

JOSEMAR DE CARVALHO RAMOS

**ESTRUTURA GENÉTICA DE *Melipona capixaba* MOURE E CAMARGO,  
1994 (HYMENOPTERA: APIDAE)**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2009

JOSEMAR DE CARVALHO RAMOS

**ESTRUTURA GENÉTICA DE *Melipona capixaba* MOURE E CAMARGO,  
1994 (HYMENOPTERA: APIDAE)**

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

APROVADA: 06 de agosto de 2009.

---

Prof. Jorge A. Dergam dos Santos

---

Prof. Luíz Antônio dos Santos Dias

---

Prof.<sup>a</sup> Mara Garcia Tavares  
(Co-orientadora)

---

Prof. Lúcio Antônio de Oliveira  
Campos (Co-orientador)

---

Prof.<sup>a</sup> Tânia Maria Fernandes Salomão  
(Orientadora)

**A Deus, a meus pais, a meus irmãos,  
à minha amada Daniele e  
à minha orientadora.**

**Dedico.**

“A verdadeira sabedoria está nos livros não escritos, isto é, nas folhas de papel em branco, reunidas em volumes encadernados. Neles reside a essência do conhecimento. Nenhuma teoria falsa, nenhum erro. Como se o saber fora de discussão se assinalasse ali. O saber é branco, as mentiras são coloridas e as letras são a representação de sofismas ou enigmas carentes de interpretação.”

*Carlos Drummond de Andrade*

## **AGRADECIMENTOS**

### **Agradeço com toda minha essência**

A Deus, pelo dom;

A meus pais José Ramos Moreira e Maria Helena Moreira, mestres na vida. Ainda que distantes, ouço suas frases agradáveis de apoio nos momentos mais críticos;

A meus irmãos Lanuce, Laerte, Cícero, Rívia, Deusnir, Sávio e, em especial, Ramom e Nardely, pelo apoio e incentivo sempre. Vocês são pilares fundamentais dessa conquista;

À minha esposa Daniele, pessoa maravilhosa que modificou minha vida;

À minhas cunhadas e cunhados, pela torcida;

À Mariana Machado, Daniela Resende e Marlúcia Rocha, minhas professoras de graduação que me deram todo apoio para meu ingresso na pós-graduação;

A Nilton Costa e Eva Maria Costa, pela boa vontade em ajudar;

Aos amigos dos quais perdi o contato, mas não o sentimento de amizade;

Aos amigos do laboratório (Helder, Margarete, Evelize, Henrique, Juliano, Maikon, Filipe, David, Caio, Paulo, Marcília, Denilce, Denize, Aline, Camila, Sabrina e Étori) pela solução de dúvidas e pelas conversas descontraídas;

Aos amigos das disciplinas e das repúblicas, em especial Kener e Marcos, pelos momentos de risos e compartilhamentos;

À professora Tânia, por ter me recebido como orientado, pela disponibilidade, boa vontade, palavras de conforto e pelo apoio desde o início;

Ao professor Lúcio, pela prontidão em ajudar;

À professora Mara;

Ao professor Serrão, pelo apoio;

A Helder Canto Resende e Iris Stanciola, pelas coletas no campo.

A meus avós, presenças marcantes em minha vida;

Aos familiares, em especial aos tios Emília, Alecir, Ronaldo e Alzemira, pelas palavras de força;

A todos, em especial à Estela, que nos momentos de oração colocaram a mim e Daniele nas intenções;

À Universidade Federal de Viçosa, uma potência no ensino e pesquisa;

À equipe dos Departamentos de Biologia Geral e de Biologia Celular e Estrutural, em especial à Beth, Diana e Monteiro, pela presteza e empenho em busca do melhor para a instituição;

A CAPES, pela bolsa concedida e à FAPEMIG pelo financiamento da pesquisa;

Aos demais professores, em especial prof. Jorge Dergan e prof. Luíz Antônio, pela disponibilidade e colaborações;

Em fim, a todos que torceram para essa conquista. Sou eternamente agradecido!

## SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações gerais	1
1.2 Marcadores moleculares baseados em PCR-RFLP	6
1.3 DNA ribossomal nuclear (rDNA) e mitocondrial (mtDNA) em estudos genéticos	7
2 OBJETIVOS	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Amostragem	14
3.2 Extração de DNA	16
3.3 PCR-RFLP do mtDNA e do rDNA nuclear	16
3.4 Digestão com enzimas de restrição	19
3.5 Análises dos dados	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5 CONCLUSÕES	37
6 ANEXO	38
7 REFERÊNCIAS	44

## RESUMO

RAMOS, Josemar de Carvalho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2009.: **Estrutura genética de *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994 (Hymenoptera: Apidae)**. Orientadora: Tânia Maria Fernandes Salomão. Co-orientadores: Lúcio Antônio de Oliveira Campos e Mara Garcia Tavares.

