTL & CLARK, 2007).

Uma população pode apresentar diferenças na variação genética entre os agrupamentos que a compõem por várias razões evolutivas diferentes (*i.e.*, acasalamento não randômico, deriva genética, entre outras). WRIGHT (1965) desenvolveu uma maneira de estimar a

quantidade de diferenciação nas subdivisões de uma população. Estas estimativas são feitas a partir de três diferentes **coeficientes F** usados para determinar a variabilidade genética na população total (T), nas subpopulações (S) e nos indivíduos (I). Os três valores, F_{st} , F_{it} e F_{is} , estão relacionados de forma que:

$$1 - F_{it} = (1 - F_{st})(1 - F_{is}) \quad (\text{I})$$

$$F_{st} = \frac{F_{it} - F_{is}}{1 - F_{is}} \quad (\text{II})$$

F_{st} : valor de diferenciação genética entre as subpopulações e é sempre positivo.

F_{it} e F_{is} : valores de desvio da proporção de Hardy-Weinberg dentro das subpopulações e da população total, respectivamente, onde valores positivos indicam deficiência de heterozigotos e valores negativos indicam excesso de heterozigotos.

NEI (1977) demonstrou que estes valores podem ser expressos em termos das frequências alélicas e das frequências genotípicas observadas e esperadas. Além disso, estendeu as análises para múltiplos locos, onde os diferentes coeficientes-F médios podem ser calculados por:

$$\overline{F_{is}} = \frac{\overline{H_s} - \overline{H_0}}{\overline{H_s}} \quad (\text{III})$$

$$\overline{F_{it}} = \frac{\overline{H_t} - \overline{H_0}}{\overline{H_t}} \quad (\text{IV})$$

$$\overline{F_{st}} = \frac{\overline{H_t} - \overline{H_s}}{\overline{H_t}} \quad (\text{V})$$

H_0 : Heterozigosidade média observada dentro de uma subpopulação;

H_s : Heterozigosidade média esperada dentro das subpopulações;

H_t : Heterozigosidade média esperada na população total.

14.1 ESTUDOS POPULACIONAIS ATRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES

No final da década de 60 o advento das técnicas moleculares possibilitou o desenvolvimento de hipóteses testadas experimentalmente a partir de dados empíricos sobre os fatores e padrões da variação genética, permitindo abordagens mais precisas e grandes progressos nos estudos populacionais e evolutivos em níveis inter e intra-específicos.

Até o ano de 1966 os estudos de polimorfismos nas populações eram realizados com base nos fenótipos dos organismos, o que não permitia uma boa detecção da variabilidade genética populacional, pois tais caracteres apresentavam baixo polimorfismo e diferentes tipos de heranças, e por isso, foram substituídos pelas isoenzimas uma classe de marcadores moleculares desenvolvida por HARRIS (1966) e HUBBY & LEWONTIN (1966) cuja técnica consiste na eletroforese de proteínas. No entanto, para alguns organismos e enfoques esta técnica não é mais apropriada, pois detecta pouca variabilidade e por isso marcadores moleculares de DNA foram tomando espaço nas publicações sobre genética populacional, isto porque o DNA pode ser extraído de qualquer organismo e como se analisa o genótipo (DNA) e não o fenótipo (proteína) o polimorfismo detectado é maior (BRITO, 2005).

Atualmente vários marcadores moleculares são empregados em estudos populacionais, evolutivos e/ou voltados para a conservação, dentre eles destacam-se: a tradicional eletroforese de proteínas, que deu início a boa parte dos estudos genéticos em populações naturais; estudos com RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”); estudos com sequenciamento do mtDNA e de genes nucleares; “DNA fingerprinting” utilizando sondas para regiões de minissatélite; RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”); e polimorfismos em regiões de microssatélites (AVISE, 1994).

A descrição de marcadores moleculares baseados na PCR (Polymerase Chain Reaction – reação em cadeia da Polimerase) tais como RAPD, PCR+RFLP, microssatélites, sequenciamento de genes, entre outros, aumentou a eficiência na detecção de polimorfismos no nível do DNA traduzida em redução do tempo de execução dos

experimentos, do seu custo e da sua complexidade (MATIOLI & PASSOS-BUENO, 2001) se mostrando efetivos na amostragem de numerosos locos polimórficos a partir de pequenas quantidades de DNA.

Atualmente, grande ênfase é colocada em estudos do mtDNA como marcador de diversidade genética, sendo este de extrema utilidade para investigações sobre relações filogenéticas entre diferentes taxa e identificação de subdivisão geográfica entre unidades populacionais (EIZIRIK, 1996). Desde as décadas de 70-80 a molécula do DNA mitocondrial passou a fazer parte de muitos, senão da maioria dos estudos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas e o entendimento de vários aspectos biológicos e evolutivos de uma grande variedade de organismos, pois apresenta características genéticas e estruturais extremamente peculiares e únicas (WILSON *et al.*, 1985; AVISE *et al.*, 1987; MORITZ *et al.* 1987; AVISE, 1993 *apud* FRANCISCO *et al.*, 2001). Estudos envolvendo a comparação da sequência gênica mitocondrial tornou-se um poderoso meio para inferir antigas relações evolutivas, pois os rearranjos parecem ser únicos, geralmente eventos raros que são improváveis de ocorrer independentemente em linhagens evolutivas independentes (BOORE, 1999). Muitos trabalhos, também, abordam as relações filogenéticas com base na variação do mtDNA tanto em nível intra quanto inter-populacional, correlacionando-as com as distribuições geográficas dos clados. Juntos estes elementos constituem a filogeografia (AVISE *et al.*, 1987; AVISE, 2000). Segundo AVISE (2000), as populações naturais podem ser classificadas em diferentes categorias filogeográficas, facilitando a compreensão acerca da dinâmica populacional e dos padrões de dispersão e colonização nas áreas de distribuição das espécies. São cinco categorias:

- Categoria I: Haplótipos mitocondriais distintos ocupando regiões geográficas separadas (alopatria) dentro da distribuição geográfica da espécie. A principal explicação para este padrão envolve a existência de barreiras ao fluxo gênico, extrínsecas e duradouras. Outra possibilidade seria extinção de haplótipos intermediários em espécies amplamente distribuídas, com capacidade de dispersão (e fluxo gênico) limitada.

- Categoria II: Pronunciadas descontinuidades filogenéticas entre os haplótipos, com as principais linhagens co-distribuídas em uma grande área. Neste caso, podem ter ocorrido zonas secundárias de contato ou, barreiras intrínsecas (como isolamento reprodutivo) entre espécies simpátricas relacionadas.
- Categoria III: Maioria dos haplótipos estreitamente relacionados, ainda que isolados geograficamente. A explicação mais provável para tal padrão envolve fluxo gênico historicamente limitado entre populações em espécies não subdivididas por barreiras duradouras à dispersão. Portanto, mutações recentes estariam confinadas a subgrupos na distribuição da espécie.
- Categoria IV: Populações com haplótipos estreitamente relacionados sem nenhum isolamento geográfico. Tal como a categoria III, a ausência de barreiras à dispersão seria a principal explicação para este padrão, porém neste caso, o fluxo gênico entre populações teria sido intenso.
- Categoria V: Esta categoria é intermediária entre a III e IV. Envolve linhagens freqüentes amplamente distribuídas juntamente com haplótipos exclusivos, localmente distribuídos. Níveis intermediários de fluxo gênico entre populações geográficas seriam a melhor explicação para este padrão. Tal como na categoria III, possíveis genótipos ancestrais ocorreriam em uma ampla área, enquanto que tal como na categoria IV, novas mutações não teriam ainda se disseminado ao longo da distribuição geográfica da espécie.

Segundo AVISE *et al* (1987), a evolução das espécies não pode mais ser completamente entendida sem referências à estruturação filogeográfica intraespecífica, uma vez que muitas espécies já se mostraram fortemente estruturadas filogeneticamente por meio de estudos do mtDNA. As características desta molécula a torna uma fonte importante de dados cujo conhecimento por meio da pesquisa, de acordo com MORITZ *et al* (1987), representa uma poderosa fusão entre a biologia molecular e evolutiva, entre abordagens empíricas e teóricas.

Por esse motivo e por outros mencionados anteriormente escolhemos investigar a estrutura populacional de *Nannotrigona testaceicornis* analisando sequências de um fragmento do gene COI (Subunidade I da Citocromo Oxidase) do mtDNA cujas características são detalhadas a seguir.

1.5 O DNA MITOCONDRIAL ANIMAL

O DNA mitocondrial dos animais é uma molécula circular e pequena, com cerca de 14.000 a 26.000 pares de bases. Embora sejam ocasionalmente encontrados genomas mitocondriais maiores, estes se devem a produtos de duplicações de porções do mtDNA e não de variações do conteúdo gênico. Com poucas exceções o genoma mitocondrial de todos os animais contém os mesmos 37 genes: dois genes codificam para subunidades ribossômicas (12S e 16S), 22 para RNA transportadores (tRNA), três para as subunidades da enzima citocromo oxidase (COI, II e III), um para o citocromo B, dois para as subunidades da ATPase (6 e 8) e sete para as subunidades da NADH desidrogenase (FIGURA 2). Os produtos desses genes, juntamente com RNAs e proteínas importados do citoplasma, permite à mitocôndria replicar e transcrever seu DNA, processar o mRNA e traduzir as proteínas (BOORE, 1999). Existe também uma região não codificadora, conhecida como “D-loop” (vertebrados e equinodermos) ou região “rica em A+T” (invertebrados), responsável pela origem de replicação e transcrição da molécula (WOSTENHOLME, 1992). O tamanho dessa região exibe grande variação entre os organismos, sendo detectado por vezes polimorfismo de tamanho a nível intra-específico (MORITZ *et al.*, 1987).

O mtDNA é uma molécula muito peculiar por apresentar: herança materna; ausência de recombinação; conteúdo gênico conservado; regiões intergênicas pequenas ou ausentes; ausência de íntrons, de DNA repetitivo, de pseudogenes, de elementos transponíveis; e alta taxa de evolução (MORITZ *et al.*, 1987). Sendo a herança do mtDNA materna, mutações

acumuladas não são dispersas por meio de recombinação (AVISE *et al.*, 1987). Tal característica permite que diferenças acumuladas entre matrilineas sejam usadas para inferências de genealogias de genes.

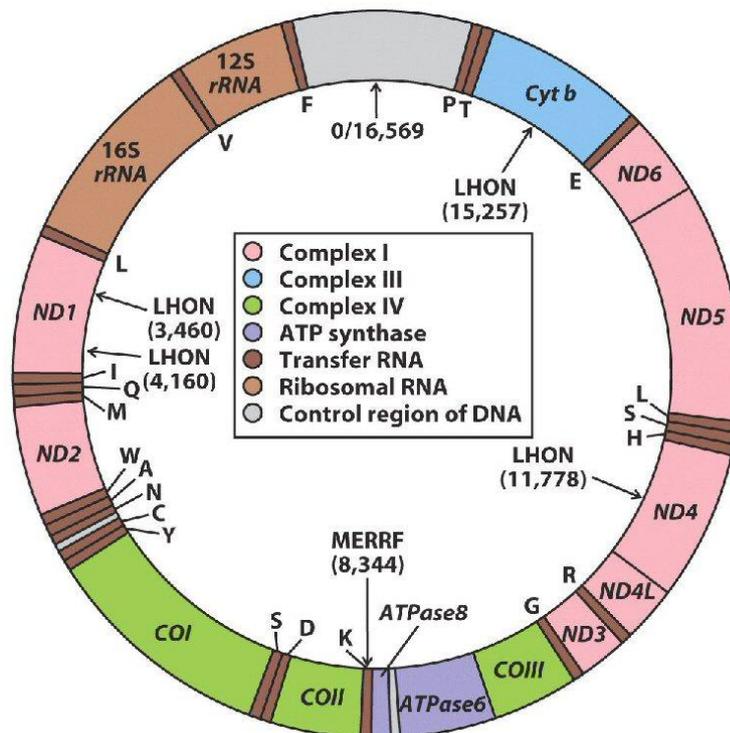


Figura 2: Mapa do Genoma Mitocondrial.

1.5.1 O DNA MITOCONDRIAL ANIMAL EM ESTUDOS COM ABELHAS

Entre os Apidae, os estudos envolvendo a análise do mtDNA são recentes. Estes se restringem quase que na totalidade às abelhas do gênero *Apis* sendo *A. mellifera* a única espécie cujo genoma mitocondrial já foi totalmente sequenciado (CROZIER & CROZIER, 1993). Os polimorfismos detectados no mtDNA deste gênero se mostraram excelentes marcas para caracterização genética de: Populações (SHEPPARD *et al.*, 1991, *apud* BRITO, 2005; ESTOUP *et al.*,

1995 *apud* BRITO 2005; SIHANUNTAVONG *et al.*, 1999 *apud* BRITO, 2005; FRANCK *et al.*, 2000; DE LA RUA *et al.*, 2001), subespécies (ARIAS *et al.*, 1990; GARNERY *et al.*, 1992 *apud* BRITO, 2005; ARIAS & SHEPPARD, 1996; MEIXNER *et al.*, 2000) e espécies (GARNERY *et al.*, 1991 *apud* BRITO, 2005 e ARIAS *et al.*, 1996).

