CAMILLA VALENTE PIRES

FILOGENIA DE ESPÉCIES *MELIPONA* DO COMPLEXO *RUFIVENTRIS*, COM BASE EM SEQUÊNCIAS DE DNA MITOCONDRIAL

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

CAMILLA VALENTE PIRES

FILOGENIA DE ESPÉCIES *MELIPONA* DO COMPLEXO *RUFIVENTRIS*, COM BASE EM SEQUÊNCIAS DE DNA MITOCONDRIAL

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

Aprovada em: 22 de fevereiro de 2010.

Profª. Mara Garcia Tavares	Prof. Luiz Orlando de Oliveira
Profª. Karla Suemy Clemente Yotoko (Co-Orientador)	Prof. Lúcio Antônio de Oliveira Campos (Co-Orientador)

Profª Tânia Maria Fernandes Salomão
(Orientadora)

“Não importa o grau a que chegamos, o que importa é prosseguir decididamente” (Fil 2)

Ao Meu Deus.

Aos meus pais, Maria do Carmo e Mauri.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida e pela proteção e bênçãos concedidas.

Aos meus pais Maria do Carmo e Mauri, pelo amor incondicional, por todo apoio e incentivo em minha educação e por serem meus maiores exemplos de fé, coragem, humildade e perseverança.

Aos meus irmãos e familiares, pelo amor, amizade, companheirismo e por todos os momentos de alegria, mesmo quando estávamos tão distantes.

À minha orientadora, professora Tânia Maria Fernandes Salomão, pela orientação, apoio e incentivo desde 2004, pela competência, confiança e amizade e por ter contribuído para a minha formação pessoal e profissional.

Aos meus co-orientadores, professores Lúcio Antônio de Oliveira Campos e Karla Suemy Clemente Yotoko, pelas sugestões, pela amizade e atenção.

Aos membros da banca examinadora pelas críticas sempre construtivas, contribuições e sugestões para a melhoria desse trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e, particularmente, e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização deste trabalho e pela excelente formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de pesquisa no mestrado e pelo auxílio financeiro, indispensável para a realização deste trabalho.

Aos colegas e companheiros do Laboratório de Biologia Molecular e Celular do Departamento de Biologia Geral pela agradável convivência e auxílio nas atividades científicas, em especial a Marco Antônio, Denilce, Filipe, Dani, Ana Maria, Andréia, Marcília, Denise e Lívia.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFV, e aos colegas de curso, pelos importantes ensinamentos.

À Coordenação do curso de Genética e Melhoramento, pelo apoio.

Aos amigos da Biologia 2003, pela amizade, companheirismo e pela troca de ensinamentos que foram fundamentais para minha formação acadêmica.

Ao Bernardo, pelo apoio, incentivo e ajuda, pelo amor, carinho e compreensão, por sempre torcer pelo meu sucesso profissional e acreditar nos nossos sonhos.

As amigas-irmãs Nívea, Jana, Luana, Laris e Suelen pela amizade incondicional, carinho, atenção e apoio em todos esses anos de convivência.

Aos integrantes da grande família Bioprédio, vocês são a família que a UFV me proporcionou e a que eu escolhi. Obrigada pela simples, mas ao mesmo tempo intensa participação em minha vida, tornando-a tão especial.

Aos meus familiares, amigos, colegas e, enfim, a todos que contribuíram de alguma forma com a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

CAMILLA VALENTE PIRES, filha de Maria do Carmo Valente Pires e Mauri Francisco Pires, nasceu em Ubá, MG, no dia 15 de dezembro de 1983.

Em março de 2003 ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, e, em janeiro de 2008, graduou-se em Ciências Biológicas. Nesse mesmo ano iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento, nesta mesma Instituição.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS viii
RESUMO ix
ABSTRACT xi
INTRODUÇÃO 13
Abelhas sem ferrão 13
O Complexo rufiventris 15
Estudos filogenéticos com Hymenoptera 18
OBJETIVOS 23
MATERIAL E MÉTODOS 24
Material Genético 24
Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento 24
Alinhamento de sequências e Análises Filogenéticas 26
RESULTADOS 28
Variação nas sequências de DNA mitocondrial 28
Análises Filogenéticas 29
Redes de haplótipos 30
DISCUSSÃO 39
CONCLUSÕES 45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 46

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Mapa de distribuição geográfica das 17 localidades amostradas. O quadrado *branco indica a localidade onde foi amostrada M. mondury, os círculos brancos, M. rufiventris* e os círculos pretos, *Melipona* sp.. 26
Figura 2: Árvore obtida por Inferência Bayesiana (modelo GTR) para o gene *cyt*b e a região *COICOII* concatenados. Os clados estão com seus respectivos ramos destacados com cores diferentes. O clado destacado de amarelo contém *M. mondury* e de azul, *M. rufiventris*. Os clados destacados de vermelho (C1) e de verde (C2) foram formados por *Melipona* sp.. Grupo externo: *M. quadrifaciata* e *M. bicolor*. Os códigos dos haplótipos estão conforme Tabela 2. Os números entre parênteses representam o número de indivíduos por haplótipo. Os números nos ramos representam valores de bootstrap para máxima verossimilhança e de probabilidades Bayesianas *a posteriori*, respectivamente..... 33
Figura 3: Árvore obtida por Inferência Bayesiana utilizando o modelo GTR para o gene *cyt*b e a região *COICOII* concatenados. Os clados estão com seus ramos destacados com cores diferentes e nomeados de acordo com a identificação realizada pelo taxonomista. *M. mondury* (clado em amarelo), *M. rufiventris* (clado em azul), *M. flaovlineata* (clado em verde) *Melipona* sp. (clado em vermelho). Grupo externo: *M. quadrifaciata* e *M. bicolor*. Os códigos dos haplótipos estão conforme Tabela 2. O asterisco (*) indica os haplótipos que tiveram no mínimo um indivíduo identificado pelo taxonomista. Os números nos ramos representam valores de bootstrap para máxima verossimilhança e de probabilidades Bayesianas *a posteriori*, respectivamente..... 35
Figura 4: A: Árvore ilustrando a separação das abelhas analisadas em dois grupos. Grupo 1: sombreado escuro, e Grupo 2: sombreado claro. B: Disposição geográfica das abelhas incluídas em cada grupo. Os círculos indicam as localidades amostradas. As cores dentro dos círculos identificam os quatro clados: *M. mondury* (amarelo), *M. rufiventris* (azul), *Melipona* sp. (vermelho) e *M. flavolineata* (verde)..... 36
Figura 5: A: Mapa com distribuição geográfica dos haplótipos do grupo 1 (*Melipona* sp. e *M. flavolineata*,) conforme Figura 4. Os círculos pretos representam as localidades amostradas. Os círculos vermelhos representam haplótipos detectados em *Melipona* sp. e o verde em *M. flavolineata*. B: Rede de haplótipos em median-joining do grupo 1. Cada círculo compreende um haplótipo, o seu tamanho é proporcional a frequência de indivíduos. Cada traço na linha que conecta os haplótipos representa um passo mutacional. A codificação dos haplótipos está conforme Tabela 2. 37
Figura 6: A: Mapa com distribuição geográfica dos haplótipos do grupo 2 (*M. rufiventris* e *M. mondury*,) conforme Figura 4. Os círculos pretos representam as localidades amostradas. Os círculos azuis representam haplótipos detectados em *M. rufiventris* e os amarelos os detectados em *M. mondury*. B: Rede de haplótipos em median-joining do grupo 2. Cada círculo compreende um haplótipo e o seu tamanho é proporcional a frequência de indivíduos. Cada traço na linha que conecta os haplótipos representa um passo mutacional. A codificação dos haplótipos está conforme Tabela 2. 38

Tabela 1: Espécies amostradas e suas respectivas localidades, coordenadas geográficas (decimais) e número de colônias amostradas (N). 25
Tabela 2: Espécies, haplótipos identificados, números de indivíduos por haplótipos (n) e respectivas localidades onde foram amostrados. Os números entre parênteses são os números de indivíduos amostrados por localidade. 32
Tabela 3: Indivíduos analisados morfologicamente, procedência e respectiva identificação. 34

RESUMO

PIRES, Camilla Valente, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Filogenia de espécies *Melipona* do complexo *Rufiventris*, com base em sequências de DNA mitocondrial.** Orientador: Tânia Maria Fernandes Salomão. Co-orientadores: Karla Suemy Clemente Yotoko e Lúcio Antônio de Oliveira Campos.

O complexo de abelhas *rufiventris,* da tribo Meliponini*,* apresenta ampla distribuição no território nacional. Com uma extensa distribuição geográfica, é possível que este grupo de abelhas apresente ecótipos diferentes, adaptados a diferentes locais. A identificação de espécies do gênero *Melipona* por caracteres morfológicos não é fácil. Embora *M. mondury* e *M. rufiventris* tenha sido diferenciada morfologicamente por, o mesmo autor relata a observação de características de ambas as espécies em indivíduos de algumas localidades dos estados de Goiás, Maranhão, Ceará e Rio Grande do Norte. Trabalhos com diferentes técnicas moleculares (PCR-RFLP, PCR-RAPD, Microssatelite, PCR-ISSR, Isoenzimas e sequenciamento de DNAmt) mostraram que a maioria dos indivíduos do complexo *rufiventris* analisados (do noroeste de Minas ao Maranhão) não se inclui em nenhum dos padrões moleculares descritos para *M. rufiventris e M. mondury.* Estes indivíduos pertenceriam a uma nova espécie? Considerando a existência de questões ainda não resolvidas dentro do complexo *rufiventris*, propõe-se, no presente estudo, a utilização de ferramentas adicionais, como análises filogenéticas, que forneçam dados para uma discussão mais ampla a respeito da distribuição geográfica no território brasileiro, da diversidade genética e taxonomia de espécies deste complexo*.* Operárias de abelhas do complexo *rufiventris* foram amostradas em diferentes localidades dos estados de Minas Gerais, Goiás, Maranhão, Ceará, Piauí e Tocantins. O DNA total foi extraído, a região *COI*/*COII* do DNAmt dessas abelhas foram amplificadas, as sequências de DNA obtidas foram purificadas, clonadas, os plamídeos foram extraídos e os respectivos insertos foram sequenciados. O gene *cyt*b também do DNAmt, foi amplificado, os fragmentos de DNA foram purificados e diretamente sequenciados. As sequências foram editadas e alinhadas utilizando softwares apropriados. Em seguida as sequências obtidas foram concatenadas, haplótipos foram identificados e analisados filogeneticamente. Árvores filogenéticas foram

construídas por máxima verossimilhança e inferência bayesiana. Para melhor detalhamento dos resultados, redes de haplótipos foram construídas com base nas sequências de DNA obtidas. As relações filogenéticas inferidas resultaram em uma árvore com quatro clados bem definidos: *M. mondury*, *M. rufiventris*, *M. flavolineata* e *Melipona* sp., formando dois grupos de espécies irmãs: *M. mondury* e *M. rufiventris*, e *M. flavolineata* e *Melipona* sp.. As redes de haplótipos obtidas sugerem que o ancestral do grupo formado por *M. flavolineata* e *Melipona* sp. viveu em uma região entre os estados do Maranhão, Piauí e Ceará e que parece existir algum evento influenciando a separação dos haplótipos identificados no clado *M. rufiventris* dentro da área de amostragem. Os resultados obtidos neste estudo sugerem, também, a existência de uma espécie pertencente ao complexo *rufiventris* ainda não descrita (*Melipona* sp.) e com ampla distribuição geográfica. Estudos mais detalhados são necessários visando elucidar questões não respondidas no presente estudo, dentre outras.

ABSTRACT

PIRES, Camilla Valente, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2010. **Mitochondrial DNA sequence-based phylogeny of *Melipona* honeybee *Rufiventris* complex.** Adviser: Tânia Maria Fernandes Salomão. Co-advisers: Karla Suemy Clemente Yotoko and Lúcio Antônio de Oliveira Campos.