A abelha indígena *Melipona capixaba*, popularmente conhecida como "uruçu preto" ou "uruçu negra", é endêmica da região serrana do Estado do Espírito Santo, Brasil, e está incluída, desde 2003, na lista de espécies ameaçadas do IBAMA, sendo o único inseto eussocial nesta lista. Com o objetivo de caracterizar a diversidade genética e estrutura populacional dessa abelha, foram realizados estudos com operária de *M. capixaba* coletadas em diversas localidades abrangendo os municípios de Afonso Cláudio, Alfredo Chaves, Conceição do Castelo, Domingos Martins, Marechal Floriano, Santa Maria de Jetibá, Santa Tereza, Vargem Alta e Venda Nova do Imigrante. Empregando *primers* específicos, o DNA total de 93 operárias de *M. capixaba* foi utilizado para amplificar sequências completas da região ITS-1/5.8S/ITS-2 (ITS/5.8S) do rDNA nuclear e da região tRNA<sup>Tyr</sup>/COI/tRNA<sup>Leu</sup>L2 (tRNA/COI) do mtDNA seguido pela digestão com enzimas de restrição e caracterização dos padrões eletroforéticos de restrição. Nenhum polimorfismo foi identificado na região ITS/5.8S sugerindo vulnerabilidade em termos de variabilidade genética da espécie. Em contrapartida, 8 haplótipos mitocondriais tRNA/COI, embora com pouca divergência entre eles, foram identificados. Haplótipos tRNA/COI compartilhados entre grupos de amostras procedentes de diferentes localidades foram observados. Uma possível explicação para este compartilhamento de haplótipos é a prática comum de transporte de colônias por meliponicultores na região amostrada. Análises por AMOVA resultaram na observação de que esse transporte de colônias pode estar contribuindo para a diminuição da endogamia, e assim, favorecendo a preservação da espécie. Os valores de  $\Phi_{ST}$  obtidos foram acima de 0,25 (0,41 e 0,36 antes e depois do transporte de colônias, respectivamente), sugerindo alta estruturação geográfica da população de *M. capixaba* analisada. A rede de haplótipos e as



árvores UPGMA e Dollo Parcimônia obtidas mostraram baixa divergência genética entre os haplótipos identificados e a mesma divisão de grupos de haplótipos. Esforços no sentido de conduzir o manejo e conservação de *M. capixaba* devem ser efetuados visando elevar a população em número de colônias, preservar a diversidade genética, reintroduzir colônias, da mesma região ou da região mais próxima, em áreas onde essa espécie foi extinta ou está drasticamente reduzida, bem como assegurar a integridade de toda sua restrita área de ocorrência que se encontra bastante degradada.

## ABSTRACT

RAMOS, Josemar de Carvalho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, august of 2009.: **Genetic structure of *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994 (Hymenoptera: Apidae)**. Adviser: Tânia Maria Fernandes Salomão. Co-advisers: Lúcio Antônio de Oliveira Campos and Mara Garcia Tavares.

The bee specie *Melipona capixaba*, popularly known as "uruçu negra" (black uruçu), is endemic in the mountainous region of the State of Espírito Santo, Brazil, and it is included since 2003 in the list of threatened species of IBAMA, the only eusocial insect in this list. In order to characterize the genetic diversity and populational structure of this bee, studies were performed with *M. capixaba* worker collected at various locations, covering the municipalities of Afonso Cláudio, Alfredo Chaves, Conceição do Castelo, Domingos Martins, Marechal Floriano, Santa Maria de Jetibá, Santa Teresa, Vargem Alta and Venda Nova do Imigrante. Using specific *primers*, DNA of 93 *M. capixaba* workers was used to amplify the complete sequences of the regions ITS-1/5.8S/ITS-2 (ITS/5.8S) of nuclear rDNA and tRNA<sup>Tyr</sup>/COI/tRNA<sup>Leu</sup>L2 (tRNA/COI) of mtDNA followed by digestion with restriction enzymes and characterization of the electrophoretic patterns of restriction. No polymorphism was identified in ITS/5.8S region, suggesting vulnerability in terms of genetic variability. In contrast, 8 mitochondrials tRNA/COI haplotypes, but with little genetic difference between them, were identified. tRNA/COI haplotypes shared among samples groups from different locations was observed. A possible explanation for this haplotypes sharing is the common practice of transporting colonies by beekeepers in the survey area. Analysis by AMOVA resulted in the observation that these colonies transport may be contributing to the inbreeding reduction, and thus favoring the species preservation.  $\Phi_{ST}$  values obtained were above 0.25 (0.41 and 0.36 before and after colonies transportation, respectively), suggesting high geographic structuring of the analyzed *M. capixaba* population. The haplotypes network, UPGMA and Dollo Parsimony trees obtained showed low genetic divergence between the identified haplotypes and the same division of haplotypes groups. Efforts to lead the management and conservation of *M. capixaba* must be made in order to

increase the population number of colonies, to preserve the genetic diversity, reintroduce colonies of the same region or closest region in areas where this species has become extinct or are dramatically reduced, and ensure the integrity of all its restricted area of occurrence that is highly degraded.