Em Meliponini, análises de mtDNA vêm sendo ampliadas pela publicação de caracterizações deste genoma em diferentes espécies como realizado por SILVESTRE (2002), em que foram seqüenciados 14.442 dos 18.500 pb do genoma mitocondrial de *Melipona bicolor*. Neste estudo, foram analisados: A ordem gênica, características dos produtos gênicos, estruturas secundárias dos tRNAs e viés para bases adenina e timina. Tais dados são muito importantes visto que elucidaram um modelo para comparação entre as abelhas sem ferrão, pois estudos anteriores sempre usavam o mtDNA de *Apis* como modelo. Além da caracterização deste genoma, SILVESTRE (2002) desenhou 44 *primers* que facilitaram a amplificação do mtDNA de meliponíneos. Ainda dentro do gênero *Melipona* temos o trabalho de BATALHA FILHO (2008) que estudou o padrão filogenético das populações de *Melipona quadrifasciata* ao longo de sua área de distribuição com base em sequências do mtDNA.

Caracterizações por meio de PCR+RFLP também vêm sendo realizadas e mapas de restrição já foram descritos para cinco espécies de *Plebeia* (*P. droryana*, *P. emerina*, *P. remota*, *P. saiqui* e *P. sp.*) (FRANCISCO *et al.*, 2001), sete espécies de *Melipona* (*M. bicolor*, *M. compressipes*, *M. melanoventer*, *M. quadrifasciata*, *M. rufiventris*, *M. marginata* e *M. subnitida*) (WEINLICH *et al.*, 2004) e duas espécies de *Partamona* (*P. mulata* e *P. helleri*) (BRITO & ARIAS, 2005). Esses mapas têm sido usados em abordagens filogenéticas como realizados por ARIAS *et al* (2003) incluindo a espécie *Schwarziana quadripunctata*. Esses dados também têm sido úteis em abordagens populacionais como realizado com *Plebeia remota* (FRANCISCO, 2002). Tais resultados têm permitido a verificação da variabilidade genética em todos os níveis, inter e intra-específica (SILVESTRE *et al.*, 1999; FRANCISCO *et al.*, 2001; FRANCISCO, 2002; WEINLICH *et al.*, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O projeto teve por objetivo fazer um estudo populacional de *Nannotrigona testaceicornis* de ninhos encontrados no *campus* da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto, bem como de outras regiões do estado de São Paulo e Minas Gerais como grupo externo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Levantar os haplótipos mitocondriais existentes nas áreas estudadas;
- Caracterizar a diversidade nucleotídica de um fragmento do gene COI;
- Complementar informações do GenBank sobre sequências genéticas de meliponíneos;
- Inferir as possíveis correlações com a colonização da área do *Campus*;
- Inferir sobre os processos históricos que atuaram sobre esta espécie na área de distribuição estudada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram coletados cerca de 20 indivíduos de ninhos naturais de *N. testaceicornis*, amostrando-se 6 localidades no Estado de São Paulo e 4 no estado de Minas Gerais totalizando 10 localidades estudadas, sendo elas: *Campus* da USP em Ribeirão Preto-SP; Ribeirão Preto-SP; Bonfim Paulista-SP; Franca-SP; Campinas-SP; *Campus* da USP em São Paulo-SP; Caratinga-MG; Uberlândia-MG; Várzea da Palma-MG; Viçosa-MG (FIGURA 3).

Para amostragem do material biológico proveniente do *campus* da USP Ribeirão Preto, visitamos ninhos naturais de *N. testaceicornis* que já tinham sido identificados por FREITAS (2001) e pelo grupo do prof. Dr. Ademilson Espencer E. Soares até o ano de 2006. Estes ninhos estavam descritos e catalogados juntamente com ninhos de outros meliponíneos encontrados no *campus* da USP-RP. As visitas ocorreram durante os anos de 2007 e 2008, durante as quais além da coleta do material também foi feita uma reavaliação e atualização das condições dos ninhos de *N. testaceicornis* já descritos, bem como o levantamento e descrição de novos ninhos principalmente de *N. testaceicornis*. Para as amostras das outras localidades foram realizadas viagens de coleta durante o período de 2007 a 2009.

As operárias foram coletadas com auxílio de rede entomológica e armadilhas de garrafa *pet*. Os indivíduos coletados eram transferidos para tubos de vidro contendo álcool 70% os quais foram armazenados em freezer -20°C, exceto para as operárias coletadas no *Campus* da USP de São Paulo, as quais foram lavadas em solução tamponante para retirada do álcool e depois armazenadas em freezer -80°C.

Ao longo do texto usaremos abreviações para denominar as populações estudadas, assim padronizadas:

- **USPRP:** Ninhos do *Campus da* USPRP
- **RP:** Ninhos de Ribeirão Preto
- **BoP:** Ninhos de Bonfim Paulista
- **Fran:** Ninhos de Franca
- **Cam:** Ninhos de Campinas
- **SP:** Ninhos do *Campus da* USP SP
- **Udy:** Ninhos de Uberlândia
- **VP:** Ninhos de Várzea da Palma
- **Car:** Ninhos de Caratinga
- **Viç:** Ninhos de Viçosa

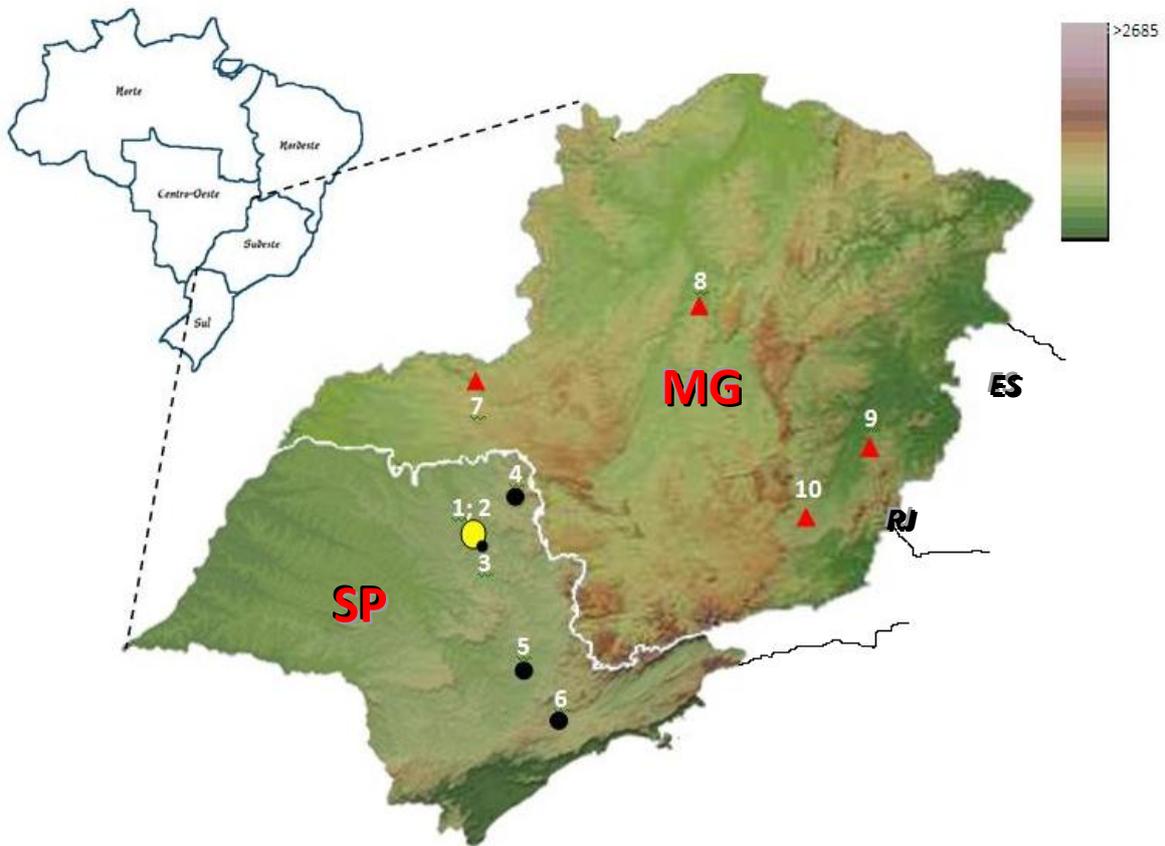


FIGURA 3: Mapa indicando os locais de coleta de *N. testaceicornis*: 1 e 2 Ribeirão Preto (Campus da USP e externos) 3 Bomfin Paulista; 4 Franca; 5 Campinas; 6 São Paulo; 7 Uberlândia; 8 Várzea da Palma; 9 Caratinga; 10 Viçosa. Fonte: <http://www.relevobr.cnpm.embrapa.br/>

3.2 ANÁLISES MOLECULARES

3.2.1 EXTRAÇÃO DO DNA

Para as análises do mtDNA, o DNA total foi extraído do tórax e abdome de uma operária de cada ninho (n=68), através do conjunto de reagentes Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. O protocolo utilizado foi o seguinte:

- 1) Em um tubo de microcentrifuga de 1,5ml colocar o tórax e a cabeça de 1 abelha e adicionar **60µl** de **EDTA** (0,5M; ph=8,0) e **250µl** de **Nuclei Lysis Solution** (Promega). Resfriar no gelo (a solução ficará turva);
- 2) Macerar a abelha;
- 3) Adicionar **10µl** de **Proteinase k** (20mg/ml) à solução e agitar;
- 4) Deixar a solução em banho maria à **65°C** durante **2 horas**;
- 5) **Opcional:** Acrescentar **1,5µl** de **RNase** à solução, misturando a amostra por inversão do tubo 2-5 vezes. Incubar a **37°C** por **30 minutos**. Após esse período deixar a amostra à temperatura ambiente por 5 minutos antes de continuar as próximas etapas;
- 6) Colocar **100µl** de **Protein Precipitation Solution** (Promega). Misturar no **vórtex** durante **20 segundos** e manter no **gelo** por 10 minutos;
- 7) **Centrifugar** a amostra durante **10 minutos** a 13.000-15.000 rpm. As proteínas irão precipitar formando um *pelet* branco na parede do tubo;
- 8) **Transferir** o sobrenadante contendo o DNA para novos tubos e adicionar **300µl** de **Isopropanol** (temperatura ambiente);
- 9) Misturar a solução invertendo o tubo gentilmente;
- 10) **Centrifugar** a amostra durante 2 minutos a 13.000-15.000 rpm. O DNA formará um *pelet* translúcido preso na parede do tubo. Descartar o sobrenadante cuidadosamente vertendo o tubo;

- 11) Colocar **300µl** de **Etanol 70%** (gelado). Inverter gentilmente o tubo algumas vezes para lavar o DNA;
- 12) **Centrifugar** a amostra durante 2 minutos a 13.000-15.000 rpm;
- 13) **Retirar** cuidadosamente o **sobrenadante**, colocar na placa aquecedora a 40°C durante **30 minutos** para **evaporar o álcool**;
- 14) **Adicionar** ao tubo com DNA **60-100µl** de **Água Mili-Q autoclavada**. **Incubar a 4°C overnight**. Após este período armazenar o DNA à -20°C.

3.2.2 PCR+RFLP DO DNA MITOCONDRIAL

As amostras de DNA genômico extraídas foram quantificadas e qualificadas em espectrofotômetro (Nanodrop ND1000). Obteve-se uma média de 30ng/µl de DNA genômico total por amostra.

As regiões do DNA mitocondrial para o teste de amplificação de haplótipos mitocondriais via PCR, foram escolhidas de acordo com a literatura revisada, utilizando-se *primers* derivados de *Apis mellifera* (Hall e Smith, 1991; Arias *et al.*, 1998), *Melipona bicolor* (Francisco *et al.*, 2001; Silvestre, 2002) e *primers* Universais para este genoma (Simon *et al.*, 1994) (TABELA 1).

TABELA 1: CONDIÇÕES DE PCR E PARES DE *PRIMERS* TESTADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DO *MTDNA* DE *NANNOTRIGONA TESTACEICORNIS*. SÃO MOSTRADOS: TEMPERATURAS DE ANELAMENTO (**TA**); PRINCIPAIS GENES CONTIDOS NO FRAGMENTO; TAMANHO APROXIMADO (EM PARES DE BASES) DO PRODUTO AMPLIFICADO

Par de <i>primers</i>	TA °C	Principais genes	Tamanho (pb)	Referências dos <i>primers</i>
MtD2 + mtD9	42	ND2 _{...} e COI	2300	SIMON <i>et al.</i> , 1994
COI-IIF + mtD18	44	COI e COII	900	HALL E SMITH, 1991 + SIMON <i>et al.</i> , 1994
MtD19 + mtD22	42	ATPases 8 e 6, COIII	1700	SIMON <i>et al.</i> , 1994
5612R + tPheF	42	COIII e ND3	1100	FRANCISCO <i>et al.</i> , 2001
MtD24 + mtD28	42	ND4, ND6 e cytB	2350	SIMON <i>et al.</i> , 1994
MtD26 + mtD30	42	CytB e ND1	1700	SIMON <i>et al.</i> , 1994
16SR + 16SF	42	16S	570	HALL E SMITH, 1991
MtD7+ MtD9	44	COI	500	SIMON <i>et al.</i> , 1994
MtD7 + COI-IIR	44	COI e COII	1650	SIMON <i>et al.</i> , 1994 + HALL E SMITH, 1991

As reações de PCR foram realizadas em volumes de 25µL finais contendo: 16,0µL de água deionizada; 2,5µL de tampão de PCR 10x; 0,5µL de MgCl₂ 50mM; 2,5µL de dNTPs 2mM cada; 1,0µL de cada *primer*; 0,5µL (1U) de *Taq* DNA polimerase (EasyPath); 1,0µL da extração de DNA. As reações de PCR foram precedidas de um passo de desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguindo-se a 35 ciclos de: desnaturação a 94°C por 1 minuto, pareamento por 1 minuto e 20 segundos e extensão final a 70°C por 2 minutos. Ao final desses ciclos um passo extra de alongação a 70°C por 20 minutos foi efetuado.