The *rufiventris* bee complex, tribe Meliponini, is widely distributed within the Brazil. With an extensive geographic distribution, this group may present different ecotypes adapted to different locations. The identification of species of the genus *Melipona* by morphological characters is not easy. Reported some morphological differences between *M. mondury* and *M. rufiventris*, however in individuals of some locations (Goiás, Maranhão, Ceará and Rio Grande do Norte), were found characters of both species. Studies with different molecular techniques (PCR-RFLP, PCR-RAPD, microsatellites, ISSR-PCR, Isoenzyme and mtDNA sequencing) showed that most individuals of *rufiventris* complex examined (north-west of Minas to Maranhão) is not included in any of the patterns described for *M. rufiventris* and *M. mondury*. Do these individuals belong to a new specie? Due to the problems related with this genus, it was proposed the use of new tools that provide useful data for a wider discussion about the geographical distribution in the brazilian territory, genetic diversity and taxonomy of the *rufiventris*. Thus, evaluating *rufiventris* complex species based on phylogenetic analysis can help to better understand taxonomic issues that still remain unsolved. Worker honeybees of the *rufiventris* complex were sampled in different locations of the states of Minas Gerais, Goiás, Maranhão, Ceará, Piauí and Tocantins. Total DNA was extracted, the *COI*/*COII* region of mtDNA of these bees were amplified, purified, and the cloned vectors were extracted and sequenced. The *cyt*b gene of mtDNA was also amplified, purified and sequenced. The sequences were edited and aligned using appropriate softwares. After, the sequences of both genes were concatenated generating haplotypes and these were phylogenetically analyzed, generating trees. These trees were constructed by maximum likelihood and Bayesian inference. In addition, a network of haplotypes was obtained for more detail of the results. The inferred phylogenetic relationships resulted in a tree with four well-defined clades: *M. mondury*, *M. rufiventris*, *M. flavolineata* and *Melipona* sp., forming

two groups of sister species: *M. mondury* and *M. rufiventris*, *M. flavolineata* and *Melipona* sp.. The haplotypes networks obtained suggest that the ancestor of the group formed by *M. flavolineata* and *Melipona* sp. lived in the region between the states of Maranhão, Piauí and Ceará and there is some event influencing the separation of the haplotypes identified in the *M. rufiventris* clade within the sampling area. The results of this present study also suggest the existence of a specie, still undescribed (*Melipona sp.*), belonging to the *rufiventris* complex which presents a wide geographical distribution. More detailed studies are needed to elucidate unsolved questions in the present study, among others.

INTRODUÇÃO

Abelhas sem ferrão

O principal grupo de polinizadores de plantas, em diversos ecossistemas, são as abelhas (Bawa, 1990; Neff & Simpson, 1993), pois são inteiramente dependentes das flores para a obtenção de recursos alimentares.

As relações entre plantas produtoras de flores, Angiospermas, e abelhas baseiam-se em um sistema de dependência recíproca, onde as plantas fornecem o alimento para as abelhas, pólen e néctar, e em troca recebem os benefícios da transferência de pólen entre indivíduos da mesma espécie (Kevan & Baker, 1983; Proctor *et al*., 1996). Assim, elas contribuem para a perpetuação de espécies silvestres e para a manutenção do equilíbrio ecológico (LaSalle & Gauld, 1993).

É importante ressaltar que as abelhas podem, ainda, promover o cruzamento entre plantas separadas por grandes distâncias, quando carregam o pólen de uma região para outra. Isto garante a manutenção do ciclo de reprodução sexuada das plantas e, consequentemente, a disponibilidade de alimento para outros animais.

Dentre os diversos grupos de abelhas encontra-se a Tribo Meliponini. Os meliponíneos estão distribuídos nas regiões tropicais do mundo e também nas regiões subtropicais do hemisfério sul, nas Américas do Sul e Central, Ásia, Ilhas do Pacífico, Austrália, Nova Guiné e África (Camargo & Pedro, 1992; Michener, 2000), sendo o Brasil um dos principais locais de ocorrência dessas abelhas (Velthuis, 1997; Camargo & Pedro, 1992).

Meliponini inclui 50 gêneros e mais de 400 espécies conhecidas. Dentre estes gêneros, *Melipona* é o que apresenta maior número de espécies conhecidas, cerca de 70, com ocorrência em toda a região neotropical, distribuindo-se desde o México até Misiones, na Argentina, com uma maior diversificação na bacia amazônica (Silveira *et al*., 2002; Camargo & Pedro, 2007).

Apesar da importância ecológica e econômica dos meliponíneos em geral, algumas espécies vem sofrendo redução populacional. A redução da diversidade de abelhas pode ser acompanhada pela perda de muitas espécies de plantas que dependem delas para polinização (La Salle & Gauld, 1993).

Entre as causas da redução populacional dos meliponíneos, tem-se a destruição dos ambientes naturais. Estas abelhas formam um grupo isolado e muito especializado, cujos indivíduos dependem das características climáticas e florísticas de suas regiões de origem, sendo consideradas muito frágeis quando expostas à destruição de seus habitats. Além disso, a maioria das espécies nidifica em ocos de árvores que estão sendo destruídas com o aumento do desmatamento, o uso indiscriminado de agrotóxicos e a ação predatória de meleiros, que derrubam árvores mais velhas, as quais são as mais prováveis de serem utilizadas pelas abelhas para nidificação, para obter o mel, deixando o ninho aberto e exposto à ação de predadores (Campos, 1998; Kerr *et al.*, 1999). Além disso, a transformação de grande área de florestas em pequenas capoeiras pode representar limitações ao desenvolvimento das populações, como diminuição de locais para nidificação e redução na disponibilidade de alimentos (Viana & Melo, 1987).

Outra questão a considerar é que com a degradação ambiental, o número de colônias de Meliponini na mesma área de reprodução torna-se menor do que na área original (Menezes *et al.*, 1993; Kerr, 1994). Quando o tamanho da população se torna inferior a 44 colônias pode haver aumento na endogamia, fenômeno o qual é nocivo em Hymenopteros que apresentam determinação de sexo por CSD (complementary sex determiner), ou seja, para ser fêmea, uma abelha tem de nascer com dois alelos diferentes de um gene chamado *csd* (determinador complementar do sexo), o macho só precisa de uma ou, eventualmente, duas cópias do mesmo alelo desse gene (Beye, *et al.,* 2003). Assim, o aumento da endogamia pode acarretar no aparecimento de machos diplóides que, em geral, são estéreis, quase cegos, com número de espermatozóides reduzido. Estes machos diplóides podem, também, ser mortos pelas operárias ao emergirem dos favos, em *Melipona*, ou serem comidos pelas operárias antes de três dias de idade larval, em *Apis mellifera* (Kerr *et al.*, 1996).

Complexo rufiventris

O complexo *rufiventris*, que pertence à tribo Meliponini, apresenta ampla distribuição no território nacional. Atualmente seis espécies são reconhecidas: *Melipona rufiventris*, encontrada em Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e São Paulo; *M. flavolineata*, no Amazonas, Maranhão, Pará e Tocantins; *M. brachychaeta* no Mato Grosso; *M. paraensis* no Amapá e Pará; *M. dubia* no Acre, Amazonas e Rondônia; e *M. mondury* em Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo, Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina (Silveira *et al*., 2002; Melo, 2003).

Com esta extensa distribuição geográfica o complexo *rufiventris* está exposto a várias condições ambientais. Isto implica na possibilidade deste grupo apresentar ecótipos diferentes, adaptados a diferentes locais. De fato, já foram observadas variações morfológicas no padrão de coloração das cerdas corbiculares e tíbias em indivíduos de *M. rufiventris* de diferentes regiões geográficas (Moure & Kerr, 1950; Moure 1975). Esta variação é consequência de diferenças específicas. Desta forma, pode-se dizer que mais de uma espécie estava sendo considerada *M. rufiventris*.

Com base em diferenças morfológicas existentes entre indivíduos de *M. rufiventris* encontrado em regiões do cerrado e de mata Atlântica, Melo (2003) reconheceu como *M. rufiventris* a espécie encontrada no cerrado e a espécie encontrada nas regiões típicas de mata Atlântica foi reconhecida como *Melipona mondury*. Como exemplo das diferenças observadas, tem-se a presença de cerdas ao longo dos bordos anteriores e posteriores da tíbia posterior castanho-escuro, em *M. rufiventris*, castanho-amarelado em *M. mondury.* Além disso, o tamanho corporal é menor em *M. rufiventris*, dentre outros caracteres avaliados.

A separação de espécies do gênero *Melipona* por análise dos caracteres morfológicos não é fácil (Michener, 2000). Apesar de Melo (2003) ter destacado algumas diferenças morfológicas entre *M. mondury* e *M. rufiventris*, este autor observou indivíduos dos estados de Goiás (Teresina de Goiás), Maranhão (Urbano Santos), Ceará (Serra do Baturité, Viçosa do Ceará, Ubajara) e Rio Grande do Norte (Martins) com características de ambas as espécies, o que

mostra que a diferenciação de espécies do complexo *rufiventris*, com base em caracteres morfológicos, não é algo trivial.

Além dos estudos morfológicos relatados, as abelhas do complexo *rufiventris* têm sido também objetos de estudos utilizando ferramentas moleculares. Souza *et al.*(2003) compararam as técnicas de SSCP, DS-PCR e PCR-RFLP, para a detecção de variabilidade no gene mitocondrial 16S RNAr em populações de *M. rufiventris*. Segundo os autores, a técnica de PCR-RFLP foi a mais eficiente para detectar variabilidade entre as populações de *M. rufiventris* e *M. comprensis*, mas não dentro das populações de *M. rufiventris*.

Weinlich *et al.* (2004), caracterizaram, com base em análise de restrição, o genoma mitocondrial de sete espécies do gênero *Melipona* (*M. bicolor*, *M. compressipes*, *M. marginata*, *M. melanoventer*, *M. quadrifasciata*, *M. rufiventris* e *M. subnitida*). Mapas de restrição foram obtidos utilizando as técnicas RFLP e PCR-RFLP utilizando 15 enzimas de restrição. O número total de sítios mapeados variou de 12 a 19, indicando um alto nível de diversidade genética entre as espécies.

Barni *et al.* (2007) utilizaram a técnica de PCR-RFLP para identificar marcadores genéticos do DNA mitocondrial (DNAmt) que pudessem diferenciar *M. mondury* de *M. rufiventris*. As regiões ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6, COI, COII, COIII, ATPases, *cyt*b, 12S e 16S do RNAr foram amplificadas e digeridas com quatro enzimas de restrição (*Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, e *Hinf*I). Sítios *Eco*RI, *Eco*RV e *Hind*III polimórficos foram identificados permitindo a diferenciação entre *M. mondury* e *M. rufiventris.* Nenhum sítio de restrição foi detectado quando *Hinf*I foi utilizada. Os resultados deste estudo concordam com a classificação morfológica que *diferenciam M. mondury* de *M. rufiventris*.

Diversos estudos moleculares visando conhecer a diversidade genética de abelhas do complexo *rufiventris* foram e continuam sendo realizados por pesquisadores que integram o grupo de pesquisa do laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Utilizando sequências do DNAmt de *M. rufiventris* e de *M. mondury* procedentes, respectivamente, de regiões de mata e de cerrado do estado de Minas Gerais, Schetino (2005a) detectaram haplótipos mitocondriais que diferenciavam estas duas espécies. Outro estudo com base em marcadores do

DNA mitocondrial que também mostrou resultados semelhantes, foi o realizado por Schetino *et al.* (2005b) utilizando a técnica de RFLP com auxílio da enzima de restrição *Hind*III e sonda de DNA heteróloga (DNAmt de *Apis mellifera*).

Padrões moleculares distintos para *M. mondury* e *M. rufiventris* procedentes do estado de Minas Gerais foram também observados em estudos utilizando marcadores PCR-RAPD, microssatélites e isoenzimas (Tavares *et al*. 2007). Além disso, os resultados deste estudo mostraram que abelhas oriundas de Brasilândia de Minas-MG e Dom Bosco-MG consideradas, até então, *M. rufiventris*, apresentaram padrões diferentes daqueles observados para *M. mondury* e *M. rufiventris.*

Também estudando *M. mondury* e *M. rufiventris* do estado de Minas Gerais Guimarães-Dias *et al.* (2007) mostraram com base em padrões ISSR a formação de dois grupos geneticamente distintos entre indivíduos de Minas Gerais sendo um deles composto por *M. mondury* e o outro por *M. rufiventris*. Dentro do grupo de *M. rufiventris* houve a formação de dois subgrupos, um formado por colônias de Dom Bosco e Brasilândia de Minas, e o outro com colônias de Guimarânia, Patos de Minas e Patrocínio. Segundo os autores, a formação destes subgrupos sugere um possível isolamento das populações de Dom Bosco-MG e Brasilândia de Minas-MG das populações de *M. rufiventris.* Este possível isolamento foi relatado, também, nos estudos realizados por Tavares *et al*. 2007.

Silva *et al.* (2007) estudou abelhas do complexo *rufiventris* utilizando marcadores microssatálites, porém, a amostragem incluiu abelhas de outras localidades de Minas Gerais até então não avaliadas e de localidades de outros estados (Bahia, Goiás e Maranhão). Observa-se também neste estudo que as abelhas procedentes de Brasilândia de Minas-MG, de Dom Bosco-MG e de localidades do estado do Maranhão ficaram incluídas em um mesmo subgrupo dentro do grupo de *M. rufiventris*. Com base nos resultados obtidos, os autores sugeriram que as estratégias de conservação para as espécies do complexo *rufiventris* deverão levar em consideração estes diferentes padrões de agrupamento detectados, principalmente para o subgrupo formado pelas abelhas de Brasilândia de Minas-MG, de Dom Bosco-MG e do Maranhão

Com base nos resultados dos estudos realizados por Tavares *et al*. (2007), Guimarães-Dias *et al.* (2007) e Silva *et al.* (2007) fica evidente a

necessidade de investigar melhor este grupo de abelhas possivelmente isolado de *M. rufiventris*. Neste caso, uma possibilidade é a de realizar estudos filogenéticos visando obter conhecimentos que possam contribuir para a elucidação de questões taxonômicas e evolutivas deste grupo.