Para visualização dos produtos de PCR foi adicionado às amostras do *mtDNA* amplificadas o corante *BlueGreen Loadind Dye I* (LGCBiotecnologia), então procedeu-se com eletroforese, em gel de agarose 0,8% para separação dos fragmentos, visualização em transiluminador UV e fotografia com câmera digital acoplada ao transiluminador.

3.2.3 DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

As regiões amplificadas foram submetidas a testes de digestão simples com dez enzimas de restrição (TABELA 2) para a obtenção dos haplótipos mitocondriais.

TABELA 2: ENZIMAS DE RESTRIÇÃO UTILIZADAS NA DIGESTÃO DO MTDNA DAS ABELHAS *N. testaceicornis* E SEUS RESPECTIVOS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO (/ INDICA O LOCAL DE CORTE)

ENZIMAS	SÍTIO DE RESTRIÇÃO
<i>Ase</i> I	AT / TAAT
<i>Dra</i> I	TTT / AAA
<i>Cl</i> I	AT / CGAT
<i>EcoR</i> I	G / AATTC
<i>EcoR</i> V	GAT / ATC
<i>Hinf</i> I	G / ANTC
<i>Mbo</i> I	/ GATC
<i>Rsa</i> I	GT / AC
<i>Pst</i> I	CTGCA / G
<i>Ssp</i> I	AAT / ATT

As digestões foram montadas com 5U de enzima e 2µl do respectivo tampão, 5µl do produto da PCR adicionando-se água ultrapura autoclavada para um volume final de 20µl. Os tubos foram incubados por 4 horas na temperatura ideal informada pelo fabricante da enzima.

As bandas resultantes de digestões de fragmentos de PCR foram analisadas em gel de agarose 2%, coradas com *BlueGreen Loadind Dye I* (LGCBiotecnologia) visualizadas e fotografadas em fotodocumentador UV. Para análise de produtos de restrição submetidos à digestão com enzimas de corte mais frequente utilizou-se gel de

poliacrilamida 5,6% corados com nitrato de prata para a visualização dos fragmentos. Utilizou-se marcador de peso molecular 100pb, 50pb, ϕ x ladder para estimar o tamanho dos fragmentos.

3.2.4 PCR E SEQUENCIAMENTO DO GENE COI

Para o estudo das populações de *N. testaceicornis* amostradas (ver TABELA 3 em Resultados e Discussão) através do gene COI, amplificamos um fragmento de 450pb (*primers mtD7/mtD9*) e submetemos à sequenciamento direto 60 amostras, sendo um indivíduo por ninho, assim distribuídas:

- 31 ninhos provenientes do *campus* da USP Ribeirão Preto - SP
- 03 ninhos provenientes da cidade de Ribeirão Preto - SP
- 02 ninhos provenientes da cidade de Franca – SP
- 03 ninhos provenientes da cidade de Campinas – SP
- 05 ninhos provenientes do *campus* da USP São Paulo – SP
- 06 ninhos provenientes da cidade de Bonfim Paulista – SP
- 01 ninho proveniente da cidade de Várzea da Palma – MG
- 04 ninhos provenientes da cidade de Uberlândia – MG
- 02 ninhos provenientes da cidade de Viçosa – MG
- 03 ninhos provenientes da cidade de Caratinga - MG

As reações de amplificação para o sequenciamento deste fragmento foram realizadas utilizando-se 25 μ l de Betaína (5M); 5,0 μ l de Tampão de PCR 10x; 5,0 μ L de dNTPs 2mM cada; 2,0 μ l de MgCl₂ 50mM; 2,5 μ L de cada *primer*; 0,25 μ L (1U) de *Taq* DNA polimerase (EasyPath); 2,0 μ L da extração de DNA; água Mili-Q autoclavada que

completou o volume final de 50 μ l. As condições de amplificação consistiram de um passo de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos com 94°C por 1 minuto, 44°C por 1 minuto e 20 segundos para pareamento dos *primers* e 64°C por 2 minutos; e um passo de extensão final a 70°C por 20 minutos. Alíquotas do material amplificado foram coradas com *BlueGreen Loadind Dye I* (LGCBiotecnologia) e submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% para a confirmação da amplificação.

O DNA amplificado foi submetido à purificação seguindo o protocolo do produto QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) e quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop ND1000). Seguiu-se então as reações de sequenciamento direto, em ambas as direções – *foward* (MtD7) e *reverse* (MtD9) – contendo: 50ng produto de PCR purificado; 3,0 μ L de tampão de sequenciamento (Save money 2,5X), 1,0 μ L de BigDye v3.1 (Applied Biosystems), 10 picomoles do oligonucleotídeo iniciador e quantidade de água bi-destilada estéril que completou 10 μ L. Ao término da reação de sequenciamento, que consistiu de 35 ciclos compostos por uma etapa a 96 °C por 10 segundos, uma etapa a 52 °C por 5 segundos e uma etapa de polimerização a 60 °C por 4 minutos, as amostras foram mantidas a 4°C até o momento do uso. Em seguida, 80 μ L de isopropanol foram adicionados a cada amostra. Após 15 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm, em centrífuga de placas Rotanta 46R (Hettich) com rotor para microplacas, por 45 minutos a 20°C. Após precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas, duas vezes, com 200 μ L de etanol 70% seguido de centrifugação a 4.000 rpm por 15 minutos a 20 °C, na mesma centrífuga Rotanta 46R. As amostras foram secas a vácuo, ressuspendidas em 10 μ L de formamida, desnaturadas por 5 minutos a 95°C e submetidas ao sequenciamento em um sequenciador automático ABI 3100 conforme metodologia sugerida pelo fabricante do equipamento (Applied Biosystems).

3.3 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS DO GENE COI

Sequências “*forward*” e “*reverse*” de cada amostra (n=68F e 68R) foram comparadas, corrigidas e editadas, criando-se uma única sequência consenso para cada amostra, usando o programa Chromas Lite 2.0 (TECHNELYSIUM PTY LTD, 1998). O alinhamento múltiplo das sequências foi gerado no programa BioEdit 7.0.5 (HALL, 2005) utilizando-se o método CLUSTAL W. A busca por sequências semelhantes às obtidas neste trabalho, no banco de dados do *NCBI GenBank*, foi realizada através do programa BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1990). O número de haplótipos foi estimado por meio do programa DNASP 5.10 (ROZAS *et al.*, 2009).

3.3.1 ANÁLISES POPULACIONAIS

Para descrever a quantidade da variação genética em uma população, calculamos as diversidades haplotípica (h), nucleotídica (π) e o número médio de diferenças nucleotídicas (K) (NEI, 1987) usando o programa DNASP 5.10 (ROZAS *et al.*, 2009). O programa Arlequin versão 3.1 (EXCOFFIER *et al.*, 2007) foi empregado para verificar as diferenças entre as populações, baseada nas frequências haplotípicas, realizando o teste exato, juntamente com o método da cadeia de Markov; também foram feitos cálculos da estrutura populacional através da análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER *et al.*, 1992), o qual usa Estatística F convencional baseada em análises de variância nas frequências genéticas e testes de neutralidade F_{u1s} F_s (FU, 1997) e Tajima's D (TAJIMA, 1989).

O programa MEGA4 (KUMAR *et al.*, 2007) foi utilizado para inferir as relações genéticas e filogenéticas entre os haplótipos.

O programa TCS 1.21 (CLEMENT *et al.*, 2000) foi utilizado para construir uma rede de inter-relação entre os haplótipos, onde os mesmos são conectados uns aos outros por uma passo mutacional, sendo que haplótipos não amostrados são representados por pequenas circunferências.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AMOSTRAGEM DO MATERIAL BIOLÓGICO

A amostragem do material biológico nos permitiu uma reavaliação das condições dos ninhos de *N. testaceicornis* que haviam sido encontrados até o ano de 2006 no *campus* da USP – RP bem como o levantamento de novos ninhos. Verificamos que dos 68 ninhos catalogados até o ano de 2006, 43 estavam mortos e/ou haviam sido reocupados por outras espécies de meliponíneos. Foram encontrados e catalogados 10 novos ninhos de *N. testaceicornis* durante o período de coleta em 2007 e dois em 2008. De acordo com o levantamento realizado no *campus* da USP-RP por FREITAS (2001) a espécie *N. testaceicornis* possui uma distribuição relativamente abundante em número de ninhos no *campus*, nidificando tanto em paredes quanto em troncos, sendo comum em cidades e aparecendo em quase todos os levantamentos em áreas urbanas, indicando que a espécie está sendo beneficiada com as modificações ambientais decorrentes da urbanização. Os esforços de coleta também nos permitiram a amostragem de 09 regiões externas ao *campus* da USP RP, possibilitando assim, uma maior amplitude dos estudos populacionais da espécie. No total foram analisadas 10 populações totalizando 85 ninhos descritos na tabela 3.

TABELA 3: QUANTIDADE DE NINHOS DE *N. testaceicornis* AMOSTRADOS NESTE TRABALHO E SUAS LOCALIDADES

Quantidade de Ninhos	Localidade
31	<i>Campus</i> da USP Ribeirão Preto
3	Ribeirão Preto - SP
2	Franca - SP
3	Campinas - SP
18	<i>Campus</i> da USP São Paulo - SP
14	Bonfim Paulista SP
1	Várzea da Palma - MG
6	Uberlândia - MG
2	Viçosa - MG
5	Caratinga - MG

De posse das atualizações dos ninhos trabalhamos na efetivação de um banco de dados via internet sobre o domínio: www.rge.fmrp.usp.br/ninhos para que as informações acerca dos ninhos de meliponíneos existentes no *campus* da USP-RP ficassem disponíveis *online*.

4.2 PCR+RFLP DO DNA MITOCONDRIAL

Para a padronização da amplificação de regiões do mtDNA de *N. testaceicornis*, testamos o protocolo utilizado por BRITO (2005) e a partir deste realizamos as modificações pertinentes. As análises foram realizadas nas amostras do *campus* USPRP, Ribeirão Preto, Bonfim Paulista, Franca, Campinas, São Paulo, Uberlândia, Várzea da Palma e Caratinga. Foram testados os *primers* heterólogos citados na tabela 1, para a verificação de quais regiões conseguiríamos sucesso na amplificação definindo assim quais *primers* seriam utilizados e como estes seriam combinados em pares e realizando as amplificações testávamos também a precisão do protocolo escolhido para a extração do DNA e a qualidade deste. Das diferentes combinações de pares de *primers* testadas, obtivemos êxito na amplificação de 06 regiões do mtDNA: 16S (*primers* 16SF/16SR); CO III e ND3 (*primers* tPheF/5612R); CO I e CO II (COI-IIF/mtD18); CytB e ND1 (*primers* mtD26/mtD30); ATPases 8 e 6 e CO III (*primers* mtD19/mtD22); CO I (*primers* mtD7/mtD9), resultando em fragmentos de 600; 1100; 900; 1700; 1700; 450 pares de base, respectivamente, não sendo observadas diferenças nos tamanhos dos fragmentos amplificados entre os ninhos estudados. Observamos ainda que o tamanho de todos os fragmentos obtidos está em concordância com o tamanho médio esperado descrito para *Apis mellifera* e para os meliponíneos *Partamona helleri* e *Partamona mulata* (BRITO & ARIAS, 2005), *Plebeia spp* (FRANCISCO *et al.*, 2001; FRANCISCO, 2002; WEINLICH *et al.*, 2004), *Melipona bicolor* (SILVESTRE, 2002), *Melipona spp* (FERNANDES-SALOMÃO *et al.*, 2002) e *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* e *M. q. anthidioides* (MORETTO & ARIAS, 2005). A única

exceção é em relação ao genoma mitocondrial de *Apis mellifera* (CROZIER & CROZIER, 1993), onde foi descrita uma região intergênica chamada CO I – CO II, que está localizada entre os genes codificadores para o RNA^{LEU} e CO II (Cornuet *et al.*, 1991) e que é ausente em Meliponini conforme observado neste trabalho e nos trabalhos com meliponíneos citados anteriormente. A ausência da região intergênica em *N. testaceicornis* foi inferida neste trabalho pelo comprimento do fragmento amplificado o qual é 300pb menor que o descrito para *A. mellifera*, mas similar àqueles observados em *Plebeia*, *Melipona* e *Partamona* sugerindo que a falta desta região intergênica seja uma característica evolutiva conservada entre os Meliponini.