Estudos filogenéticos com Hymenoptera

As classificações biológicas, em geral, são construídas agrupando-se organismos que compartilham características similares, dessa forma, busca-se produzir estruturas que reflitam uma ordem hierárquica percebida na natureza. Mas muitas vezes estas características nem sempre podem estabelecer uma hierarquia.

As hipóteses filogenéticas permitem classificações que facilitam o avanço dos estudos em biologia comparada (morfologia, fisiologia, comportamento, ecologia e biologia evolutiva). Novas descobertas podem sugerir novas hipóteses sobre as relações evolutivas entre os organismos estudados e, consequentemente, novas classificações. Como as classificações biológicas são reflexos do que se conhece das relações de grupos de organismos em um dado momento, estudos mais amplos e com diversos organismos são recomendados para que estas classificações representem melhor a realidade (Amorim, 1997).

Com o advento da filogenia molecular, diversos marcadores genéticos como, por exemplo, DNA mitocondrial (DNAmt), DNA ribossômico (DNAr), sequências de DNA codificantes e não codificantes dentre outros têm sido utilizados para classificações de diferentes organismos (Caterino *et al*., 2000; Silvestre, 2002). O DNA mitocondrial animal tem sido muito útil neste tipo de estudo por ser de herança materna sem recombinação, por evoluir rapidamente e por ser altamente polimórfico (Avise *et al.,*1987). Os genes mitocondriais mais frequentemente utilizados são aqueles que codificam o citocromo c oxidase subunidade I (*COI*); Citocromo c oxidase subunidade II (*COII*); 18S, 16S e 12S DNAr; Citocromo b (*cyt*b) e Região Controle, que não é codificado (Caterino *et al*., 2000; Meyer & Zardoya, 2003).

Em abelhas, vários estudos utilizando filogenia molecular como ferramenta para avaliar a diversidade genética para inferir sobre taxonomia e questões evolutivas tem sido relatados.

Leys *et al*.(2000) estudou as relações filogenéticas de 22 subgêneros de *Xylocopa* analisando por máxima parcimônia e máxima verossimilhança sequências de dois genes mitocondriais, *cyt*b e *COI*. As análises resultaram na formação de três clados bem resolvidos, sendo um deles formado por subgêneros da América do Sul, outro pelos subgêneros *Xylocopa* s.s. e *Ctenoxylocopa* e o terceiro por subgêneros da Etiópia. Além disso, os autores investigaram se os eventos mais recentes de dispersão ou vicariância na Gondwana poderiam explicar a distribuição atual dos subgêneros e observaram que, apesar de alguns táxons apresentarem divergências de fragmentação na Gondwana, a maioria das divergências entre os grupos formados são muito recentes e podem não apoiar uma hipótese de vicariância.

Abelhas do gênero *Diadasia* (Hymenoptera:Apidae) também foram relacionadas filogeneticamente (Sipes & Wolf, 2001). Neste estudo foram avaliados os genes mitocondriais *COI*, *COII*, $tRNA^{Leu}$ e o gene nuclear EF1α e submetidos a análises de parcimônia. Uma das análises foi realizada utilizando as sequências *COI, COII,* $tRNA^{Leu}$ *e EF1α* separadamente e a outra utilizando as sequências concatenadas. Ambas as análises resultaram em hipóteses filogenéticas congruentes, as quais apoiaram o monofiletismo de *Diadasia*, mas não para os tradicionais subgêneros, como *Diadasia* s. str. que se mostrou parafilético em todas as análises.

No estudo realizado por Leys *et al.* (2002), 22 subgêneros de *Xylocopa* foram analisados filogeneticamente, utilizando sequências de genes nucleares (EF1α e PEPCK) e mitocondriais (*COI* e *Cyt*b, de Leys *et al*.,2000) combinado com dados de caracteres morfológicos. A análise contou também com um relógio molecular calibrado com fósseis de mamangavas. As relações filogenéticas inferidas mostraram que as principais divisões dessas abelhas ocorreram bem depois da separação da América do Sul e África, 100 milhões de anos atrás, mas antes de eventos importantes de fusão no Mioceno.

Em 2004, Michel-Salzat *et al*., investigaram relações genéticas de abelhas Euglossini utilizando sequências de DNA (16S, *COI*, *LwRh*, EF1α) e vários caracteres morfológicos. A combinação desses caracteres resultou em

uma filogenia bem resolvida para o grupo, que é o único dentro de curbiculadas que engloba abelhas não-sociais. Padrões evolutivos similares foram obtidos quando os dados morfológicos e moleculares foram analisados separadamente.

Objetivando ampliar os conhecimentos relacionados a diversificação das abelhas e da história de coevolução das abelhas e angiospermas, foi reconstruída a filogenia de abelhas em nível de família. Treze famílias foram analisadas utilizando sequências de cinco genes (EF1α, gene para RNA polimerase II, para rodopsina PV, genes para 28S e 18S RNAr) combinados com 109 caracteres morfológicos. A filogenia resultante incluiu linhagens de abelhas que são predominantemente hospedeiro-especialistas de plantas, sugerindo que a especificidade planta-hospedeiro é uma característica ancestral em abelhas (Danforth *et al.* 2006).

Ao verificar que foram obtidos poucos caracteres filogeneticamente informativos para reconstrução da filogenia de abelhas do gênero *Bombus* com base em morfologia, Cameron *et al*. (2007) analisaram sequências dos genes nucleares opsin, EF1α, Arginina quinase, PEPCK e do gene 16S mitocondrial, da maioria das espécies de *Bombus* (38 subgêneros) conhecidas e os resultados mostraram uma filogenia altamente resolvida e altamente suportada. Segundo os autores, a filogenia obtida forneceu uma base sólida para a reclassificação e conhecimentos evolutivos no gênero *Bombus*.

Dois genes mitocondriais, *COI* e *cyt*b, e dois nucleares, EFIα e CAD, foram utilizados para testar a monofilia da tribo Ctenoplectrini e suas relações com outros Apidae, além da sua história biogeográfica. A topologia da árvore filogenética obtida sugere que a origem Ctenoplectrini na África aconteceu no início do Eoceno e dispersou da África para a Ásia, em algum momento do Eoceno, 30 a 40 milhões de anos atrás. O clima seco e fresco no médio Mioceno coincide com a divergência de *Ctenoplectra bequaerti* da África Ocidental e *Ctenoplectra terminalis* do Oriente e África do Sul, talvez relacionado à fragmentação do cinturão equatorial de florestas Africanas (Schaefer & Renner, 2008).

Dentro de Meliponini, poucos trabalhos utilizando filogenia molecular foram realizados. Em 2003, Costa *et al.* avaliaram sequências do 16S DNAr mitocondrial de 34 espécies pertencentes a 22 gêneros de abelhas sem ferrão

empregando análises de parcimônia e máxima verossimilhança. Como grupo externo foram utilizadas 11 sequências de espécies de abelhas corbiculadas. O objetivo do estudo era investigar as relações filogenéticas entre os gêneros de Meliponini. Dentre os resultados obtidos, quatro clados principais foram definidos na árvore de consenso parcimônia. O gênero Africano *Hypotrigona* foi definido como o ramo mais ancestral na tribo, seguido por *Austroplebeia* como o grupo de irmãos de outros dois clados.

Rasmussen & Cameron (2007) examinaram as relações inter e intra genética da tribo Meliponini no Velho Mundo utilizando sequências 16S DNAr mitocondrial e sequências de DNA nuclear (opsin, EF1α e arginina quinase) para análises filogenéticas. Os resultados constituem em um novo quadro para uma classificação que precisa ser revista e que está em curso para investigações biológicas de meliponíneos.

Esta classificação foi revista também por Rasmussen & Cameron (2010). Além de uma filogenia global, eles também fornecem estimativas dos tempos de divergência e das distribuições biogeográficas do ancestral dos grandes grupos. Análises de probabilidade Bayesiana e máxima verossimilhança suportaram fortemente uma divisão dos meliponíneos em dois grupos um no Velho e outro de abelhas do Novo Mundo. Inferi-se que esta divisão aconteceu a cerca de 80 Mya. As principais diversificações no Novo Mundo ocorreram aproximadamente a 30-40 Mya.

Batalha-Filho (2008) definiu padrões filogeográficos para duas subespécies de *Melipona quadrifasciata* ao longo de sua área de distribuição no território brasileiro. Sequências parciais do gene *COI* do DNAmt de 145 indivíduos de *M. quadrifasciata* foram analisadas obtendo-se uma árvore filogenética por inferência Bayesiana e uma rede de haplótipos. Ambas as análises mostraram a formação de dois clados, o clado sul compreendendo a subespécie *M. q. quadrifasciata* e o clado norte formado pela subespécie *M. q. anthidioides*. Uma barreira geográfica que coincide com a separação geográfica dos dois clados foi estimada. Além disso, o autor relata a existência de uma hipótese de vicariância semelhante à encontrada nesse estudo, para outros organismos.

Lopes (2008), com o objetivo de avaliar o nível de diferenciação entre espécies do complexo *rufiventris*, analisou sequências do gene *cyt*b por

métodos filogenéticos. As árvores inferidas por Neighbor-Joining, Máxima Verossimilhança e Bayesiana apresentaram a mesma topologia, com formação de três clados. Um dos clados formados reuniu abelhas provenientes de Minas Gerais e Goiás, identificadas como *M. rufiventris*, o outro foi representado pela abelha de São Luís-MA e o terceiro formado por abelhas provenientes do noroeste de Minas Gerais, Maranhão, Ceará, Tocantins e Piauí. O nível de diferenciação encontrado neste último grupo em relação aos outros poderia, segundo a autora, indicar que os espécimes nele incluídos seriam de outra espécie de *Melipona* do complexo *rufiventris*, ainda não identificada. Esses resultados corroboram com aqueles relatados por Tavares *et al*. 2007 e Silva *et al.* (2007) empregando marcadores RAPD, microssatélites e isoenzimas, ou seja, as abelhas procedentes do noroeste de Minas Gerais até o Maranhão não apresentam os mesmos padrões descritos para *M. rufiventris* e *M. mondury* sugerindo que possa pertencer a outra espécie ainda não descrita (*Melipona* sp).

Dando continuidade e ao mesmo tempo visando aprofundar o trabalho realizado por Lopes (2008), o presente estudo propõe continuar investigando a filogenia deste grupo de abelhas. Para isso, o número amostral e o número de caracteres mitocondriais foram ampliados.

OBJETIVOS

Construir uma hipótese filogenética baseada em sequências de DNA mitocondrial visando contribuir na elucidação de questões taxonômicas e evolutivas dentro do complexo de *Rufiventris*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Genético

Um total de 39 colônias de abelhas do complexo *rufiventris* foi amostrado em 17 localidades dos estados de Minas Gerais, Goiás, Maranhão, Ceará, Piauí e Tocantins. Destas, 16 colônias são da espécie *M. rufiventris* e 2 da espécie *M. mondury*. As demais (23 colônias), foram consideradas como *Melipona* sp. (Tabela 1, Figura 1). Uma abelha operária por colônia foi utilizada nas análises, uma vez que análises com mais de um indivíduo da mesma colônia implica em uma alta probabilidade de estar se analisando indivíduos irmãos.

Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento

O DNA total extraído do mesossomo de operárias adultas conforme Fernandes-Salomão *et al.* (2005) foi utilizado para amplificação de sequências da região *COI*-*COII* do DNA mitocondrial (extremidade 5' do gene COI - $tRNA^{leu}$ - extremidade 3' do gene COII) e parciais do gene *cyt*b do DNA mitocondrial das operárias analisadas. Os fragmentos de DNA obtidos por PCR foram posteriormente sequenciados.

A região *COI*-*COII* foi amplificada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 5' TCTATACCACGACGTTATTC 3' e 5' GATCAATAATCATTGATGACC 3' (Smith & Hagen, 1997). A reação e as condições de amplificação foram conduzidas segundo Moreto & Arias (2005). Os fragmentos de DNA amplificados foram separados em gel de agarose 1,5% (p/v), extraídos do gel com Kit de purificação "Wizard-SV Gel and PCR Clean-Up System Promega e inseridos no vetor "pGEM-TEasy" seguindo as recomendações dos fabricantes. Após esta inserção, células ultracompetentes de *E. coli* DH5α foram transformadas com os vetores contendo o inserto correspondente (Inoue *et al.*, 1990). Os clones recombinantes foram selecionados, os plasmídeos extraídos e os insertos foram sequenciados utilizando sequenciador automatizado MegaBace DNA Analysis System 500

(Amershan Biosciences Corp.). Foram sequenciados no mínimo três clones de cada amostra amplificaficada.

O gene *cyt*b foi parcialmente amplificado utilizando os primers Mb2 (5'ACTATCAGCATTACCTTATATTGGTC3') e Mb4 (5'GTGTTTTAGCTCGAATTC-GGTATG3') desenhados a partir do genoma mitocondrial de *M. bicolor* (Silvestre *et al*., 2008). O DNA amplificado foi purificado com enzima ExoSap-IT®, e os fragmentos purificados submetidos ao sequenciamento pelo sequenciador automatizado MegaBace DNA Analysis System 500 (Amershan Biosciences Corp.).