A soma dos fragmentos amplificados, diminuindo os locais de sobreposição dos *primers* corresponde a aproximadamente 40% do genoma mitocondrial (FIGURA 4) tendo como base o genoma mitocondrial de *Melipona bicolor* estimado em 18500 pb (WEINLICH *et al.*, 1999).

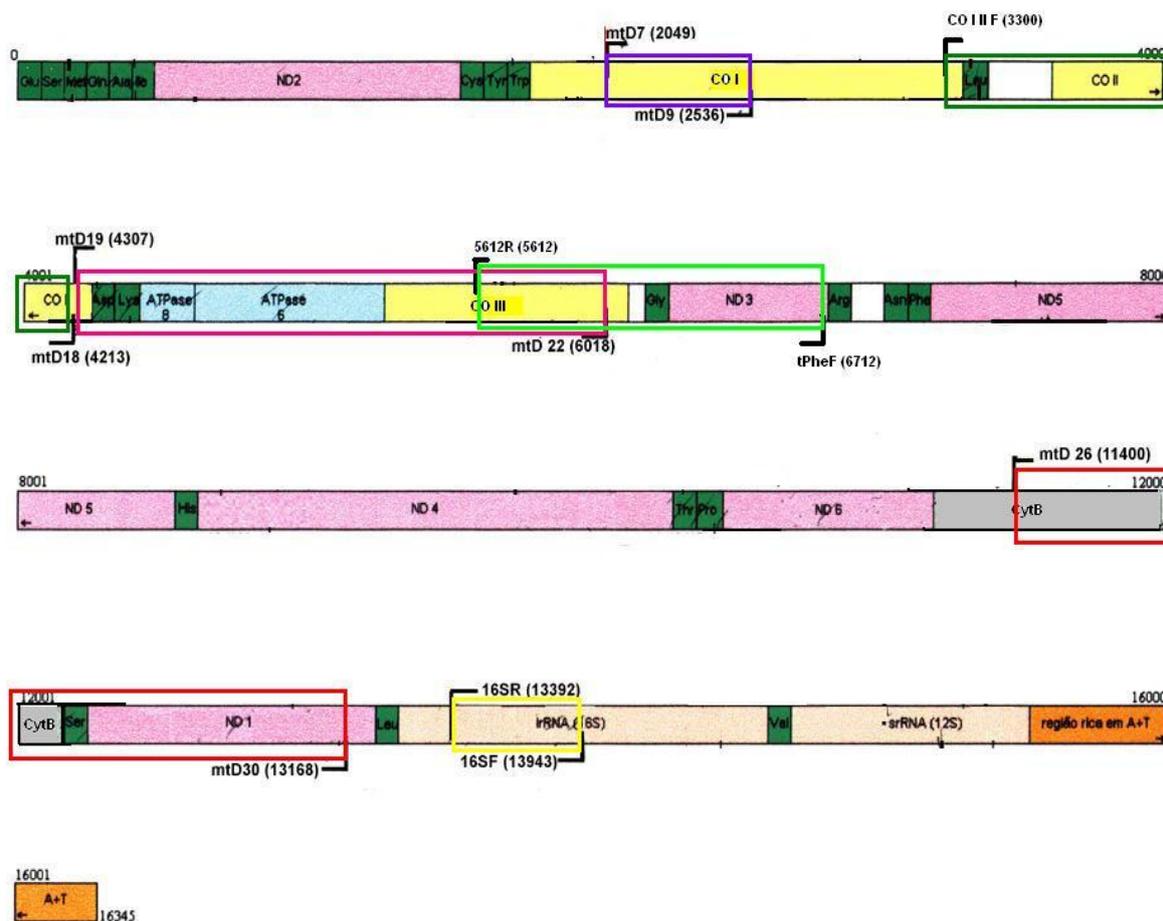


FIGURA 4: Esquema de um genoma mitocondrial (*Apis mellifera*), indicando as regiões de amplificação, os pares de *primer* utilizados e suas respectivas posições (em pb) em *N. testaceicornis*.

Das 10 enzimas de restrição utilizadas (TABELA 2), apenas a enzima *EcoR V* não reconheceu sítios de restrição nos fragmentos estudados. A falta de sítios de restrição para esta enzima também foram observados no genoma mitocondrial de *Partamona mulata* e *P. helleri* (BRITO & ARIAS, 2005), nos trabalhos de TORRES *et al.* (2009) e MORETTO & ARIAS (2005) com fragmentos do mtDNA de *Melipona quadrifasciata* e no estudo de FRANCISCO *et al.* (2001) com cinco espécies do gênero *Plebeia*, onde a ausência deste sítio foi observada nas espécies *P. droryana*, *P. emerina* e *P. remota*, sendo que para as outras duas espécies (*P. saiqui* e *P. sp.*), foi observado apenas um sítio de restrição para esta enzima mapeado na porção final do gene 16S, indicando a baixa frequência desses sítios em meliponíneos. As enzimas que mais geraram sítios de restrição foram *Dra I*, *Ase I* e *Ssp I* todas consideradas enzimas de corte frequente para o genoma mitocondrial por ser este rico em nucleotídeos Adenina e Timina e elas reconhecerem sítios de corte TTT/AAA, AT/TAAT e AAT/ATT, respectivamente. Porém em algumas regiões não foi possível determinar o padrão de bandas gerado por tais enzimas devido ao grande número de sítios, e desta forma estes resultados foram descartados. Os padrões de restrição de cada região são ilustrados nas tabelas 4 a 8.

O estudo do mtDNA de *N. testaceicornis* através de PCR+RFLP, foi baseado na análise do padrão de bandas gerado (tamanho das bandas), sendo que o perfil de digestão de cada fragmento obtido por enzima foi designado por uma letra (TABELAS 4 a 8, letra maiúscula à esquerda dos padrões de clivagem) para a composição de haplótipos compostos pela justaposição das letras (TABELA 9). Porém, conforme já se podia observar pelos padrões de clivagem gerados, nessa análise só foram detectados sítios de restrição monomórficos e, portanto, apenas um haplótipo (**H01**) foi obtido no estudo dessas populações de *N. testaceicornis*. A presença de apenas um haplótipo observado nas 9 populações estudadas via PCR+RFLP, dispensou as análises estatísticas que comumente faríamos para este tipo de estudo: divergência de sequência (*d*), diversidade haplotípica (*h*) e nucleotídica (π), pois não existe uma variabilidade intra-específica. A notória não subdivisão das populações também dispensou o cálculo da Análise de Variância Molecular (AMOVA). De acordo com o resultado nossas populações seriam idênticas e teriam uma origem comum.

TABELA 4: PADRÕES DE CLIVAGEM (IDENTIFICADOS PELAS LETRAS MAIÚSCULAS À ESQUERDA) DAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO UTILIZADAS NA DIGESTÃO DA REGIÃO CORRESPONDENTE AO GENE 16S (600pb). TAMANHO DOS FRAGMENTOS EM PARES DE BASE (pb)

Pop	Ase I	Dra I	Cla I	EcoR I	Hinf I	Mbo I	Rsa I	Pst I	Ssp I
USPRP	A 210-150-100-80-60	A 200-170-135-95	A 600	A 600	A 600	A 600	A 600	A 450-150	A 350-250
RP	A 210-150-100-80-60	A 200-170-135-95	A 600	A 600	A 600	A 600	A 600	A 450-150	A 350-250
BoP	A 210-150-100-80-60	A 200-170-135-95	A 600	A 600	A 600	A 600	A 600	A 450-150	A 350-250
Fran	A 210-150-100-80-60	A 200-170-135-95	A 600	A 600	A 600	A 600	A 600	A 450-150	A 350-250
Camp	A 210-150-100-80-60	A 200-170-135-95	A 600	A 600	A 600	A 600	A 600	A 450-150	A 350-250
SP	A 210-150-100-80-60	A 200-170-135-95	A 600	A 600	A 600	A 600	A 600	A 450-150	A 350-250
Udy	A 210-150-100-80-60	A 200-170-135-95	A 600	A 600	A 600	A 600	A 600	A 450-150	A 350-250
VP	A 210-150-100-80-60	A 200-170-135-95	A 600	A 600	A 600	A 600	A 600	A 450-150	A 350-250
Car	A 210-150-100-80-60	A 200-170-135-95	A 600	A 600	A 600	A 600	A 600	A 450-150	A 350-250

TABELA 5: PADRÕES DE CLIVAGEM (IDENTIFICADOS PELAS LETRAS MAIÚSCULAS À ESQUERDA) DAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO UTILIZADAS NA DIGESTÃO DA REGIÃO CORRESPONDENTE AOS GENES CO III E ND3 (1100pb). TAMANHO DOS FRAGMENTOS EM PARES DE BASE (pb)

Pop	Ase I	Dra I	Cla I	EcoR I	Hinf I	Mbo I	Rsa I	Pst I	Ssp I
USPRP	A ?*	A 500-330-170-70-30	A 1100	A 1100	A 900-300	A 1100	A 800-300-100	A 1100	A 440-360-155-90-55
RP	A ?	A 500-330-170-70-30	A 1100	A 1100	A 900-300	A 1100	A 800-300-100	A 1100	A 440-360-155-90-55
BoP	A ?	A 500-330-170-70-30	A 1100	A 1100	A 900-300	A 1100	A 800-300-100	A 1100	A 440-360-155-90-55
Fran	A ?	A 500-330-170-70-30	A 1100	A 1100	A 900-300	A 1100	A 800-300-100	A 1100	A 440-360-155-90-55
Camp	A ?	A 500-330-170-70-30	A 1100	A 1100	A 900-300	A 1100	A 800-300-100	A 1100	A 440-360-155-90-55
SP	A ?	A 500-330-170-70-30	A 1100	A 1100	A 900-300	A 1100	A 800-300-100	A 1100	A 440-360-155-90-55
Udy	A ?	A 500-330-170-70-30	A 1100	A 1100	A 900-300	A 1100	A 800-300-100	A 1100	A 440-360-155-90-55
VP	A ?	A 500-330-170-70-30	A 1100	A 1100	A 900-300	A 1100	A 800-300-100	A 1100	A 440-360-155-90-55
Car	A ?	A 500-330-170-70-30	A 1100	A 1100	A 900-300	A 1100	A 800-300-100	A 1100	A 440-360-155-90-55

* O símbolo “?” indica que houve restrição porém não foi possível quantificar o número de sítios e o tamanho das bandas devido ao grande número de fragmentos gerados após a digestão.

TABELA 6: PADRÕES DE CLIVAGEM (IDENTIFICADOS PELAS LETRAS MAIÚSCULAS À ESQUERDA) DAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO UTILIZADAS NA DIGESTÃO DA REGIÃO CORRESPONDENTE AOS GENES **CO I** E **CO II** (900pb). TAMANHO DOS FRAGMENTOS EM PARES DE BASE (pb)

Pop	<i>Ase I</i>	<i>Dra I</i>	<i>Cla I</i>	<i>EcoR I</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Rsa I</i>	<i>Pst I</i>	<i>Ssp I</i>
USPRP	A 330-240-150-100-80	A 340-230-155-110-65	A 800-100	A 900	A 550-200-150	A 900	A 900	A ?*
RP	A 330-240-150-100-80	A 340-230-155-110-65	A 800-100	A 900	A 550-200-150	A 900	A 900	A ?
BoP	A 330-240-150-100-80	A 340-230-155-110-65	A 800-100	A 900	A 550-200-150	A 900	A 900	A ?
Fran	A 330-240-150-100-80	A 340-230-155-110-65	A 800-100	A 900	A 550-200-150	A 900	A 900	A ?
Camp	A 330-240-150-100-80	A 340-230-155-110-65	A 800-100	A 900	A 550-200-150	A 900	A 900	A ?
SP	A 330-240-150-100-80	A 340-230-155-110-65	A 800-100	A 900	A 550-200-150	A 900	A 900	A ?
Udy	A 330-240-150-100-80	A 340-230-155-110-65	A 800-100	A 900	A 550-200-150	A 900	A 900	A ?
VP	A 330-240-150-100-80	A 340-230-155-110-65	A 800-100	A 900	A 550-200-150	A 900	A 900	A ?
Car	A 330-240-150-100-80	A 340-230-155-110-65	A 800-100	A 900	A 550-200-150	A 900	A 900	A ?

* O símbolo “?” indica que houve restrição porém não foi possível quantificar o número de sítios e o tamanho das bandas devido ao grande número de fragmentos gerados após a digestão.

TABELA 7: PADRÕES DE CLIVAGEM (IDENTIFICADOS PELAS LETRAS MAIÚSCULAS À ESQUERDA) DAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO UTILIZADAS NA DIGESTÃO DA REGIÃO CORRESPONDENTE AOS GENES **CytB** e **ND1** (1700pb). TAMANHO DOS FRAGMENTOS EM PARES DE BASE (pb)

Pop	<i>Ase I</i>	<i>Dra I</i>	<i>Cla I</i>	<i>EcoR I</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Mbo I</i>	<i>Rsa I</i>	<i>Pst I</i>	<i>Ssp I</i>
USPRP	A ?*	A 600-420-300-210-100-70	A 1700	A 100-700	A 900-600-200	A 1500-200	A 1700	A 1700	A 550-370-300-250-130-100
RP	A ?	A 600-420-300-210-100-70	A 1700	A 100-700	A 900-600-200	A 1500-200	A 1700	A 1700	A 550-370-300-250-130-100
BoP	A ?	A 600-420-300-210-100-70	A 1700	A 100-700	A 900-600-200	A 1500-200	A 1700	A 1700	A 550-370-300-250-130-100
Fran	A ?	A 600-420-300-210-100-70	A 1700	A 100-700	A 900-600-200	A 1500-200	A 1700	A 1700	A 550-370-300-250-130-100
Camp	A ?	A 600-420-300-210-100-70	A 1700	A 100-700	A 900-600-200	A 1500-200	A 1700	A 1700	A 550-370-300-250-130-100
SP	A ?	A 600-420-300-210-100-70	A 1700	A 100-700	A 900-600-200	A 1500-200	A 1700	A 1700	A 550-370-300-250-130-100
Udy	A ?	A 600-420-300-210-100-70	A 1700	A 100-700	A 900-600-200	A 1500-200	A 1700	A 1700	A 550-370-300-250-130-100
VP	A ?	A 600-420-300-210-100-70	A 1700	A 100-700	A 900-600-200	A 1500-200	A 1700	A 1700	A 550-370-300-250-130-100
Car	A ?	A 600-420-300-210-100-70	A 1700	A 100-700	A 900-600-200	A 1500-200	A 1700	A 1700	A 550-370-300-250-130-100

* O símbolo “?” indica que houve restrição porém não foi possível quantificar o número de sítios e o tamanho das bandas devido ao grande número de fragmentos gerados após a digestão

TABELA 8: PADRÕES DE CLIVAGEM (IDENTIFICADOS PELAS LETRAS MAIÚSCULAS À ESQUERDA) DAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO UTILIZADAS NA DIGESTÃO DA REGIÃO CORRESPONDENTE AOS GENES *ATPase 8 e 6 e CO III* (1700pb). TAMANHO DOS FRAGMENTOS EM PARES DE BASE (pb)

Pop	<i>Ase I</i>	<i>Dra I</i>	<i>EcoR I</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Pst I</i>	<i>Ssp I</i>
USPRP	A ?*	A 570-320-280-255-180-95	A 950-750	A 1700	A 1000-700	A ?*
RP	A ?	A 570-320-280-255-180-95	A 950-750	A 1700	A 1000-700	A ?
BoP	A ?	A 570-320-280-255-180-95	A 950-750	A 1700	A 1000-700	A ?
Fran	A ?	A 570-320-280-255-180-95	A 950-750	A 1700	A 1000-700	A ?
Camp	A ?	A 570-320-280-255-180-95	A 950-750	A 1700	A 1000-700	A ?
SP	A ?	A 570-320-280-255-180-95	A 950-750	A 1700	A 1000-700	A ?
Udy	A ?	A 570-320-280-255-180-95	A 950-750	A 1700	A 1000-700	A ?
VP	A ?	A 570-320-280-255-180-95	A 950-750	A 1700	A 1000-700	A ?
Car	A ?	A 570-320-280-255-180-95	A 950-750	A 1700	A 1000-700	A ?

* O símbolo “?” indica que houve restrição porém não foi possível quantificar o número de sítios e o tamanho das bandas devido ao grande número de fragmentos gerados após a digestão

TABELA 9: HAPLÓTIPO MITOCONDRIAL DE *N. testaceicornis* OBTIDO PELA COMPOSIÇÃO DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS: A: *Ase I*; D: *Dra I*; C: *Cla I*; E: *EcoR I*; H: *Hinf I*; M: *Mbo I*; R: *Rsa I*; P: *Pst I*; S: *Ssp I*

Haplótipo	16S									COIII e ND3							CO I e CO II							CytB e ND1							ATPase 8 e 6 e CO III						
	A	D	C	E	H	M	R	P	S	D	C	E	H	M	R	P	S	A	D	C	E	H	R	P	D	C	E	H	M	R	P	S	D	E	H	P	S
H01	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Uma baixa frequência de sítios polimórficos e de número de haplótipos também foi observada por BRITO (2005) em populações de *P. mulata* amostradas nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Neste trabalho foram encontrados apenas 2 haplótipos, sendo o haplótipo 1 (H01) presente em todas as populações e o haplótipo 2 (H02) presente apenas em uma colônia da população de Mato Grosso do Sul (n=58 colônias em Campo Grande), ou seja, as colônias seriam muito semelhantes assim como nos resultados encontrados para *N. testaceicornis*. Em *Apis cerana* SIHANUNTAVONG *et al.* (1999), também observaram apenas um haplótipo em uma população da ilha Phuket. Porém essa baixa variabilidade seria consequência da colonização da ilha por populações com baixíssima diversidade haplotípica, ocorrendo o efeito do fundador, o que não podemos postular no nosso estudo.

Uma baixa variabilidade intrapopulacional era esperada no nosso estudo, pois os ninhos amostrados encontravam-se muito próximos uns dos outros, considerando-se uma mesma localidade, assim seria provável que a matrilinea fosse a mesma. Porém, o fato de populações distantes 300, 600 e até 800 km apresentarem o mesmo haplótipo, ou seja a variabilidade interpopulacional também foi nula, mostra que nossos resultados não estariam comprometidos por erro amostral.

Ainda considerando o estudo de BRITO (2005), a autora propõe duas opções na história evolutiva de *P. mulata* que levariam a uma baixa diversidade haplotípica:

- A espécie teria passado por um gargalo “bottleneck” populacional e a recolonização das áreas teria sido iniciada por uma população com baixa variabilidade haplotípica ou;
- Divergência recente de uma espécie ancestral.

No nosso estudo com *N. testaceicornis* preferimos ainda não postular qualquer evento na história evolutiva nessas populações. Os estudos de PCR+RFLP em *P. mulata* foram bem embasados por uma caracterização prévia de mtDNA dessa espécie por enzimas de restrição e sequenciamento culminando na construção do mapa de restrição de *P. mulata*. No caso de *N. testaceicornis* preocupamo-nos em escolher enzimas de corte mais frequente ou então com sítios de restrição mais observados nas

espécies de meliponíneos já caracterizadas (*Partamona*, *Plebeia*, *Melipona*) o que não nos garante um bom critério de escolha. Acreditamos que para inferir sobre a história evolutiva de *N. testaceicornis* com PCR+RFLP, seria preciso o teste com mais enzimas de restrição para podermos realmente verificar se realmente existe uma baixa diversidade.

De acordo com AVISE (1987) é comum estudos de mtDNA revelarem variações entre populações de diferentes áreas geográficas, então decidimos utilizar a técnica de sequenciamento, por ser mais sensível, para esse estudo populacional com a análise da sequência de um fragmento do gene CO I, cujos resultados serão descritos nas próximas seções.

4.3 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE CO I

Analizamos um total 60 sequências da porção do gene CO I compreendida entre os *primers* mtD7/mtD9, distribuídas entre as populações estudadas conforme descrito na Tabela 10. Como a técnica para sequenciamento utilizada foi a de “Sequenciamento Direto” as sequências variaram de tamanho. Após o alinhamento e edição das sequências cada uma delas ficou com um tamanho consenso de 400 pb. As sequências isoladas correspondem à posição nucleotídica 1898 até 2298 do genoma mitocondrial de *Melipona bicolor* (SILVESTRE, 2002) (Número de acesso no NCBI GenBank AF466146). Observamos uma proporção de nucleotídeos de T=48%, A=29,4%, C=12,4% e G=11% reafirmando a riqueza de bases A e T descrita para o genoma mitocondrial de insetos. A análise das sequências pelo programa BLAST (MCGINNIS AND MADDEN, 2004) revelou alinhamentos significantes apenas com o gene CO I de outras espécies de abelhas, principalmente da tribo Meliponini, e nenhuma para outros táxons.

Foram encontrados 05 haplótipos (H01-H05) descritos por 14 posições variáveis (FIGURA 5), sendo o H01 o haplótipo mais frequente entre as populações (70% das populações amostradas e 85,7% dos ninhos), e muitas vezes o único haplótipo registrado na população. Haplótipos exclusivos foram encontrados nas populações do *campus* da USPRP (H03), Caratinga (H04) e Viçosa (H05). A tabela 10 sumariza os resultados obtidos para os haplótipos em relação às suas distribuições.

Haplótipos	Sítios Polimórficos*													
	1 1 1 2 2 2 2 2 2 3 3 3													
	8 9 0 3 6 2 2 5 6 7 9 0 2 6													
H01	G	A	G	A	A	G	G	A	A	A	A	A	A	G
H02	T
H03	A
H04	.	T	A	.	.	A	A	G	G	G	.	G	G	A
H05	.	T	.	G	G	.	A	G	.	.	G	.	.	A

*Números verticais mostram a posição da variação. Pontos mostram a identidade com o haplótipo H01

FIGURA 5: SÍTIOS VARIÁVEIS DOS 5 HAPLÓTIPOS DE *N. testaceicornis*, REFERENTES AO FRAGMENTO DE 309PB DO GENE CO I. Os números (verticais) acima das bases indicam a posição das mesmas

TABELA 10: DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS ENCONTRADOS NAS POPULAÇÕES DE *N. testaceicornis* E FREQUÊNCIA (%) OBSERVADA EM CADA POPULAÇÃO

	H01	H02	H03	H04	H05
USPRP	90,3 (N=28)	3,22 (N=1)	6,45 (N=2)	-	-
RP	100,0 (N=2)	-	-	-	-
B. Paulista	100,0 (N=6)	-	-	-	-
Franca	-	100 (N=2)	-	-	-
Campinas	100,0 (N=2)	-	-	-	-
USPSP	100,0 (N=5)	-	-	-	-
Uberlândia	100,0 (N=4)	-	-	-	-
V.da Palma	100,0 (N=1)	-	-	-	-
Viçosa	-	-	-	-	100,0(N=2)
Caratinga	-	-	-	100,0 (N=3)	-

Na tabela 11 estão apresentados os índices de diversidade para cada população e também a diversidade interpopulacional nas áreas amostradas. Em comparação com outros trabalhos de genética de populações de meliponíneos os índices de diversidade haplotípica ($Hd= 0,264$) e diversidade nucleotídica ($\pi=0,00386$) observados são baixos, pois, FRANCISCO & ARIAS (2009) relatam valores de Hd variando de 0,17 a 0,52 e de π variando entre 0,2 a 2,2 em 04 populações de *Plebeia remota* com uma média de Hd interpopulacional igual a 0,54 e $\pi=0,81$; MORESCO (2009), estudando 05 populações de *Melipona marginata*, observou uma Hd interpopulacional de 0,33 e $\pi=0,001$, enquanto BRITO (2005), nas análises de *P. helleri*, encontrou um valor de Hd médio entre as populações igual a 0,55 e de π igual a 0,0021 e BATALHA FILHO (2008) estudando populações de subespécies *M. quasrifasciata*, verificou uma $Hd= 0,957$ e $\pi=0,0547$.

TABELA 11: DIVERSIDADE GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE *N. testaceicornis*

Populações amostradas	Nº de ninhos	Nº de haplótipos	Haplótipos exclusivos	Diversidade*		
				Hd	π	k
USPRP	31	3	1	0,185	0,00061	0,189
RP	3	1	0	0	0	0
B. Paulista	6	1	0	0	0	0
Franca	2	1	0	0	0	0
Campinas	3	1	0	0	0	0
USPSP	5	1	0	0	0	0
Uberlândia	4	1	0	0	0	0
V.da Palma	1	1	0	0	0	0
Viçosa	2	1	1	0	0	0
Caratinga	3	1	1	0	0	0
Diversidade Interpopulacional				0,264	0,00386	1,191

* h diversidade haplotípica; π diversidade nucleotídica; k número médio de diferenças nucleotídicas

Devemos, porém ser cautelosos quanto a alguma conclusão relativa à variabilidade do gene CO I nas populações de *N. testaceicornis* estudadas devido ao pequeno número de indivíduos analisados em algumas populações (Franca, Várzea da Palma e Viçosa onde $n < 3$), uma vez que a diversidade haplotípica está relacionada com o tamanho amostral em se tratando de trabalhos que utilizam como fonte de informação sequências de mtDNA, por esse fato os valores de diversidade nucleotídica são os mais indicados para comparação nesses estudos pelo fato de seus valores não estarem vinculados ao tamanho amostral. A única inferência que podemos fazer quanto à variabilidade intra populacional refere-se à diversidade da população do *campus* da USPRP que apresentou 3 haplótipos (H01, H02 e H03), porém o índice de diversidade nucleotídica ($0,00061 = 0,061\%$) dessa população indica que os diferentes haplótipos encontrados nessa população são pouco divergentes entre si, o que pode ser observado na figura 5 onde são comparadas as sequências dos haplótipos e observamos que a diferença entre eles é determinada por apenas um sítio polimórfico.