Tabela 1: Espécies amostradas e suas respectivas localidades, coordenadas geográficas (decimais) e número de colônias amostradas (N).

Espécie	Localidade/Estado	Longitude	Latitude	N
M. rufiventris	Araguari/MG	-48.1872	-18.6472	1
	Brasília/DF	-47.9297	-15.7797	1
	Guimarânia/MG	-46.7931	-18.8439	4
	Luziânia/GO	-47.9503	-16.2525	6
	Patos de Minas/MG	-46.5181	-18.5789	3
	Uberaba/MG	-47.9319	-19.7483	1
Melipona sp.	Brasilândia de Minas/MG	-46.0094	-17.0097	2
	Dom Bosco/MG	-46.2708	-16.6519	3
	Urucuia/MG	-45.7422	-16.1325	1
	Januária/MG	-44.3617	-15.4881	2
	Novo Acordo/TO	-47.6772	-9.9628	2
	Pacoti/CE	-38.9233	-4.225	1
	Teresina/PI	-42.8019	-5.0892	2
	Ubajara/CE	-40.9211	-3.8544	1
	Urbano Santos/MA	-43.4036	-3.2078	8
	São Luís/MA	-44.3028	-2.5297	1
M. mondury	Rio Vermelho/MG	-43	-18.3	2

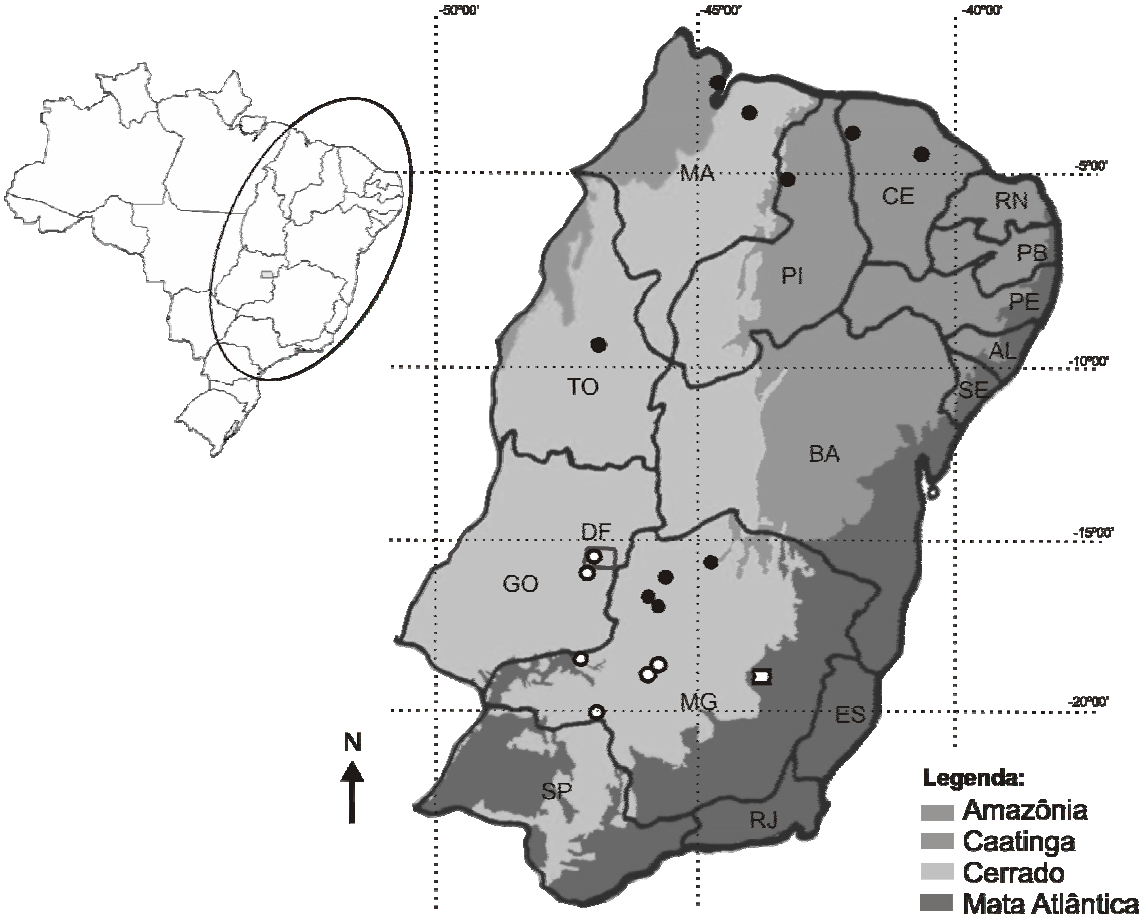

Figura 1: Mapa de distribuição geográfica das 17 localidades amostradas. O quadrado branco indica a localidade onde foi amostrada *M. mondury*, os círculos brancos, *M. rufiventris* e os círculos pretos, *Melipona* sp..

Alinhamento de sequências e Análises Filogenéticas

Após o sequenciamento, os cromatogramas foram editados utilizando o pacote de programas, para o sistema operacional Linux, Phred, Phrap e Consed (Ewing *et al.* 1998; Ewing & Green 1998; Gordon *et al.* 1998). As sequências editadas foram alinhadas utilizando-se o método CLUSTAL W (Higgins *et al.* 1994) visualizando o alinhamento no programa MEGA4 (Tamura et al. 2007). As sequências *COI*/*COII* e *cyt*b foram comparadas com as respectivas sequências de *M. bicolor* (Silvestre *et al.* 2008) depositada no GenBank. Todos os alinhamentos foram inspecionados e corrigidos visualmente. Para se proceder as análises filogenéticas, as sequências *COI*/*COII* e *cyt*b foram concatenadas.

As estatísticas do alinhamento das sequências de DNA foram identificadas com auxílio do programa MEGA4 (Tamura *et al.* 2007). No software DNAsp 4 (Rozas, 2003) foram definidos os haplótipo e as diversidades nucleotídica e haplotípicas.

Como grupo externo para as análises filogenéticas foram utilizadas sequências da região *COICOII* e do gene *cyt*b de *M. bicolor* (NC004529, genoma mitocondrial completo - GenBank) e sequências de *M. quadrifaciata* (EF529423 para o gene *cyt*b – GenBank e sequências *COICOII* foram obtidas no banco de dados do Laboratório de Biologia Molecular e Celular do DBG-UFV).

O modelo de substituição utilizado na abordagem de máxima-verossimilhança (MV) foi calculado utilizando-se o ModelTest (Posada & Crandall 1998) com o critério de informação Akaike (AIC) (Akaike, 1985), utilizando-se grupo externo. Os parâmetros utilizados para a escolha do modelo de substituição usado para a reconstrução filogenética Bayesiana (IB) foram estimados pelo MrModeltest (Nylander *et al.* 2004) também com o critério de informação Akaike (AIC), utilizando-se o mesmo grupo externo.

Árvores filogenéticas foram construídas pelos métodos de máxima verossimilhaça (MV) utilizando o programa paup * 4.0b10 (Swofford, 2002) e por inferência Bayesiana (IB) por meio de MrBayes 3.0b4 (Huelsenbeck & Ronquist 2001), com 1.000.000 ciclos de gerações por Cadeia de Monte Carlo Markov (MCMC). Foram excluídas as 100.000 gerações iniciais, por meio do "burn in", e os valores de probabilidade a posteriori foram estimados com as árvores restantes. As árvores de MV foram estimadas com uma busca heurística TBR (tree-bisection–reconnection), utilizando para cálculo dos valores de bootstrap a busca heurística e o NNI (nearest-neighbour interchange). As árvores filogenéticas foram editadas no programa FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2009).

Com o objetivo de visualizar parâmetros histórico-demográficos foi utilizado o programa NETWORK 4.5.0.0 (Bandelt, *et al.,* 1999), com o qual foi construída uma rede de haplótipos (network) utilizando-se o algoritmo median-joining que identifica os haplótipos mais proximamente relacionados.

RESULTADOS

Variação nas sequências de DNA mitocondrial

Foram obtidos fragmentos de DNA de 363 e 496 pb respectivamente para a região *COI*/*COII* e para o gene *cyt*b das abelhas analisadas. Os fragmentos obtidos foram concatenados gerando um fragmento de 859 pb. Sequências de *M. quadrifaciata* e de *M. bicolor* (espécies utilizadas como grupo externo) obtidas no GeneBank, também foram concatenadas. Todas as sequências foram alinhadas e 95 sítios variáveis foram detectados. A composição de nucleotídeos foi de T=46,8%, C=10,4%, A=38,2% e G=4,7%. Foram identificados 21 haplótipos.

A Tabela 2 mostra a distribuição dos haplótipos detectados, respectivas localidades amostradas e espécies analisadas. Observa-se que não há compartilhamento de haplótipos entre *M. rufiventris, M. mondury, Melipona* sp. e as espécies do grupo externo. Em *M. rufiventris* o haplótipo 1 é compartilhado por 8 indivíduos pertencentes a localidades do oeste mineiro e do Distrito Federal. Em Patos de Minas-MG existem indivíduos que compartilham este mesmo haplótipo, porém, nesta mesma localidade o haplótipo 2 foi também identificado em um indivíduo. O haplótipo 3 foi detectado apenas em indivíduos de Luziânia-GO. Nesta mesma localidade, detectou-se, também, o haplótipo 5 em duas abelhas analisadas. Em *Melipona* sp o haplótipo 6 é compartilhado por um indivíduo de Brasilândia de Minas-MG e por três de Dom Bosco-MG. Em Brasilândia de Minas detectou-se, também, em um indivíduo, o haplótipo 7. O haplótipo 8 também é compartilhado por abelhas de duas localidades, Januária (dois indivíduos) e Urucuia (um indivíduo). Haplótipos diferentes foram detectados, também, em indivíduos de Urbano Santos-MA. Nesta mesma localidade, dos oito indivíduos analisados, cinco possuem o haplótipo 13, um o haplótipo 12, um o haplótipo 14 e outro o haplótipo 15. Além disso, o haplótipo 10 foi detectado em um indivíduo de *Melipona* sp. procedente de Pacoti-CE e outro de Teresina-PI. Em Teresina há, também, um indivíduo com o haplótipo 16 (Tabela 2). No único indivíduo de São Luís-MA analisado detectou-se o haplótipo 11. O haplótipo 17 foi detectado em dois indivíduos de Novo Acordo-TO. Finalmente, os haplótipos 18 e 19 foram exclusivos para *M. mondury* e os

haplótipos 20 e 21 exclusivos para abelhas do grupo externo (*M. quadrifaciata* e *M. bicolor*, respectivamente).

Análises Filogenéticas

O modelo de substituição de nucleotídeos selecionado para a inferência Bayesiana foi o General Time Reversible (GTR) e para a Máxima-Verossimilhança, o modelo foi Kimura, 1981 (K81). As topologias das árvores filogenéticas obtidas por estes dois métodos foram similares e para apresentação dos resultados optou-se pela hipótese estimada pela inferência Bayesiana.

A árvore filogenética obtida (Figura 2) mostra que após a separação do grupo externo, as abelhas do complexo *rufiventris* analisadas foram divididas em quatro clados. Os clados foram inicialmente denominados de clado *M. mondury*, clado *M. rufiventris*, clado C1 e clado C2 (Figura 2). O primeiro clado (*M. mondury)* contém os indivíduos de *M. mondury* (Haplotípos 18 e 19) e o segundo (*M. rufiventris*) de *M. rufiventris* (haplótipos 1 a 5). O terceiro (C2) e quarto (C1) clado contém indivíduos considerados no presente trabalho de *Melipona* sp. O clado C2 foi formado por um único indivíduo de *Melipona* sp., o procedente de São Luís-MA (Hap 11), e o C1 pelos demais indivíduos considerados também *Melipona* sp. (Haplótipos 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16 e 17) os quais foram amostrados em uma região geográfica extensa, compreendendo desde o noroeste de Minas Gerais passando pelo estado de Tocantins, até aos estados do Maranhão, Ceará e Piauí.

Para melhor compreensão das relações filogenéticas inferidas, oito indivíduos representando oito colônias amostradas e analisadas, neste estudo, foram avaliados morfologicamente pelo taxonomista de hymenoptera, Professor Gabriel A.R. Melo. A Tabela 3 mostra a procedência dos indivíduos analisados e respectiva identificação feita pelo taxonomista. O indivíduo incluído no clado C2 foi identificado como da espécie *M. flavolineata.* Três indivíduos foram identificados como *M. rufiventris* e os outros quatros continuaram sendo considerados *Melipona* sp. Para os considerados *Melipona* sp. não foi possível, com base na análise realizada, identificar a qual das

espécies atualmente reconhecidas como do gênero *Melipona* estes indivíduos pertencem.

Com base na identificação proposta (Tabela 3), os clados C1 e C2 foram respectivamente denominados de *Melipona* sp.. e *M. flavolineata*. Os demais permaneceram como *M. mondury* e *M. rufiventris* (Figura 3).

A árvore filogenética inferida mostra, também, a formação de dois grandes grupos dentro do complexo *rufiventris* sugerindo que *M. mondury* e *M. rufiventris* são espécies irmãs da mesma forma que *Melipona* sp. e *M. flavolineata*. A Figura 4 ilustra os dois grupos formados e a distribuição geográfica dos indivíduos que os compõem.