Apesar da população de *N. testaceicornis* do *campus* da USPRP possuir a maior diversidade haplotípica e nucleotídica intrapopulacional não é possível inferir que essa região tenha sido o possível centro de dispersão da espécie. Para tal conclusão faz se necessário um estudo filogeográfico da espécie, principalmente porque o *campus* da USP é notadamente um centro de pesquisa em meliponíneos, com a finalidade de pesquisas comportamentais, genéticas e evolutivas. Muitas espécies de meliponíneos de outras regiões foram levadas para o *campus* e lá encontraram um ambiente favorável, com grande disponibilidade de recursos alimentares e de locais para nidificação. Visto que um dos principais fatores para diminuição do número de ninhos de meliponíneos é a ausência de locais para nidificação, estas abelhas podem estar repovoando a área, e inclusive algumas espécies podem estar se beneficiando com a disponibilidade dos novos nichos que surgiram com as construções. No caso de *N. testaceicornis*, 75,00% ninhos localizados estavam em paredes (FREITAS, 2001). As espécies introduzidas no *campus* tornam-se bem adaptadas, em função das disponibilidades alimentares, locais de nidificação e, sobretudo pela expansão de áreas arborizadas com a implantação da floresta da USP desde 1990, contribuindo assim com a diversidade local, fazendo do *campus* um importante banco de germoplasma.

A distância entre os haplótipos (d) foi calculada (TABELA 12) e a inter-relação entre os mesmos pode ser vista no fenograma obtido pelo método “Neighbor-Joining” (FIGURA 6), utilizando-se os valores de (d) o qual ilustra as possíveis distâncias genéticas entre os haplótipos para o gene CO I de *N. testaceicornis*; este método foi escolhido por ser o mais apropriado quando o número de nucleotídeos ou aminoácidos analisado é pequeno (NEI *et al.*, 1998). Uma rede de haplótipos também foi gerada, através do programa NetWork (<http://www.fluxus-engineering.com/>), proporcionando uma visão global das inter-relações haplotípicas (Figura 7).

TABELA 12: DISTÂNCIA PAR A PAR ENTRE OS HAPLÓTIPOS (d) REPRESENTADA PELO NÚMERO DE SUBSTITUIÇÃO DE BASES POR SÍTIO*

	H01	H02	H03	H04	H05
H01					
H02	0,0031				
H03	0,0031	0,0063			
H04	0,0354	0,0387	0,0321		
H05	0,0255	0,0287	0,0223	0,0289	

*As análises foram conduzidas usando o método *Kimura 2-p*. Em **vermelho**: haplótipos encontrados nas populações USPRP, RP, Bonfim Paulista, Campinas, SP, Uberlândia e Várzea da Palma; em **preto**: haplótipos na USPRP e Franca; em **verde** haplótipo exclusivo da USPRP; em **azul**: haplótipo encontrado na população Caratinga; em **laranja**: haplótipo encontrado em Viçosa

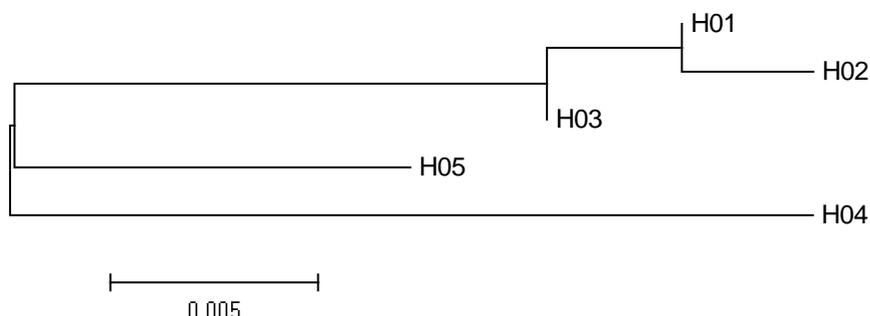


FIGURA 6: FENOGRAMA OBTIDO PELO MÉTODO NEIGHBOR-JOINING A PARTIR DE (d), RELACIONADO OS HAPLÓTIPOS OBTIDOS NAS 10 POPULAÇÕES DE *N. testaceicornis*

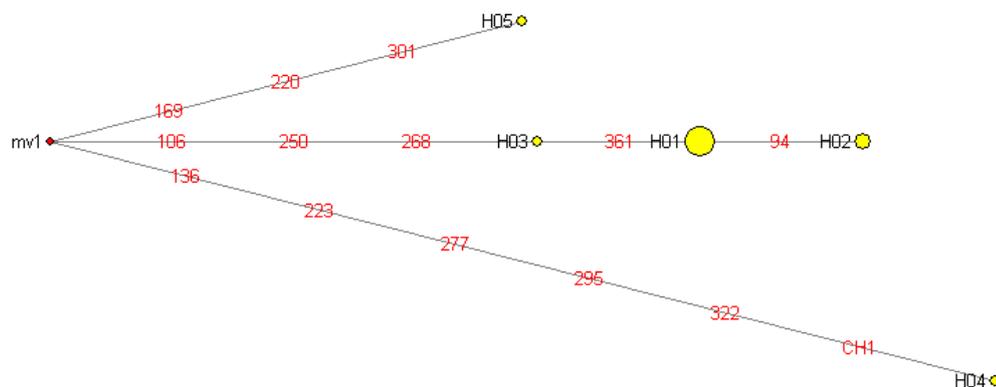


FIGURA 7: REDE DE HAPLÓTIPOS DO GENE CO I DA ESPÉCIE *N. testaceicornis*. O tamanho das esferas representa o número de indivíduos e os números entre as esferas representam os sítios polimórficos.

A análise da distância entre os haplótipos revelou um claro isolamento das populações de Viçosa e Caratinga; para *Plebeia remota*, em especial, FRANCISCO (2002) verificou isolamento entre quatro populações (São Paulo, Curitiba, Santa Catarina e Prudentópolis) com raro compartilhamento de haplótipos. Ainda, foi observada grande distância genética entre 3 populações em relação a uma outra população proveniente de Prudentópolis (PR), o que pode ser interpretado como um indício de que esteja ocorrendo processo de especiação nessas abelhas. Observamos ainda que H01 é o provável haplótipo ancestral (com um maior número de indivíduos) estando os H02 e H3 relacionados à ele.

A distribuição dos haplótipos mitocondriais e as análises estatísticas que demonstraram o isolamento das populações de Viçosa e Caratinga sugeriram uma ausência de fluxo gênico mediante rainhas, pois estas apresentam um comportamento filopátrico; portanto, esse fato nos levaria a acreditar que estaríamos diante de um caso de isolamento por distância, por se tratarem das localidades mais afastadas. A hipótese da ocorrência dessas possíveis diferenças haplotípicas e interpopulacionais estarem correlacionadas com a distância geográfica foi testada através da metodologia

desenvolvida por Mantel, que revelou ausência de correlação entre distâncias geográficas e genéticas ($r=0,58$; $p=0,14$; significância $p<0,05$) (FIGURA 8).

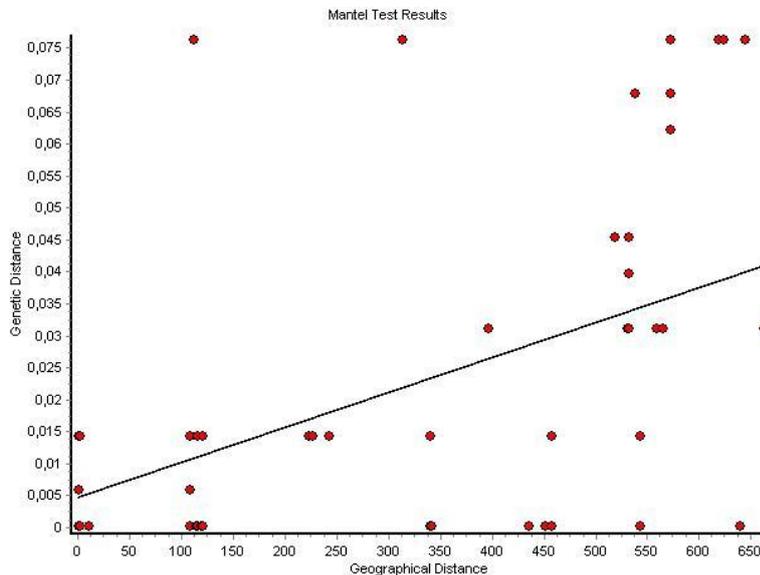


FIGURA 8: GRÁFICO REPRESENTATIVO DO TESTE DE MANTEL COM SEQUÊNCIAS DO GENE CO I: CORRELAÇÃO ENTRE AS DISTÂNCIAS GEOGRÁFICAS E GENOTÍPICAS. A reta representa a normal esperada no caso de correlação positiva. Distância geográfica em Km.

Ausência de correlação entre distância geográfica e genética também foi observada por BATALHA FILHO (2008) em um estudo filogeográfico das subespécies *M. q. quadrifasciata* e *M. q. anthidioides* do clado sul, sendo a ausência de estruturação explicada por um recente evento de “*bottleneck*” seguido por uma pequena expansão. Francisco & Arias (2009), também relataram ausência de isolamento por distância entre populações de *P. remota*, concluindo que a estrutura populacional encontrada é resultado do comportamento de enxameação nas abelhas sem ferrão e pelos deslocamentos da vegetação causados pelas mudanças paleoclimáticas.

No caso das populações de *N. testaceicornis* estudadas, acreditamos que o isolamento das populações de Viçosa e Caratinga seja causado pela barreira geográfica formada pelo complexo da “Serra do Espinhaço” que impede o fluxo gênico entre as populações, visto que populações muito distantes, mas sem a presença dessa barreira, como por exemplo, Várzea da Palma e São Paulo (882 km) compartilham o haplótipo (H01). Observando o mapa do relevo de Minas Gerais e plotando os municípios, percebe-se que os mesmos encontram-se numa região montanhosa e isolados da

parte oeste do estado por essa cordilheira que se estende desde o estado de Minas Gerais até a Bahia (Figura 9). Esse mosaico de montanhas formando barreiras geográficas associado ao comportamento de dispersão dessas abelhas podem explicar o isolamento das populações de *N. testaceicornis* dessas localidades. BATALHA FILHO (2008) observou uma estruturação geográfica em populações de *M. quadrifasciata* por proximidade entre localidades na porção sul da Serra do Espinhaço em MG, ou seja, as populações dessa região formavam um clado isolado das outras populações estudadas, afirmando que a estruturação observada na porção sul da Serra do Espinhaço é provavelmente oriunda de refúgios recentes (Pleistoceno final e Holoceno) associado às características de relevo da região.

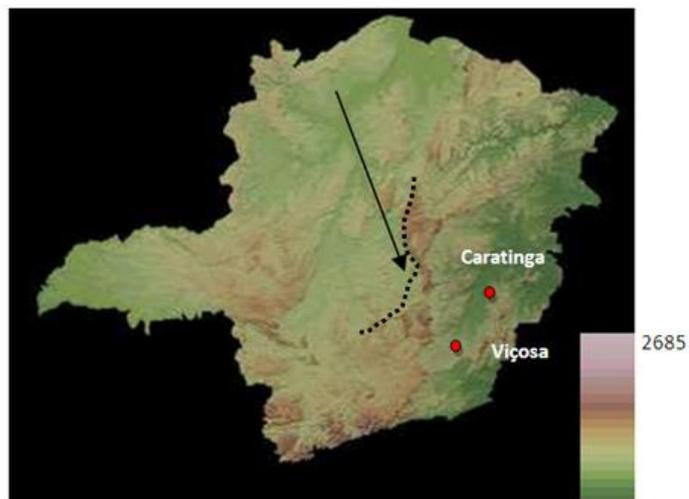


FIGURA 9: MAPA DO RELEVO DE MINAS GERAIS. SÃO MOSTRADAS AS LOCALIZAÇÕES DOS MUNICÍPIOS DE CARATINGA E VIÇOSA E A SERRA DO ESPINHAÇO (SETA).

Para visualizarmos, então, as diferenças entre as populações estudadas, as distâncias genéticas entre as mesmas e a sua estruturação procederam-se o teste exato, juntamente com o método da cadeia de Markov, o cálculo do F_{st} e a AMOVA, respectivamente, cujos resultados são elucidados a seguir.

Os valores obtidos para o F_{st} e os valores para o cálculo de diferenciação par a par das populações empregando o teste exato baseado nas frequências haplotípicas (P) são mostrados na tabela 13.

TABELA 13: VALORES DA ESTIMATIVA DE F_{st} (ABAIXO DA DIAGONAL) E VALORES DE P (ACIMA DA DIAGONAL- DE ACORDO COM TESTE EXATO DE DIFERENÇAS), ENTRE AS POPULAÇÕES DE *N. testaceicornis*. Erro padrão entre parênteses. $P < 0,05$ = Populações diferentes

	USPRP	RP	CAMP	FRANCA	BoP	SP	UDY	VIÇ	CAR	VP
USPRP		1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	0,129 (0,0023)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	0,05423 (0,0030)	0,00026 0,0001	1,00 (0,00)
RP	0,00430		1,00 (0,00)	0,33148 (0,029)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	0,33176 (0,0015)	0,01962 (0,009)	1,00 (0,00)
CAMP	0,00430	0,000		0,33303 (0,0014)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	0,33368 (0,0027)	0,01011 (0,0016)	1,00 (0,00)
FRANCA	0,87527	1,000	1,000		0,14521 (0,0021)	0,16750 (0,0027)	0,20004 (0,0017)	1,00 (0,00)	0,24575 (0,0031)	1,00 (0,00)
BoP	0,00430	0,000	0,000	1,000		1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	0,13972 (0,0015)	0,011924 (0,007)	1,00 (0,00)
SP	0,00430	0,000	0,000	1,000	0,000		1,00 (0,00)	0,16685 (0,0020)	0,01785 (0,0010)	1,00 (0,00)
UDY	0,00430	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000		0,19528 (0,0023)	0,01773 (0,0010)	1,00 (0,00)
VIÇ	0,90753	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,25198 (0,0021)	1,00 (0,00)
CAR	0,90753	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,25046 (0,0028)
VP	0,00430	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	

Analisando-se os valores de F_{st} (tabela 13, valores abaixo da diagonal) calculados entre os pares de população, observamos que as populações do *campus* da USPRP, Ribeirão Preto, Campinas, Bonfim Paulista, São Paulo, Uberlândia e Várzea da Palma estão estreitamente relacionadas não havendo diferenciação entre as mesmas e que as populações de Franca, Caratinga e Viçosa são as mais distantes e encontram-se isoladas em clados distintos, o que pode ser visualizado, observando-se o fenograma, obtido pelo método de “Neighbor-Joining”, através dos valores de F_{st} (FIGURA 10).

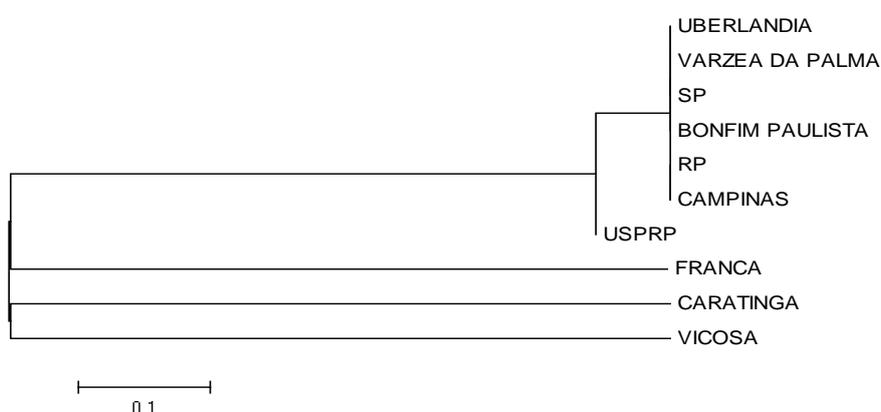


FIGURA 10: FENOGRAMA OBTIDO A PARTIR DOS VALORES DE F_{st} RELACIONANDO AS DEZ POPULAÇÕES DE *N. testaceicornis* ESTUDADAS

Porém observando-se os valores de P (tabela 13 valores acima da diagonal), verificamos que os valores de F_{st} para as populações de Franca (valores em azul) e Viçosa (valores em vermelho) não são significativos, ou seja, os valores de P mostram que não é possível diferenciar essas populações das demais, pois em todas as diferenças par a par $P > 0,05$, isso se deve, provavelmente, ao baixo número amostral dessas populações, pois este teste leva em consideração o tamanho amostral, assim para confirmarmos as distâncias entre as mesmas calculadas pelo F_{st} seria necessário ampliar o número amostral nessas populações.

Os resultados para a análise de estrutura genética de populações, obtidos através da AMOVA (TABELA 14), mostraram que grande parte da diversidade haplotípica

é encontrada entre as populações (63,84%) e que dentro de cada população temos uma diversidade de 36,16, sendo esse valor influenciado, principalmente, pela população do *campus* da USPRP, pois foi a população onde obtivemos o maior número de haplótipos e o maior número amostral, pois segundo EXCOFFIER *et al.*(1992) a AMOVA é uma análise que calcula os índices da estrutura genética usando informações sobre o conteúdo alélico dos haplótipos, bem como suas frequências. Com relação ao valor obtido de *Fst* (0,63840), assim como o valor de *P* (0,00006, ou seja $P < 0,05$), conclui-se que a probabilidade de que dois haplótipos, tirados ao acaso de uma população, sejam correlacionados, não é maior que 63,84%, sendo valor um indicativo de estruturação populacional.

TABELA 14: RESULTADO DA ANÁLISE HIERÁRQUICA DE VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) EM *N. testaceicornis*. *P*: Probabilidade de se obter um valor de *Fst* maior que o esperado

Componente da Variância	Variância	% do total	<i>P</i>	<i>Fst</i>
Interpopulacional	0,10647	63,84	0,00006	0,63840
Intrapopulacional	0,06031	36,16		

Tendo em vista o baixo número de haplótipos encontrados, o compartilhamento do haplótipos H01 pela maioria das populações, sendo esse muitas vezes exclusivo de determinada população, a baixa frequência de haplótipos exclusivos, o teste exato e a análise por AMOVA, verificamos que as populações de Caratinga e Viçosa são as que mais se diferenciam das outras populações, estando estas muito relacionadas formando apenas um grupo. Dando-nos uma visão de que as populações estão estruturadas em três grupos, assim, realizamos uma nova AMOVA, agora estruturando as populações em 3 grupos: Grupo 1: USPRP, Ribeirão Preto, Campinas, Franca, Bonfim Paulista, São Paulo, Uberlândia e Várzea da Palma; Grupo 2: Caratinga; Grupo 3: Viçosa, sendo essa estruturação baseada nos valores obtidos de *P* e também da variação nucleotídica entre os haplótipos. Os resultados dessa nova AMOVA são mostrados na tabela 15, onde podemos observar a significância dessa estruturação.

TABELA 15: RESULTADO DA ANÁLISE HIERÁRQUICA DE VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) EM *N. testaceicornis* COM ESTRUTURAÇÃO EM 3 GRUPOS. P: Probabilidade de se obter um valor de *Fst* maior que o esperado

Componente da Variância	Variância	% do total	P	Fst
Intergrupos	4,04821	98,13	0,01760	0,98566
Intragrupos	0,05914	1,43		

Os resultados obtidos nesse estudo nos levam a inferir que a estruturação observada nas populações de *N. testaceicornis* dividindo as populações de Caratinga e Viçosa em dois grupos, é, provavelmente, resultado de refúgios recentes (Pleistoceno Final e Holoceno) estando ligada às barreiras geográficas formadas pelo complexo da Serra do Espinhaço, que isolou as populações de Viçosa e Caratinga possibilitando o surgimento e a fixação de mutações isoladas e levando a formação de haplótipos exclusivos. A idéia que embasa a Teoria dos Refúgios é que com as flutuações climáticas da passagem para uma fase mais seca e fria durante o Pleistoceno terminal, a biota de florestas tropicais ficou retraída às exíguas áreas de permanência da umidade, a constituir os refúgios e sofrer, portanto, diferenciação resultante deste isolamento. A expansão destas manchas florestadas tropicais, em consequência da retomada da umidade do tipo climático que se impôs ao final do período seco e mais frio, deixou setores de maior diversidade e endemismos como evidência dos refúgios que atuaram no Pleistoceno terminal (SILVA & PASSOS, 2009). Sugerimos que estudos que envolvam mais populações de *N. testaceicornis* dessa região fazem-se necessários, amostrando-se populações mais próximas para que se possa ter a chance de verificar haplótipos intermediários e compartilhamento de haplótipos, possibilitando assim um entendimento sobre o processo de colonização e expansão da espécie nessa região. Segundo BATALHA FILHO (2008) mesmo barreiras geográficas com pequenas extensões podem atuar muito bem como barreiras de fluxo gênico para meliponíneos, o que é explicado, segundo NOGUEIRA-NETO (1954) pelo fato de o estabelecimento de novos ninhos ocorrer em pequenas distâncias, pois a colônia filha depende de alimento e operárias da colônia mãe até o seu estabelecimento.

Quanto ao único grupo, formado pelas populações do *campus* da USPRP, Ribeirão Preto, Campinas, Franca, Bonfim Paulista, São Paulo, Uberlândia e Várzea da Palma, a baixa diversidade nucleotídica e haplotípica, a distância genética entre as mesmas elucidadas pelo *Fst* e o fato de termos populações distantes geograficamente compartilhando o mesmo haplótipo evidenciam gargalos populacionais seguidos de expansão demográfica. Poderíamos pensar, como foi observado por FRANCISCO (2002) em populações de *P. remota*, que a ação antrópica de remoção e deslocamento de colônias, poderia ser a causadora desse compartilhamento de haplótipos por populações muito distantes, essa hipótese não é totalmente descartada, mas é remota, pois essa abelha não é muito visada comercialmente por meliponicultores por produzir uma pequena quantidade de mel, apenas mais recentemente ela tem sido utilizada em estudos para verificação da sua eficiência como polinizador. Portanto, acreditamos que havia fluxo gênico entre essas populações no passado, anterior a glaciação do Pleistoceno.

Os resultados da distribuição dos haplótipos entre as populações nos leva a incluir *N. testaceicornis* na Categoria Filogeográfica III, determinada por AVISE (1994). Nessa categoria a maioria dos haplótipos são estreitamente relacionados (visto os baixos valores de *d* na tabela 12), ainda que isolados geograficamente. A explicação mais provável para tal padrão envolve fluxo gênico historicamente limitado entre populações em espécies não subdivididas por barreiras duradouras à dispersão. Portanto, mutações recentes estariam confinadas a subgrupos na distribuição da espécie.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo é o primeiro a avaliar a estrutura genética populacional da espécie *N. testaceicornis* no Brasil tanto com marcadores RFLP quanto utilizando sequências do mtDNA. Os resultados aqui produzidos são um ponto inicial para futuros estudos sobre a história demográfica, o padrão de dispersão, o efeito das mudanças ambientais e a evolução das populações de *N. testaceicornis* no Brasil. Compreender os padrões filogeográficos e avaliar as populações das abelhas sem ferrão é de extrema necessidade e importância devido, principalmente, ao seu importante papel na manutenção da biodiversidade atuando como polinizadora da flora brasileira.

Em relação aos resultados obtidos neste estudo foi possível concluir que:

- O *campus* da USPRP é um ótimo banco de germoplasma;
- A técnica de PCR-RFLP não foi sensível o bastante para detectar o baixo polimorfismo presente nas populações estudadas;
- A metodologia de sequenciamento é a mais viável visto que cortes frequentes não foram detectados em *Nannotrigona testaceicornis*;
- Ampliaram-se as informações quanto ao genoma de meliponíneos, formando-se um banco de sequências para futuros estudos;
- Foram identificados 05 haplótipos nas populações estudadas, sendo que destes um haplótipo (H01) foi compartilhado pela maioria das populações (70%) e três destes haplótipos: H03, H04 e H05, eram haplótipos exclusivos das populações do *campus* da USPRP, Caratinga e Viçosa, respectivamente;
- Há uma baixa diversidade haplotípica e nucleotídica nas populações estudadas consequentemente uma pequena distância e diferenciação entre as mesmas;
- Os dados moleculares nos fazem concluir que as 10 populações de *N. testaceicornis* estudadas, estão estruturadas em 3 grupos, sendo tal estruturação explicada por eventos antigos em consequência de mudanças climáticas devido às glaciações do Pleistoceno levando a um gargalo populacional e posterior dispersão, juntamente com a barreira geográfica do

mosaico de montanhas do complexo da “Serra do Espinhaço” que isolou as populações de Viçosa e Caratinga levando à diferenciação das mesmas;

- Os nossos resultados são importantes para se projetar modelos de dispersão e distribuição das abelhas sem ferrão.

6. REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. (1990). **Basic local alignment search tool.** *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- ARIAS, M. C.; [FRANCISCO, F. O.](#); SILVESTRE, D. (2003) **O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos.** *Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure, Brasil* 305-309.
- ARIAS, M. C.; SHEPPARD, W. S. (1996) **Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence.** *Molecular Phylogenetics and Evolution* **5**:557-566.
- ARIAS, M. C.; [SOARES, A. E. E.](#); [NÓBREGA, F. G.](#) (1990) **Improvements to the mitochondrial restriction maps for Italian and Africanized honey bees.** *Revista Brasileira de Genética* **13**:501-507.
- ARIAS, M. C.; TINGEK, S.; KELITU, A.; SHEPPARD, W. S. (1996) ***Apis nuluensis* Tingek, Koeniger and Koeniger, 1996 and its genetic relationship with sympatric species inferred from DNA sequences.** *Apidologie* **27**: 415-422.
- AVISE, J. C. (2000) **Phylogeography. The history and formation of species.** *Harvard university Press, Boston.*
- AVISE, J. C. (1994). **Molecular markers, natural history and evolution.** *Chapman and Hall, NY, USA*
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. (1987). **Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics.** *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 489-522.