Redes de haplótipos

Com base nas sequências *COI*COII e *cyt*b concatenadas de *Melipona* sp. e *M. flavolineata* uma rede de haplótipos foi obtida (Figura 5B). Observa-se na rede que o haplótipo 11, detectado no indivíduo de *M. flavolineata* de São Luís-MA, está a 10 passos mutacionais do haplótipo 16 detectado em *Melipona* sp., mostrando que apesar de *Melipona* sp. e *M. flavolineata* estarem representadas na árvore como duas espécies irmãs (Figura 3) as mesmas são bastante diferenciadas geneticamente.

A Figura 5B mostra também dois ramos (Hap17; e Hap 6, 7 e 8) com haplótipos mais divergentes em relação aos haplótipos 9, 10, 12, 13, 14, 15 e 16, que entre si diferenciam-se por apenas um ou dois passos mutacionais. O haplótipo 17 que constitui um destes ramos mais diferenciados foi identificado em abelhas procedentes de Novo Acordo-TO e está a quatro passos mutacionais do haplótipo 14. O outro ramo é formado pelos haplótipos 6, 7 e 8, identificados em abelhas do noroeste de Minas Gerais (Brasilândia de Minas, Dom Bosco, Januária e Urucuia) e diferenciam entre si por apenas um passo mutacional, porém, diferenciam do haplótipo 9 por três passos mutacionais. Observando a Figura 5 (A e B) parece haver uma tendência de agrupamento dos haplótipos mais próximos geograficamente nos dois ramos mais diferenciados: o haplótipo 17, pertence à localidade de Novo Acordo-TO e os haplótipos 6, 7 e 8, a localidades do noroeste de Minas Gerais. Entretanto esta

tendência não ocorreu entre os haplótipos 10, 12, 13, 14, 15 e 16. Neste caso, os haplótipos mostram-se pouco diferenciados entre si, com distancia de apenas um ou dois passos mutacionais entre eles, além da existir mais de um haplótipo em mesma localidade e de haver haplótipos compartilhados por localidades diferentes (Figura 5 A e B).

A Figura 6 mostra a rede de haplótipos obtida a partir das sequências *cyt*b e *COICOII* concatenadas de *M. mondury* e *M. rufiventris* incluídas no grupo 2 da Figura 4 e a distribuição geográfica dos haplótipos. A rede mostra que os haplótipos detectados em *M. mondury* (haplótipos 18 e 19) divergem por vinte e cinco passos mutacionais do haplótipo 2 detectado em *M. rufiventris* sugerindo que *M. mondury* e *M. rufiventris*, consideradas espécies irmãs, são geneticamente muito diferenciadas.

Considerando os haplótipos identificados em *M. rufiventris* (haplótipos 1 a 5), a rede (Figura 6A) mostra que o haplótipo 2 identificado em um individuo de Patos de Minas-MG, está separado por três passos mutacionais de um haplótipo ancestral ou haplótipo não amostrado nesta análise. Este mesmo haplótipo, está separado do haplótipo 1 por quatro passos mutacionais. O haplótipo 1 (haplótipo compartilhado por 8 indivíduos de quatro localidades diferentes) está separado do haplótipo 3 (detectado em abelhas de Luziânia-GO) por apenas um passo mutacional. O haplótipo 3 está a dezessete passos mutacionais do haplótipo 5, detectado, também, em abelhas de Luziânia-GO. O haplótipo 5 está separado por um passo do haplótipo 4 (individuo de Uberaba-MG) que está a dezessete passos mutacionais do haplótipo 1. Estes resultados mostram que, apesar da proximidade geográfica entre as localidades amostradas, há uma considerável variação genética entre os indivíduos de *M. rufiventris* analisados. Um exemplo disso é a divergência dos haplótipos 4 e 5 em relação os demais haplótipos identificados para *M. rufiventris*. Os haplótipos 4 e 5 foram identificados em indivíduos procedentes de Luziânia-GO e Uberaba-MG respectivamente, localidades estas geograficamente próximas das demais amostradas. (figura 6).

Tabela 2: Espécies, haplótipos identificados, números de indivíduos por haplótipos (n) e respectivas localidades onde foram amostrados. Os números entre parênteses são os números de indivíduos amostrados por localidade.

Espécie	Haplótipos	n	Localidades
M. rufiventris	Hap 1	8	Araguari-MG(1);Guimarânia- MG(4);Patos de Minas-MG(2);Brasília-DF(1)
	Hap 2	1	Patos de Minas-MG(1)
	Hap 3	4	Luziânia-GO(4)
	Hap 4	1	Uberaba-MG(1)
	Hap 5	2	Luziânia-GO(2)
Melipona sp.	Hap 6	4	Brasilândia de Minas-MG(1); Dom bosco-MG(3)
	Hap 7	1	Brasilândia de Minas-MG(1)
	Hap 8	3	Januária-MG(2); Urucuia-MG(1)
	Hap 9	1	Ubajara-CE(1)
	Hap 10	2	Pacoti-CE(1); Teresina-PI(1)
	Hap 11	1	São Luís-MA(1)
	Hap 12	1	Urbano Santos-MA(1)
	Hap 13	5	Urbano Santos-MA(5)
	Hap 14	1	Urbano Santos-MA(1)
	Hap 15	1	Urbano Santos-MA(1)
	Hap 16	1	Teresina-PI(1)
	Hap 17	2	Novo Acordo-TO(2)
M. mondury	Hap 18	1	Rio Vermelho-MG(1)
	Hap 19	1	Rio Vermelho-MG(1)
M.quadrifaciata	Hap 20	1	Grupo externo
M. bicolor	Hap 21	1	Grupo externo

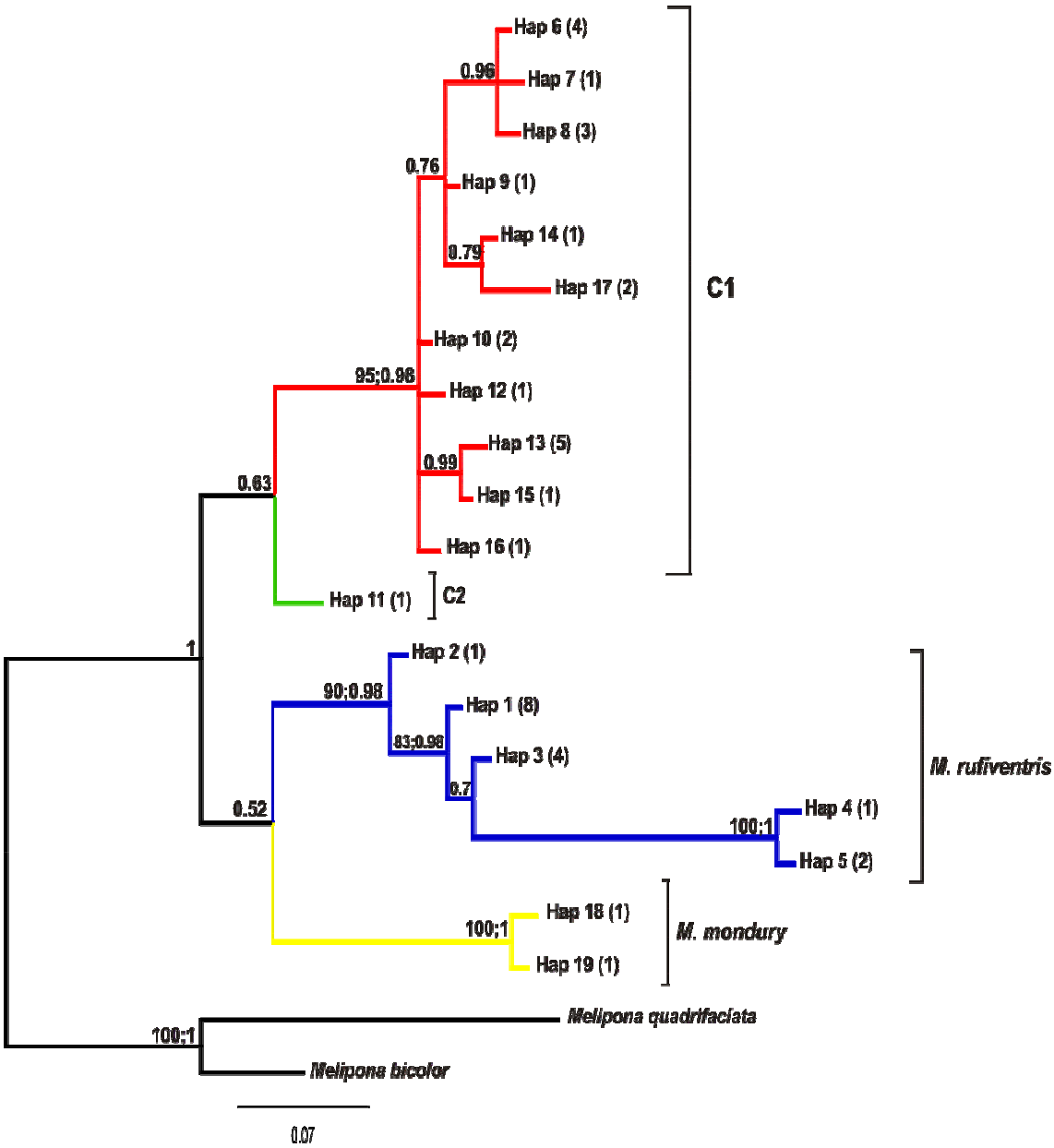

Figura 2: Árvore obtida por Inferência Bayesiana (modelo GTR) para o gene *cyt*b e a região *COICOII* concatenados. Os clados estão com seus respectivos ramos destacados com cores diferentes. O clado destacado de amarelo contém *M. mondury* e de azul, *M. rufiventris*. Os clados destacados de vermelho (C1) e de verde (C2) foram formados por *Melipona* sp.. Grupo externo: *M. quadrifaciata* e *M. bicolor*. Os códigos dos haplótipos estão conforme Tabela 2. Os números entre parênteses representam o número de indivíduos por haplótipo. Os números nos ramos representam valores de bootstrap para máxima verossimilhança e de probabilidades Bayesianas *a posteriori*, respectivamente.

Tabela 3: Indivíduos analisados morfologicamente, procedência e respectiva identificação.

Indivíduo	Localidade	Espécie
1	São Luís/MA	*Melipona flavolineata*
2	Araguari/MG	*Melipona rufiventris*
3	Guimarânia/MG	*Melipona rufiventris*
4	Uberaba/MG	*Melipona rufiventris*
5	Brasilândia de Minas/MG	*Melipona* sp.
6	Pacoti/CE	*Melipona* sp.
7	Ubajara/CE	*Melipona* sp.
8	Urbano Santos/MA	*Melipona* sp.

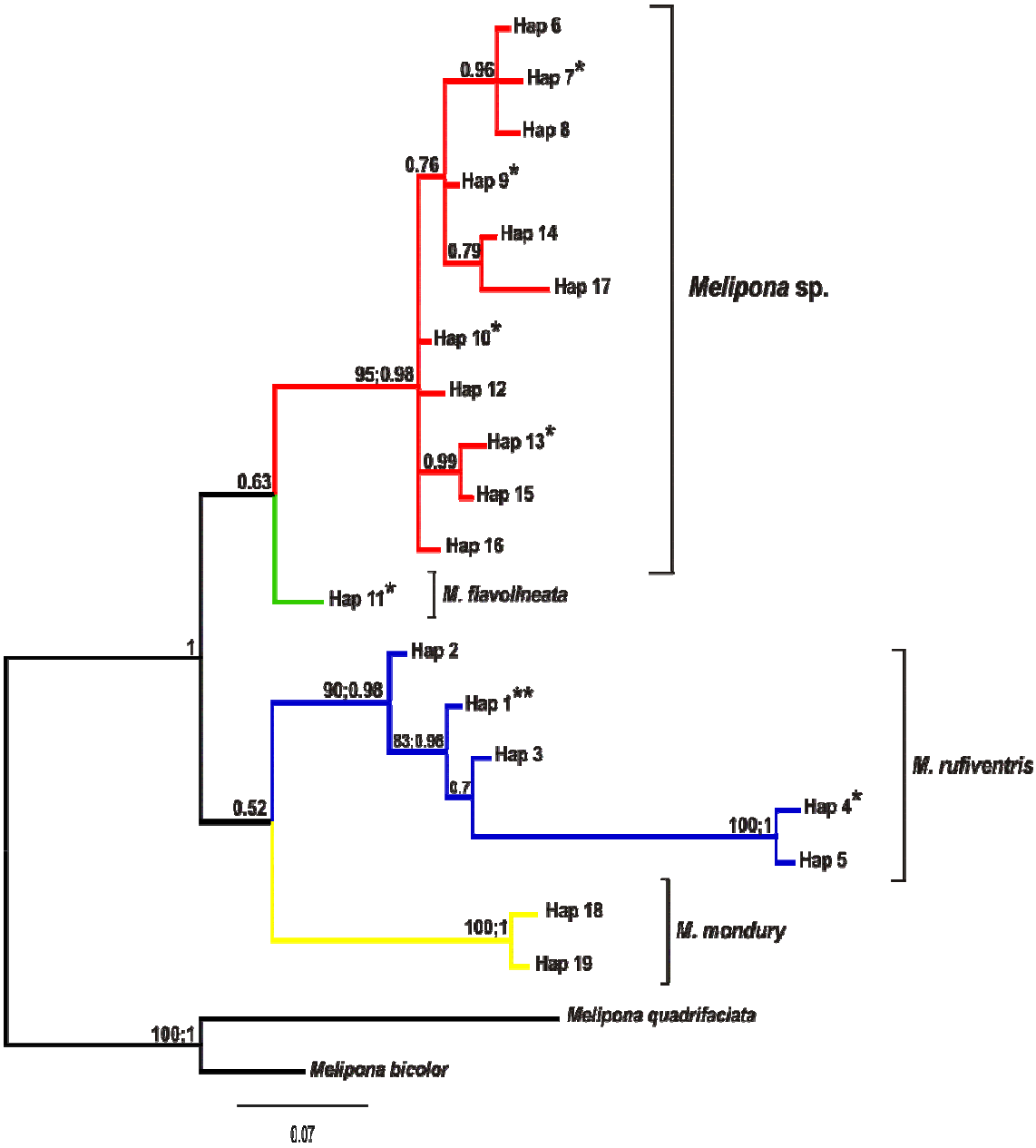

Figura 3: Árvore obtida por Inferência Bayesiana utilizando o modelo GTR para o gene *cyt*b e a região *COICOII* concatenados. Os clados estão com seus ramos destacados com cores diferentes e nomeados de acordo com a identificação realizada pelo taxonomista. *M. mondury* (clado em amarelo), *M. rufiventris* (clado em azul), *M. flaovlineata* (clado em verde) *Melipona* sp. (clado em vermelho). Grupo externo: *M. quadrifaciata* e *M. bicolor*. Os códigos dos haplótipos estão conforme Tabela 2. O asterisco (*) indica os haplótipos que tiveram no mínimo um indivíduo identificado pelo taxonomista. Os números nos ramos representam valores de bootstrap para máxima verossimilhança e de probabilidades Bayesianas *a posteriori*, respectivamente.

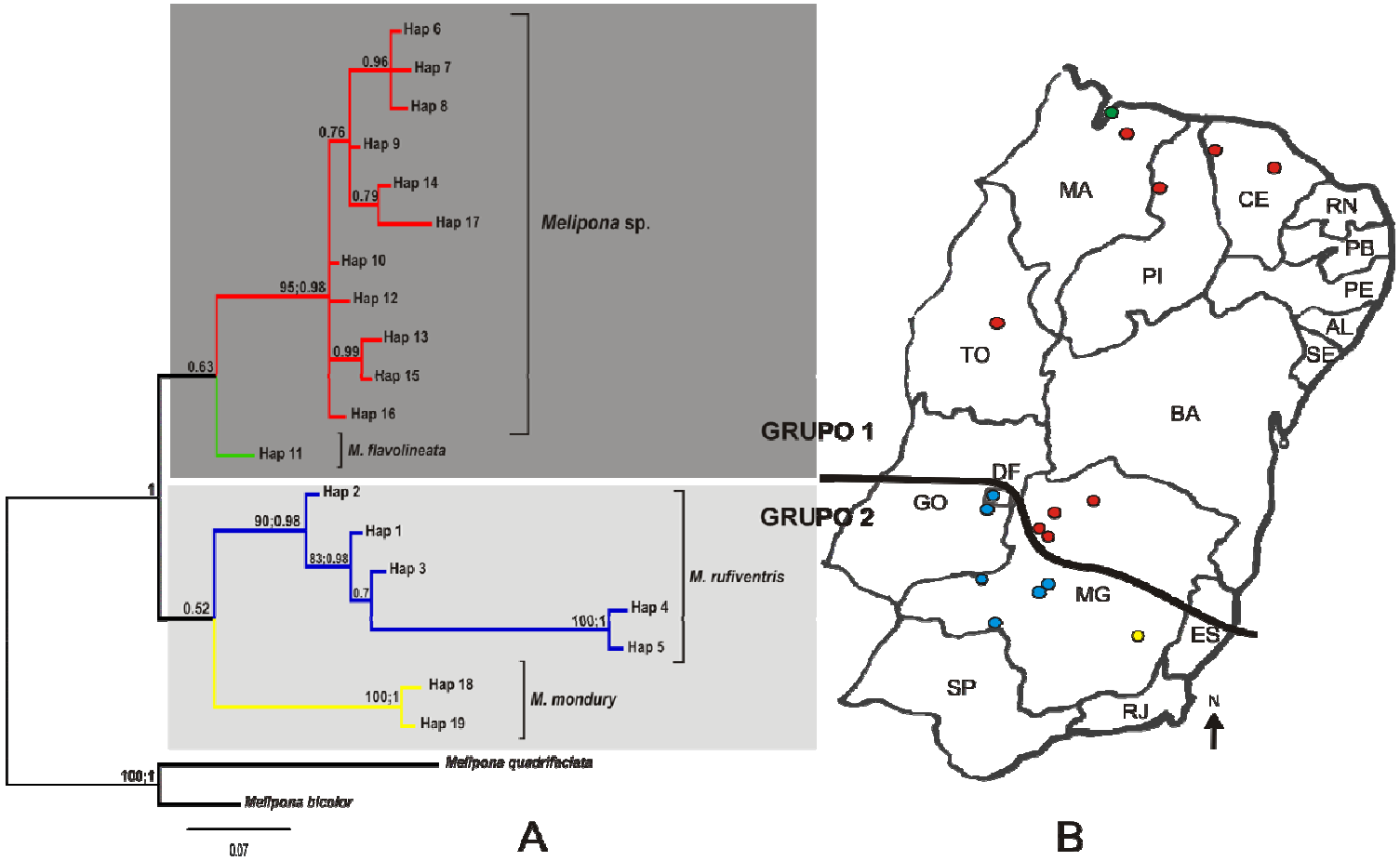

Figura 4: A: Árvore ilustrando a separação das abelhas analisadas em dois grupos. Grupo 1: sombreado escuro, e Grupo 2: sombreado claro. B: Disposição geográfica das abelhas incluídas em cada grupo. Os círculos indicam as localidades amostradas. As cores dentro dos círculos identificam os quatro clados: *M. mondury* (amarelo), *M. rufiventris* (azul), *Melipona* sp. (vermelho) e *M. flavolineata* (verde).

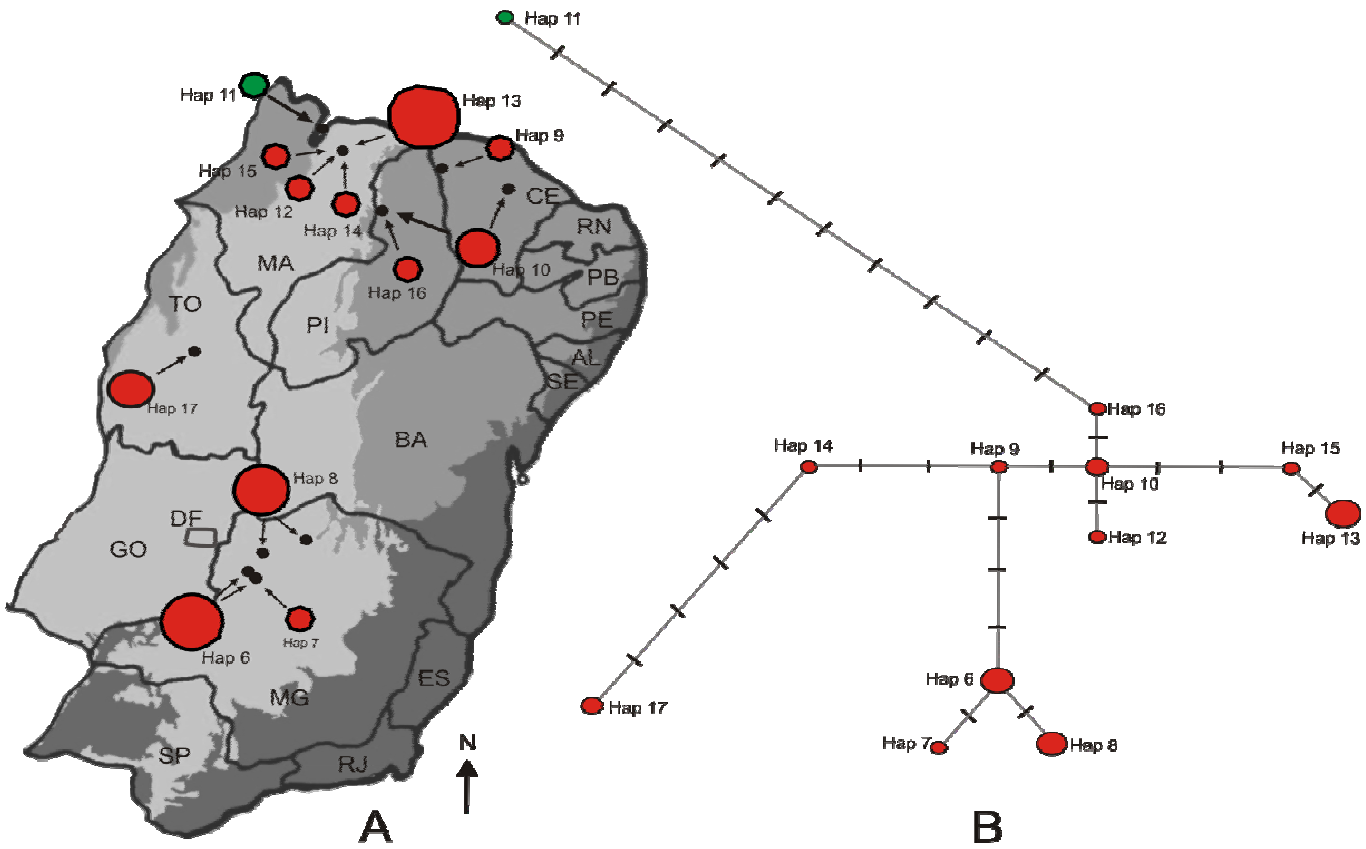

Figura 5: A: Mapa com distribuição geográfica dos haplótipos do grupo 1 (*Melipona* sp. e *M. flavolineata*,) conforme Figura 4. Os círculos pretos representam as localidades amostradas. Os círculos vermelhos representam haplótipos detectados em *Melipona* sp. e o verde em *M. flavolineata*. B: Rede de haplótipos em median-joining do grupo 1. Cada círculo compreende um haplótipo, o seu tamanho é proporcional a frequência de indivíduos. Cada traço na linha que conecta os haplótipos representa um passo mutacional. A codificação dos haplótipos está conforme Tabela 2.