- BATALHA FILHO, H. (2008). **Distribuição geográfica, filogeográfica e história evolutiva da abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae)**. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG.
- BOORE, J. L. (1999). **Animal Mitochondrial Genomes**. *Nucleic Acids Researches* **27**: 1767-1780.
- BRITO, R. M. (2005). **Análise molecular e populacional de *Partamona mulata* (Moure in Camargo, 1980) e *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- BRITO, R. M.; ARIAS, M. C. (2005) **Mitochondrial DNA characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by PCR+RFLP and sequencing**. *Apidologie* **36**: 431-437.
- CAMARGO, J. M. F. & PEDRO, S. R. M. (2007) *in*: MOURE, J. S.; URBAN, D.; MELO, G. A. R. **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia. pp 272; 407-411.
- CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. (1992). **Systematic, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review**. *Apidologie* **23**: 509-522.
- CAMARGO, J. M. F. (1989). **Comentários sobre a sistemática de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae)**. *In*: Anais do XIV Simp. Anual da ACIESP. **68** (suppl.): 41-61.
- CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. (2000). **TCS: a computer program to estimate gene genealogies**. *Molecular Ecology* **9** (10): 1657-1660.

- CORNUET, J. M.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M. (1991). **Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* of mitochondrial DNA.** *Genetics* **128**: 393-403.
- CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D. W.; DOLLIN, A.; HEARD, T.; AGUILAR, I.B.; VENTURIERI, G.; EARDLEY, C.; NOGUEIRA-NETO, P. (2006). **Global meliponiculture: challenges and opportunities.** *Apidologie* **37**(2): 275-292.
- DE LA RÚA, P.; GALIÁN, J.; SERRANO, J.; MORITZ, R. F. A. (2001) **Molecular characterization and popular structure of the honeybees from the Balearic islands (Spain).** *Apidologie* **32**: 417-427.
- EIZIRIK, E. (1996). **Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de Unidades Evolutivamente Significativas.** *Revista Brasileira de Genética* **19** (Suplemento): 23-29.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. (2007). **Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis.** *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47-50.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. (1992) **Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes—application to human mitochondrial DNA restriction data.** *Genetics* **131**:479–491.
- FERNANDES-SALOMÃO, T. M.; MURO-ABAD, J. I.; CAMPOS, L. A. O.; ARAÚJO, E. F. (2002) **Mitochondrial and nuclear DNA characterization in the *Melipona* species (Hymenoptera, Meliponini) by RFLP analysis.** *Hereditas* **137**: 229-233.

- FRANCISCO, F. O.; ARIAS, M. C. (2009). **Inferences of evolutionary and ecological events that influenced the population structure of *Plebeia remota*, a stingless bee from Brazil.** *Apidologie Online*: DOI: 10.1051/apido/2009079. Disponível em: <www.apidologie.org>.
- FRANCISCO F.O. (2002). **Diversidade genética de populações da abelha sem ferrão *Plebeia remota*: análise do DNA mitocondrial e microssatélites.** Tese de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- FRANCISCO F.O.; SILVESTRE D.; ARIAS M.C. (2001). **Mitochondrial DNA characterization of five species of *Plebeia* (Apidae: Meliponinae): RFLP and restriction maps.** *Apidologie* **32**, 323–332.
- FRANCO, F. F. (2009). **História evolutiva do “cluster” *Drosophila buzzatii* (grupo *D. repleta*): eventos históricos e diversificação de espécies no Brasil.** Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Genética da FMRP-USP.
- FRANCK, P.; GARNERY, L.; CELEBRANO, G.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J.-M. (2000) **Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*).** *Mol. Ecol.* **9**: 907-921.
- FREITAS, G. S. (2001). **Levantamento de ninhos de meliponíneos (Hymenoptera, Apidae) em área urbana: Campus da USP, Ribeirão Preto/SP.** Dissertação de mestrado apresentada a FFCLRP-USP.
- GRIMALDI, D.; ENGEL, M.S. (2005). **Evolution of the Insects.** *Cambridge University Press*, Cambridge.

- HALL, H. G.; SMITH, D. R. (1991). **Distinguishing African and European honeybee matriline using amplified mitochondria DNA.** *P.N.A.S.* **88**: 4248-4552.
- HALL, T. A. (2005). **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- HARRYS, H. (1966). **Ezyme polimorphisms in man.** *Proceedings of the Royal Society of London B* **164**: 298-310.
- HARTL, D. L. & CLARK, A. G. (2007). **Principles of Population Genetics. Fourth Edition.** *Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.* 652p.
- HARTL, D.L. (1981). **A Primers of Population Genetics.** *Sunderlanf, MA: Sinauer Associates, Inc.* 58p.
- HUBBY, J. L. & LEWONTIN, R. C. (1966). **A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*.** *Genetics* **54**: 577-594.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; CRUZ-LANDIM C.; MORAES, R. L. M. S.; ZUCCHI, R. (1994). **Dwarf queens in *Nannotrigona testaceicornis*.** In: INT. CONG. IUSSI, 12, Paris, *Abstracts* p. 442.
- KERR, W. E. (1996). **Biologia e manejo da Tiúba: A abelha do Maranhão.** EDUFMA, São Luiz.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. (1996). **Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação.** Fundação Acangau, Belo Horizonte. 143 p.

- KERR, W. E.; SAKAGAMI, S. F.; ZUCCHI, R.; ARAÚJO, V. P.; CAMARGO, J. M. F. (1967). **Observações sobre a arquitetura dos ninhos e comportamento de algumas espécies de abelhas sem ferrão das vizinhanças de Manaus, Amazonas (Hymenoptera, Apoidea).** *Atas do Simp. Biota Amazôn., Zool.* **5**: 255.
- LINDAUER, M.; KERR, W.E. (1960). **Communication between the workers of stingless bees.** *Bee World* **41**: 29-41 & 65-71.
- LORENZON, M. C. A.; BANDEIRA, A. G.; AQUINO, H. M.; MARACAJÁ-FILHO, N. (1999). **Relationship between *Partamona* (Hymenoptera, Apidae) and *Constrictotermes* (Isoptera, Termitidae) in the semiarid region of Paraíba State, Brazil.** *Rev. Nord. Biol.* **13(1/2)**: 61-68.
- MAETA, Y.; TEZUKA, T.; NADANO, H.; SUZUKI, K. (1992). **Utilization of the Brazilian stingless bee, *Nannotrigona testaceicornis*, as a pollinator of strawberries.** *Honeybee Sci.* **13**: 71-78.
- MALAGODI-BRAGA, K. S.; KLEINERT, A. M. P. (2004). **Could *Tetragonisca angustula* Latreille (Apinae, Meliponini) be used as strawberry pollinator in greenhouses?** *Australian Journal of Agricultural Research* **55(7)**: 771-773.
- MARTINS, C. G. M.; MARIA, C. A. L.; BAPTISTA, J. L. (1999). **Eficiência de tipos de polinização em acerola.** *Caatinga* **12 (1/2)**: 55-59.
- MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. S. (2001). **Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos.** *In: Biologia Molecular e Evolução.* Holos Editora. Ribeirão Preto. pp 153-181.
- MCGINNIS, S.; MADDEN, T. L. (2004) **BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools.** *Nucleic Acids Res.* **32**: W20-W25.

- MEIXNER, M. D.; ARIAS, M. C.; SHEPPARD, W. S. (2000) **Mitochondrial DNA polymorphisms in honey bee subspecies from Kenya.** *Apidologie* **31**: 181-190.
- MELO, G. A. R. (1999). **Phylogenetic relationships and classification of the major lineages of Apoidea (Hymenoptera), with emphasis on the Crabronid wasps.** Scientific Papers of the Natural History Museum of the University of Kansas **14**: 1-55.
- MICHENER, C. D. (2007). **The bees of the world.** *The Johns Hopkins University Press, Baltimore.*
- MICHENER, C. D. (2000). **The bees of the world.** *The John Hopkins University Press, Baltimore.*
- MICHENER, C. D. (1990). **Classification of the Apidae (Hymenoptera).** *University of Kansas Sci. Bull.* **54(4)**: 75-164.
- Michener, C. D.; Grimaldi, D. A. (1988). **A *Trigona* from Late Cretaceous amber of New Jersey.** *American Museum Novitates* **2917**: 1-10
- MONTEIRO, W. R. (2001), **Meliponicultura – abelha Irai (*Nannotrigona testaceicornis*).** *Mensagem Doce* **60**.
- MORESCO, A. R. C. (2009) **Análise populacional *Melipona marginata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de RFLP do DNA mitocondrial e microssatélites.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, USP, São Paulo, Brasil.
- MORETTO, G.; ARIAS, M. C. (2005). **Detection of mitochondrial DNA restriction site differences between the subspecies of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini).** *Neotropical Entomol.* **34**: 381-385.

- MOURE, J. S.; URBAN, D.; MELO, G. A. R. (2007). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia. 1058p.
- MOURE, J. M. (1961). **A preliminary supra-specific classification of the old world Meliponinae bees (Hymenoptera, Apoidea)**. *Studia Entomol.* **4** (1-40): 181-242.
- NEI, M. (1977). **F-statistics an Analysis of Gene diversity in subdivided populations**. *Annals of Human Genetics* **41**: 225-233.
- NOGUEIRA-NETO, P. (1997). **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. Editora Nogueirapis, São Paulo.
- NOGUEIRA-NETO, P. (1970). **A criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae)**. Editora Chácaras e Quintais, São Paulo.
- POINAR JR, G. O.; DANFORTH, B. N. (2006). **A Fossil Bee from Early Cretaceous Burmese Amber**. *Science* **314**: 614.
- RIBEIRO, A. DE M. F. (2004). **Polinização entomófila em cultivares híbridos de pepino (*Cucumis sativus* L.): pioneiro, safira e yoshinarim no campo e em estufa. Jaboticabal/SP**. Tese de doutoramento apresentada à Universidade Estadual Paulista. 77p.
- ROSELINO, A. C.; BEGO, L. R.; SANTOS, S. A. B. (2004). **Pollination of strawberry *Fragaria X Anassa* var. Camarosa, by *Scaptotrigona* aff *depili* and *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera, Meliponini)**. Proceedings of the 8th IBRA International Conference on Tropical Bees and VI Encontro sobre Abelhas. 670p

- ROZAS, J.; LIBRADO, P. (2009). **DnaSP v5. A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.** *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.
- SAKAGAMI, S. F. (1982). **Stingless bees.** In: HERMANN, H. R. *Social Insects*. New York, Academic Press. **3(4)**: 361-423.
- SIHANUNTAVONG, D.; SITTIPRANEED, S.; KLINBUNGA, S. (1999). **Mitochondrial DNA diversity and population structure of the honey bee (*Apis cerana*) in Thailand.** *J. Apic. Res.* **38**: 211-219.
- SILVA, P. A. H; PASSOS, E. (2009). **A teoria dos refúgios florestais: distribuição e evolução das paisagens ao fim do pleistoceno.** *Geografar* Revista eletrônica do programa de Pós-graduação em Geografia da Universidade Federal do Paraná. Disponível em: <www.ser.ufpr.br/geografar>
- SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. (2002). **Abelhas Brasileiras, Sistemática e Identificação.** Belo Horizonte: Silveira. 251 pp.
- SILVESTRE D. (2002). **Sequenciamento e análise do genoma mitocondrial de *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).** Tese de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- SILVESTRE, D.; WEINLICH, R.; FRANCISCO, F. O.; ARIAS, M. C. (1999) **Clonagem e seqüenciamento de regiões do genoma mitocondrial de *Melipona bicolor*.** *Genetics and Molecular Biology (Programa e caderno de resumos)* **22**:178.
- SIMON, C.; FRATI, F.; BECKNBACH, A.; CRESPI,, B.; LIU, H.; FLOOK, P. (1994). **Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction *primers*.** *Annals Entomol. Soc. Am.* **87**: 651-701.

- SMITH, T. B. & WAYNE, R. K. (1996). **Molecular Genetic Approaches in Conservation**. Oxford University Press, New York. 483p.
- TAJIMA, F. (1989) **Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism**. *Genetics* **123**: 585–595.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. (2007). **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0**. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599.
- TORRES, R. R.; ARIAS, M. C.; MORETTO, G. (2009). **Mitochondrial DNA polymorphism among populations of *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* Leéletier (Apidae: Meliponini) from Southern Brazil**. *Neotropical Entomology* **38**: 208-212.
- WEINLICH, R.; FRANCISCO, F. O.; ARIAS, M. C. (2004). **Mitochondrial DNA restriction and genomic maps of seven species of *Melipona* (Apidae: Meliponini)**. *Apidologie* **35**: 365-370.
- WEINLICH, R.; FRANCISCO, F. O. SILVESTRE, D.; ARIAS, M. C. (1999). **Análise do genoma mitocondrial e caracterização de espécies do gênero *Melipona***. *Genetics and Molecular Biology (Programa e caderno de resumos)* **22**: 184.
- WILLE, A. (1983) **Biology of the stingless bees**. *Ann. Rev. Entomol.* **28**: 41-64.
- WOLSTENHOLME, J. (1992) In: **Human Cytogenetics: a Practical Approach** (DE Rooney, BH Czepulkowski eds), Vol. 1, 2nd edn, pp. 1–30. IRL Press, Oxford.
- WRIGHT, S. (1965). **The Interpretation of Population Structure by F-statistics with Special Regard to Systems of Mating**. *Evolution* **19**: 395-420.

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](#)