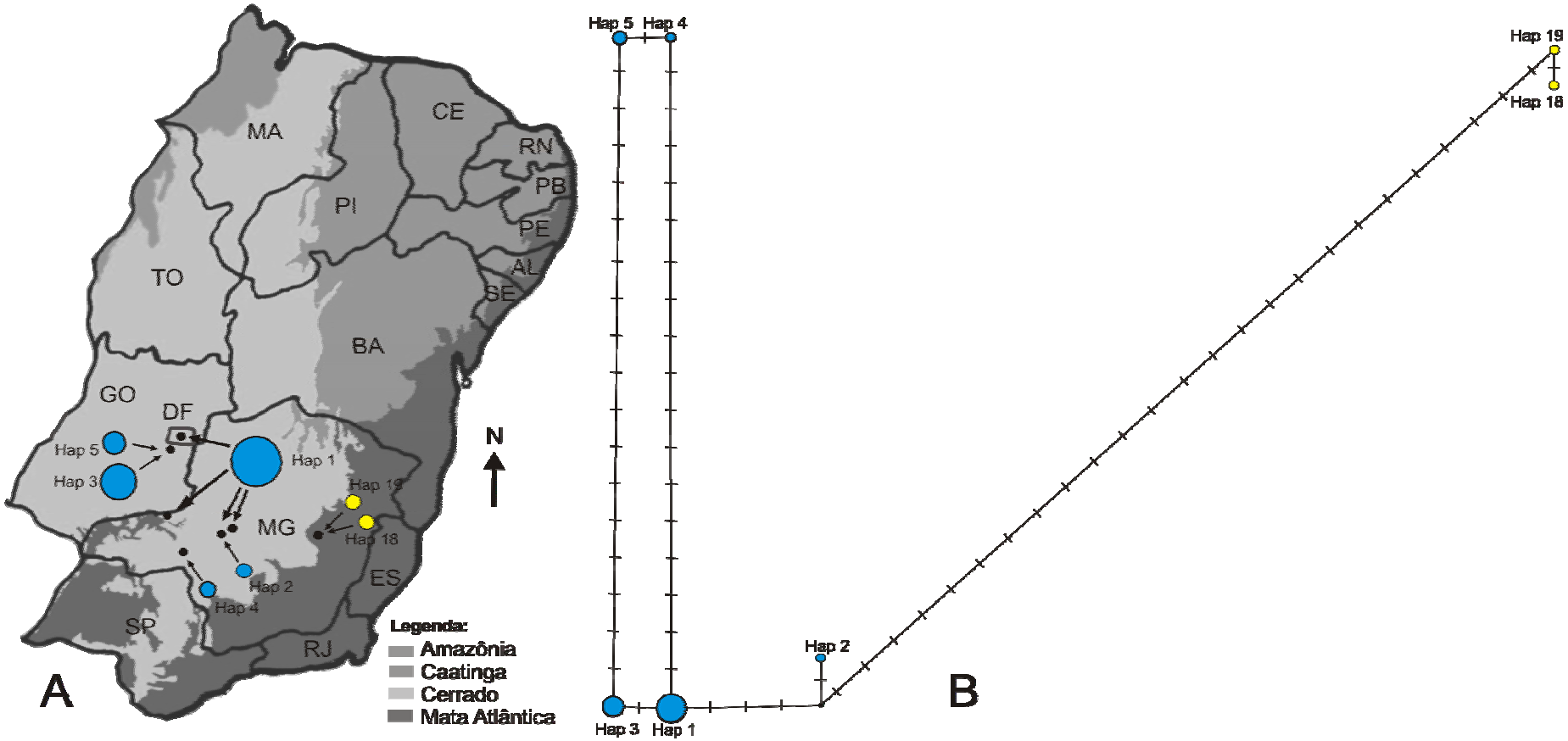

Figura 6: A: Mapa com distribuição geográfica dos haplótipos do grupo 2 (*M. rufiventris* e *M. mondury*,) conforme Figura 4. Os círculos pretos representam as localidades amostradas. Os círculos azuis representam haplótipos detectados em *M. rufiventris* e os amarelos os detectados em *M. mondury*. B: Rede de haplótipos em median-joining do grupo 2. Cada círculo compreende um haplótipo e o seu tamanho é proporcional a frequência de indivíduos. Cada traço na linha que conecta os haplótipos representa um passo mutacional. A codificação dos haplótipos está conforme Tabela 2.

DISCUSSÃO

A composição de bases da sequência parcial do gene *cyt*b e da região *COICOII* com percentual maior de A-T (85%) seguiu o padrão já reportado para o DNA mitocondrial de insetos (Crozier & Crozier 1993; Simon *et al.* 1994).

A separação das espécies *M. mondury* e *M. rufiventris* em dois clados distintos já era esperada. Diversos estudos utilizando diferentes marcadores moleculares têm mostrado a separação destas espécies em grupos diferentes (Silva *et al.*, 2007; Lopes, 2008). Os clados C1 e C2 incluíram os indivíduos inicialmente considerados todos como *Melipona* sp. conforme Tabela 1. A separação do indivíduo de São Luís-MA em um clado diferente do clado que inclui os demais indivíduos de *Melipona* sp. está de acordo com a identificação realizada pelo taxonomista Gabriel A.R. Melo que considerou o mesmo pertencente á espécie *M. flavolineata*. Assim, com base nos resultados das análises filogenéticas obtidas (Figura 2), na caracterização morfológica realizada pelo taxonomista para alguns indivíduos analisados neste estudo (Tabela 3) e por estudos morfológicos prévios de algumas destas abelhas (Melo, 2003), os clados inicialmente nomeados de *M. mondury* e *M. rufiventris* permaneceram com este nome e os clados C1 e C2 foram nomeados de *Melipona* sp. e *M. flavolineata* respectivamente (Figura 3).

A árvore filogenética estimada mostra, também, que *M. mondury* é mais próxima evolutivamente de *M. rufiventris* e que *M. flavolineata* é mais próxima de *Melipona* sp. (Figura 4). Este resultado está de acordo com Melo (2003) e com Tavares *et al.* (2007), pois *M. mondury* e *M. rufiventris* que eram consideradas da mesma espécie são agora consideradas espécies irmãs.

Embora os haplótipos do clado *M. rufiventris* tenham sido incluídos em um único clado, o mesmo se mostrou variável pelo fato de haver haplótipos compartilhados entre as localidades desta região. Como exemplo desta variação tem-se o haplótipo 1 que é compartilhado por quatro localidades, e a existência de dois haplótipos (haplótipos 3 e 5) em uma mesma localidade (Luziania-GO) (Tabela 2). Além disso, dois haplótipos (4 e 5) apareceram em um ramo longo dentro do clado *M. rufiventris*. O transporte de colônias desta e de outras espécies melíferas entre as localidades amostradas poderia estar contribuindo para esta variação.

Poderia se especular que os haplótipos 4 e 5 pertenceriam a uma espécie diferente de *M. rufiventris*, relacionando-a ao conceito de espécie críptica, que seriam aquelas que se diferenciaram reprodutivamente, mas não morfologicamente (Ridley, 2006), pois, como já foi dito, a separação de espécies do gênero *Melipona* por análise dos caracteres morfológicos é difícil (Michener, 2000) e a identificação morfológica do taxonomista, que reconheceu o indivíduo de Uberaba-MG (Haplótipo 4) como *M. rufiventris*. Mas o tamanho relativamente grande desse ramo pode representar a existência de haplótipos intermediários entre os haplótipos 4 e 5, e o haplótipo 3 (haplótipo mais próximo destes na árvore) que não foram amostrados. Além disso, nas análises filogenéticas feitas por Lopes (2008) utilizando apenas sequências parciais do gene *cyt*b, este ramo dentro do clado *M. rufiventris* não foi observado. De qualquer forma, análises mais detalhadas utilizando uma amostragem maior ou ainda outros genes poderão ajudar a esclarecer esta variação dentro do clado *M. rufiventris*.

O clado *Melipona* sp. é um clado contendo uma espécie ainda não descrita dentro do complexo *rufiventris*, uma vez que indivíduos deste clado foram reconhecidos pelo taxonomista como uma espécies nova, ainda não descrita (Tabela 3). Apesar disso, as análises moleculares realizadas permitiram separar esta "nova" espécie das demais analisadas no presente estudo. Da mesma forma, Lopes (2008) ao analisar filogeneticamente espécies do complexo *rufiventris* que incluiu o individuo de São Luís-MA, também relatou a formação de um clado contendo apenas este individuo e, por tanto, separado das abelhas dos estados do Maranhão, Ceará, Piauí e Tocantins. No presente estudo, o clado *Melipona* sp. mostrou-se o mais diversificado quando comparado com os outros. Esta maior diversificação pode estar relacionada com o fato dos indivíduos avaliados serem procedentes de diferentes estados (Maranhão, Tocantins, Piauí, Ceará e noroeste de Minas Gerais). Este resultado está de acordo com estudos realizados com base em microssatélites (Silva *et al.,* 2007) e análises filogenéticas (Lopes, 2008).

Como se observa na figura 4, o indivíduo de *M. flavolineata* comporta-se como grupo irmão mais próximo de *Melipona* sp.. A proximidade geográfica de alguns espécimes de *Melipona* sp. do Maranhão, do Piauí e Ceará com *M. flavolineata* (São Luís-MA), pode estar contribuindo com a observada

proximidade filogenética entre elas, já que espécies com grande distribuição geográfica, como é o caso de *Melipona* sp., tendem a ser mais relacionadas com espécies locais do que com outras semelhantes de localidades mais distantes (Ridley, 2006). No entanto, este resultado deve ser interpretado com cuidado, pois apenas um indivíduo de *M. flavolineata* foi utilizado nas análises. Baseado em caracteres morfológicos, *M. flavolineata* é incluída no complexo *rufiventris*, com uma distribuição que abrange os estados do Pará, Amazônia e Tocantins, além do Maranhão (Silveira *et al.,* 2002). Análises com amostragem representativa da área de ocorrência de *M. flavolineata* poderão definir melhor a relação filogenética entre *Melipona* sp. e *M. flavolineata*, e destas com outras espécies do complexo *rufiventris*.

Segundo Templenton *et al.* (1992), uma rede de haplótipos apresentaria multifurcações, pois é esperado que haplótipos ancestrais sofram várias mutações, em tempo diferente, originando haplótipos descendentes. Também se espera que haplótipos ancestrais e haplótipos descentes estejam presentes em uma mesma rede, já que seria extremamente improvável que todos os indivíduos do haplótipo ancestral tenham sofrido a mesma mutação. Na rede, os haplótipos de origem mais recente devem ser encontrados nas extremidades, enquanto os haplótipos ancestrais seriam encontrados no interior da rede. De acordo com a distribuição geográfica, é esperado que haplótipos ancestrais se apresentem geograficamente melhor distribuídos, enquanto haplótipos recentes tenham distribuição mais restrita, visto que não teriam tido tempo suficiente para maior dispersão.

Considerando o relatado por Templenton *et al.* (1992), a rede de haplótipos do grupo 1 mostra que o haplótipo 11, detectado em *M. flavolineata*, está mais na extremidade da rede, por tanto, ele seria um haplótipo de origem mais recente que os outros haplótipos. Assim, como os haplótipos 6, 7 e 8 e o haplótipo 17 que formam grupos relacionados com a distribuição geográfica, se localizam mais a extremidade da rede, os mesmos, também, seriam haplótipos descendentes. Já os haplótipos 9, 10, 12, 13, 14, 15 e 16, que estão melhores distribuídos geograficamente e se localizam mais ao centro da rede, seriam os haplótipos ancestrais. Por tanto, pode-se sugerir que o ancestral do grupo 1 viveu na região entre os estados do Maranhão, Piauí e Ceará, estados estes

onde se encontram os haplótipos ancestrais (haplótipos 9 e 10, 12 a 16) (Figura 5).

A descontinuidade na distribuição de um táxon, como ocorre na população de *Melipona* sp., formando duas populações estruturadas geograficamente (população formada pelo haplótipo 17 e população formada pelos haplótipos 6, 7 e 8) é chamada disjunção geográfica, onde as populações proximamente relacionadas são separadas por grandes distâncias geográficas. Este fenômeno envolve eventos de vicariância ou de dispersão a longa distância (Silveira *et al.,* 2002).

Se o evento de separação das populações de *Melipona* sp. desta espécie e *M. flavolineata* foi de vicariância ou de dispersão não é possível inferir, pois a data desta separação não foi possível estimar, uma vez que os genes utilizados neste trabalho não estavam calibrados para o relógio molecular em abelhas. Mas pode-se sugerir que houve, em dado momento da história evolutiva dessas abelhas, a separação de *M. flavolineata* e *Melipona* sp. e desta última em duas populações, uma a sudoeste (Hap 17) e outra ao sul (Hap 6, 7 e 8). Ressalta-se que este resultado deve ser visto com cuidado, pelo fato de poucas amostras terem sido utilizadas nas análises.

A rede de haplótipos relativa ao grupo 2, formado por abelhas *M. mondury* e *M. rufiventris* está de acordo com os resultados das análises filogenéticas que mostram a separação de *M. mondury* e *M. rufiventris* em clados diferentes (Figura 3). A separação destas duas espécies em dois clados distintos é suportada por estudos empregando caracteres morfológicos (Melo, 2003) e moleculares (Tavares *et al*., 2007).

Um resultado que chama atenção na rede de haplótipos do grupo 2 (Figura 6B) é o de que os haplótipos 4 e 5 identificados em *M. rufiventris* estão separados por dezessete passos mutacionais dos haplótipos 1 e 3, separação esta que não foi observada na rede de haplótipos resultante das análises feitas por Lopes (2008). Considerando que as abelhas com haplótipos 3 e 5 foram amostradas em localidades próximas, da mesma forma que as abelhas com haplótipos 4 e 1 (Figura 6A) esta grande divergência não sugere que os haplótipos 4 e 5 constituem uma população de *M. rufiventris* isolada geograficamente. Assim como o ramo longo da árvore filogenética (Figura 3), os dezessetes passos mutacionais que separa os haplótipos 4 e 5 dos demais

haplótipo de *M. rufiventris* na rede de haplótipos levam a acreditar na existência de uma espécie críptica. Mas como já dito, é possível que esta divergência seja em função do transporte de colônias de *M. rufiventris* entre as localidades amostradas, além do baixo número de amostras. Por tanto, apesar da proximidade geográfica entre os indivíduos de *M. rufiventris* analisados, o que está influenciando a separação destes dois haplótipos (haplótipos 4 e 5) observando a rede de haplótipos, não é possível definir ao certo. Da mesma forma, não é compreensível a separação do haplótipo 2, de Patos de Minas-MG, que está separado por pelo menos quatro passos mutacionais dos demais haplótipos de *M. rufiventris* (figura 6). Estudos mais detalhados, que utilizem outros genes bem como uma amostragem representativa da região de ocorrência de *M. rufiventris,* poderão resultar em dados que permitam inferências sobre o que pode estar influenciando estas variações e sobre a existência ou não de uma espécie diferente de *M. rufiventris*.

Ainda analisando a rede do grupo 2 segundo Templenton *et al.* (1992), como os haplótipos 4, 5, 18 e 19 estão nas extremidades da rede, sugere-se que os mesmos tenham surgidos mais recentemente que os haplótipos 1, 2 e 3, que estão ao centro. Por tanto, a origem de *M. mondury* (haplótipos 18 e 19) estaria em alguma região próxima ao oeste de Minas Gerais e Goiás (Figura 6). Observa-se que a população formada pelos haplótipos 4 e 5 não se separou das demais *M. rufiventris* analisas por uma barreira geográfica, uma vez que elas são próximas geograficamente, além de pertencerem a uma mesma localidade, como é caso dos haplótipos 3 e 5 que pertencem à Luziânia-GO.

Como já mencionado, não é possível inferir a data nem o evento de separação de *M. mondury* e *M. rufiventris* uma vez que os genes utilizados neste trabalho não estão calibrados para o relógio molecular. Porém relatos de estudos anteriores sugerem que a data para separação destas duas espécies seria a mesma da formação dos biomas Mata Atlântica e Cerrado, uma vez que *M. mondury* é encontrada apenas em áreas de mata e *M. rufiventris* em áreas de cerrado (Melo, 2003; Tavares *et al*., 2007).

Embora o presente estudo tenha contribuído com dados que possam ser utilizados para o entendimento das relações filogenéticas e história evolutiva da possível nova espécie do complexo *rufiventris* e a relação desta com suas espécies irmãs, os resultados obtidos apresentam limitações, e determinadas

inferências não podem ser feitas. Uma alternativa seria aumentar a amostragem em estudos futuros. Investimentos em coletas nas áreas de ocorrência das abelhas do complexo *rufiventris* devem ser realizados. Análises filogenéticas com uma amostragem maior, juntamente com a utilização de outros genes, poderão resultar em outros dados que contribuirão para ampliar o conhecimento a cerca da taxonomia, biogeografia e história evolutiva desta "nova" espécie bem como para o complexo *rufiventris* em geral.

Os resultados deste estudo representam um avanço em relação ao conhecimento a cerca de *Melipona* sp. e do complexo *rufiventris* como um todo. No entanto, é necessário continuar estudando este grupo de abelhas com uma amostragem maior e com análise de outros genes, de preferência que estejam calibrados para o relógio molecular.

O estudo realizado apresenta informações que certamente contribuirão em futuros estudos visando obter conhecimentos relativos á filogenia, taxonomia, biogeografia e história evolutiva de *Melipona* sp., bem como do complexo *rufiventris* em geral.

CONCLUSÕES

A filogenia das espécies do complexo *rufiventris* avaliadas neste estudo mostra considerável divergência genética entre elas visto a divisão das mesmas em quatro clados bem definidos.

Dentre as abelhas do complexo *rufiventris* avaliadas há uma espécie ainda não descrita (*Melipona* sp.) a qual apresenta uma distribuição ampla, indo do noroeste de Minas Gerais, passando pelo estado do Tocantins até os estados do Maranhão, Piauí e Ceará.

O ancestral do grupo *Melipona* sp. e *M. flavolineata* pode ter vivido em região entre os estados do Maranhão, Piauí e Ceará.

Apesar da proximidade geográfica entre os indivíduos de *M. rufiventris* analisados, parece haver algum evento influenciando a separação dos haplótipos detectados em *M. rufiventris* dentro da área de amostragem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akaike H (1985). Predition and entropy. In: Aktkinson AC and Fienberg SE: A celebration of statistc. Springer-Verlag, Berlim, 1-24.

Amorim DS (1997). Elementos básicos de sistemática filogenética. 2ª. ed. Ribeirão Preto: Holos, 276 p.

Avise JC, Arnold J, Ball RM , Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Annual Review Ecology Systematic, 18, 489-522.

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution 16, 37-48.

Barni GS, Strapazzon R, Guerra Jr. JCV. Moretto G (2007). Mitochondrial genome differences between the stingless bees *Melipona rufiventris* and *Melipona mondury* (Apidae: Meliponini). Genetic and Molecular Research, 6 (1), 8-14.

Batalha-Filho H (2008). Distribuição geográfica, filogeografia e história evolutiva da abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, MG.

Bawa KS (1990) Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. Annual Review Ecology Systematc, 2,399-422.

Camargo JMF and Pedro SRM (1992). Sistematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini review. Apidologie, 23, 509-522.

Camargo JMF, Pedro SMR (2007) Meliponini. In: Catalogue of Bee (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region (orgs Moure JS, Urban D, Melo GAR), pp. 272–578. Curitiba, Sociedade Brasileira de Entomologia.

Cameron SA, Hines HM and Willians PH (2007). A Comprehensive phylogeny of the bumble bees (*Bombus*). Biological Journal of the Linnean Society, 91, 161-188.

Caterino MS, Cho S, Sperling FAH (2000).The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. Annual Review Entomology, 45,1-54.

Costa MA, Del Lama MA, Melo GAR, Sheppard WS (2003). Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondria 16S rDNA sequences. Apidologie, 34,73–84.

Crozier RH and Crozier YC (1993). The mitochondrial genome of the honeybee Apis mellifera: complete sequence and genome organization. Genetics, 133, 97– 17.

Danforth, BN, Sipes S, Fang, J, Brady SG (2006). The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 103, 15118–15123

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. Genome Research, 8, 175–185.

Ewing B and Green P (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. Genome Research, 8, 186–194.

Fernandes-Salomão TM, Rocha RB, Campos LAO, Araújo EF (2005). The first internal transcribed spacer (ITS1) of *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): characterization and phylogenetic analysis. Insectes Sociaux, 52, 11–18.

Gordon D, Abajian C, Green P (1998). Consed: A graphical tool for sequence finishing. Genome Research, 8, 195–202.

Guimarães-Dias F, Waldschmidt AM, Batalha-Filho H, Tótaro P, Salomão TMF, Tavares MG, Campos LAO (2007). Diversidade genética em *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) por meio de marcadores ISSR. 53º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia, SP, Brasil.

Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22, 4673–4680.

Huelsenbeck JP & Ronquist F (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic tree. Bioinformatics, 17, 754–755.

Inoue H, Nojima J, Okayma H (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene, 96, 23-28.

Kerr WE (1994). Progresso na genética de abelhas. Anais do X Congresso Brasileiro de Apicultura, 10, 264-277.

Kerr WE, Carvalho GA, Nascimento VA (1996). Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação. Belo Horizonte, Acangaú.

Kevan PG and Baker HG (1983). Insects as flower visitors and pollinators. Ann. Rev. Ent, 28: 407-53.

La Salle J and Gauld ID (1993). Hymenoptera: Their diversity and their impact on thediversity of other organisms. In: La Salle J, Gauld ID (Eds.). Hymenoptera and Biodiversity, 348 p.

Leys R, Cooper SJB, Sshwarz MP (2000). Molecular phylogeny of large carpenter bees, genus *Xylocopa* (Hymenoptera: Apidae), based on mitochondrial DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, 3, 407-418.

Leys R, Cooper JB, Schwarz MP (2002). Molecular phylogeny and historical biogeography of the large carpenter bees, genus *Xylocopa* (Hymenoptera: Apidae). Biological Journal of the Linnean Society, 77, 249–266

Lopes DM (2008). Análises moleculares em *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, MG.

Melo GAR (2003). Notas sobre meliponíneos neotropicais (Hymenoptera, Apidae), com a descrição de três novas espécies. In: Apoidea Neotropica. Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure. UNESC, Santa Catarina, Brasil. p. 85-92.

Menezes AML, Carvalho GA, Nascimento VA, Aidar DS, Kerr WE (1993). Transporte de rainhas fisiogástricas – novo método para seleção e aumento da população geneticamente ativa de Meliponíneos. Revista Brasileira de Genética, 16(3), 322.

Meyer A and Zardoya R (2003). Recent advances in the (molecular) phylogeny of vertebrates. Annual Review Ecology Evolution Systematic, 34, 311–38.

Michel-Salzat A, Cameron SA and Oliveira ML (2004). Phylogeny of the orchid bees (Hymenoptera: Apinae: Euglossini): DNA and morphology yield equivalent patterns. Molecular Phylogenetics and Evolution, 32, 309–323.

Michener CD (2000).The bees of the world. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, 913 p.

Moreto G and Arias MC (2005). Detection of mitochondrial DNA restriction site differences between the subspecies of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). Neotropical Entomology, 34, 381-385.

Moure JS and Kerr WE (1950). Sugestões para a modificação da sistemática do gênero Melipona (Hymenoptera, Apoidea). Dusenia, 1,105-129.

Moure JS (1975). Notas sobre as espécies de *Melipona* descritas por Lepeletier em 1836 (Hymenoptera: Apidae). Revista Brasileira de Biologia, 35(4), 615-623.

Neff JL and Simpson BB (1993). Bees, pollination system and plant diversity. In: LaSalle J, Gauld ID (eds) Hymenoptera and Biodiversity. CAB International, p. 143-167.

Nylander JAA, Ronquist F, Huelsenbeck JP, Nieves-Aldrey JL (2004). Bayesian phylogenetic analysis of combined data. Systematic Biology, 53, 47–67.

Posada D and Crandall KA (1998). Modeltest: Testing the model DNA substituition. Bioinformatics, 14, 817-818.

Proctor M, Yeo P, Lack A (1996). The natural history of pollination. London: Harper Collins Publishers, 479 p.

Rambaut A (2009). FigTree v1.3.1. Adquirido em: http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/.

Rasmussen C and Cameron SA (2007). A molecular phylogeny of the Old World stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) and the non-monophyly of the large genus *Trigona*. Systematic Entomology, 32, 26–39.

Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003). DNAsp, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19, 2496–2497.

Rydley M (2006). Evolução. Tradução: Ferreira, H., Passaglia, L. Ficher, R. 3ª ed: Porto Alegre, Artmed.

Schaefer H and Renner SS (2008). A phylogeny of the oil bee tribe Ctenoplectrini (Hymenoptera: Anthophila) based on mitochondrial and nuclear data: Evidence for Early Eocene divergence and repeated out-of-Africa dispersal. Molecular Phylogenetics and Evolution, 47,799–811.

Schetino MAA (2005a). Filogeografia de *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury*: Contribuição para a elucidação do padrão de distribuição geográfico, inferências taxonômicas e preservação. Viçosa, MG: UFV. Monografia (Curso de Biologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Schetino MAA, Pires CV, Fernandes-Salomão TM, Tavares MG, Campos LAO (2005b). Diferenciação genética em populações das abelhas *Melipona mondury* e *Melipona rufiventris*: análise do DNA total e do DNA mitocondrial por RFLP. In: 51º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia. 51º Congresso Brasileiro de Genética.

Silva FO, Tavares MG, Batalha-Filho H, Waldschmidt AM, Fernandes-Salomão TM, Campos LAO (2007). Variabilidade genética em populações de abelhas do complexo *rufiventris* (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) no Brasil. In: 53º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia, SP, Brasil.

Silveira FA, Melo GAR, Almeida EAB (2002). Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. Fundação Araucária: Belo Horizonte, 253p.

Silvestre D (2002). Seqüenciamento e análise do genoma mitocondrial de *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências - USP.

Silvestre D, Dowton M, Arias MC (2008). The mitochondrial genome of the stingless bee *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Sequence, gene organization and a unique tRNA translocation event conserved across the tribe Meliponini. Genetics and Molecular Biology, 31(2), 451-460.

Simon C, Frati F, Beckenbach 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 of the Entomological Society of America, 87, 651–701.

Sipes SD and Wolf G (2001). Phylogenetic Relationships within *Diadasia*, a Group of Specialist Bees. Molecular Phylogenetics and Evolution.19, 144–156.

Smith DR and Hagen RH (1997). The Biogeography of *Apis cerana* as revealed by mitochondrial DNA sequence data. Journal of Kansas Entomologic Society. 69, 294-310.

Souza CS, Kerr WE, Bonetti, AN, Souza CS, Santana FA, Goulart LR, Oliveira RC, Vieira CU, Vasconcelos SM (2003). Comparação das técnicas de SSCP, DS-PCR, PCR-RFLP para detecção de mutação no gene mitocondrial 16S rRNA em populações de *Melipona rufiventris*. Bioscience Journal, 19, 65-70.

Swoffrd DL (1998). PAUP- A computer program for phylogenetic inference using Maximum Parsimony and other methods. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachsetts.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 10.1093/molbev/msm092.

Tavares MG, Dias LAS, Borges AA, Lopes DM, Busse AHP, Costa RG,Salomão TMF, Campos LAO (2007). Genetic divergence between populations of the stingless bee uruçu amarela (*Melipona rufiventris* group, Hymenoptera, Meliponini): Is there a new *Melipona* species in the Brazilian state of Minas Gerais? Genetics and Molecular Biology, 30, 667-675.

Templeton AR, Crandall KA and Sing CF (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence. Cladogram estimation. Genetics, 132, 619-633.

Velthuis HHW (1997). Biologia das abelhas sem ferrão. Universidade de São Paulo e Universiteit Utrecht, 377.

Viana BV and Melo GAR (1987). Conservação de Abelhas. Informativo Agropecuário 13(149).

Weinlich R, Francisco FO, Arias MC (2004). Mitochondrial DNA restriction and genomic maps of seven species of Melipona (Apidae: Meliponini). Apidologie, 35, 365–370.

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