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 – Considerações Gerais

As abelhas e o vento são os vetores de pólen mais importantes do mundo (Michener, 2000). As abelhas asseguram a manutenção do ciclo de reprodução sexuada de algumas plantas e, conseqüentemente, a disponibilidade de alimento para outros animais. Assim, a extinção de uma espécie de abelha pode afetar uma ou mais espécies de plantas por ela polinizadas, bem como de animais que dependem dessas plantas para se alimentarem (Campos, 1998).

Segundo Moure et al. (2007), a Subfamília Apinae inclui a Tribo Meliponini que compreende 33 Gêneros neotropicais (incluindo 1 extinto) e centenas de espécies. As abelhas da Tribo Meliponini são popularmente conhecidas como “abelhas indígenas sem ferrão” por possuírem o ferrão atrofiado, o que as tornam incapazes de ferroar (Kerr e Lelo, 1962). Apesar do ferrão atrofiado as operárias são, geralmente, muito efetivas na defesa de seus ninhos. Elas jogam o corpo, beliscam a pele, puxam pelos e fios de cabelo e, como exemplo as espécies do gênero *Oxytrigona* popularmente conhecidas como “cagafogo”, podem até ejetar um líquido cáustico de suas mandíbulas que queima a pele (Wilson, 1971; Moure et al., 2007).

As abelhas da Tribo Meliponini estão entre as mais diversas em termos de morfologia e comportamento biológico dentre as abelhas eussociais (Michener, 2000). Os meliponíneos apresentam castas bem definidas, as quais incluem a rainha, as operárias e o zangão (Giannini e Bego, 1988; Michener, 2000). A divisão de trabalho é, também, claramente definida e as diferentes tarefas realizadas pelas operárias são executadas em uma ordem específica, variando de acordo com a idade ou estágio fisiológico da mesma. Entre outras tarefas desempenhadas em uma colônia pode-se citar a de operárias, geralmente jovens, que alimentam a cria e são chamadas de nutridoras, e a de operárias, geralmente mais velhas, que deixam o ninho para a coleta de

alimentos e são chamadas de forrageiras (Hebling et al., 1964; Wilson, 1971; Michener, 1974).

Muitas espécies de meliponíneos têm tido suas populações grandemente reduzidas. A principal causa dessa redução é a destruição dos ambientes naturais, pois, esses insetos formam um grupo isolado e especializado, cujos indivíduos dependem das características climáticas e florísticas de suas regiões de origem, bem como de substratos naturais para nidificação. Essa destruição tem sido causada por desmatamentos, uso indiscriminado de agrotóxico e pela ação predatória de meleiros, que derrubam árvores para obter o mel, deixando o ninho aberto e exposto à ação de predadores (Kerr et al., 1999).

Dentre os meliponíneos encontra-se *Melipona (Michmelia) capixaba* Moure & Camargo, 1994, popularmente conhecida como “uruçu preto”, ou “uruçu negra” e descoberta no sudeste do Brasil, em Domingos Martins no Estado do Espírito Santo. Essa espécie foi incluída na lista de espécies ameaçadas de extinção liberada pelo IBAMA em 2003, sendo o único inseto social nesta lista. *M. capixaba* é considerada como “espécie vulnerável”, o que significa que esta enfrenta risco de extinção na natureza devido à redução, maior ou igual a 50 % do tamanho da população, durante os últimos 10 anos ou três gerações, ou ao fato de sua população ter sido estimada em menos de 10.000 colônias.

As operárias de *M. capixaba* são robustas, de tamanho relativamente grande, comprimento total aproximado de 10,8 mm, distingue-se das outras espécies do Gênero por apresentar cabeça e tórax predominantemente castanho-escuros, mesonoto negro, liso e brilhante com pilosidade fusca, faixas pré-marginais dos tergos metassomáticos quase nulas e desenhos amarelos no clípeo e paraoculares inferiores (Moure e Camargo, 1994). A **Figura 1** ilustra exemplares de *M. capixaba*.

A espécie *M. capixaba* parece estar restrita a formações florestais localizadas na região serrana do Estado do Espírito Santo em altitudes que variam de 800 a 1200 metros. Sua área de ocorrência natural abrange os municípios de Afonso Cláudio, Alfredo Chaves, Castelo, Conceição do Castelo, Domingos Martins, Marechal Floriano, Santa Maria de Jetibá, Santa Tereza, Vargem Alta e Venda Nova do Imigrante.



**Figura 1** – Exemplos de *Melipona capixaba*.

A interação de *M. capixaba* com várias angiospermas da mata atlântica e de cultivo é conhecida. Nascimento (1996) lista algumas dessas espécies, sendo a “jabuticabeira” (*Myrciaria cantiflora*), o “coquinho” ou “palmito vermelho” (*Euterpe espirosantense*), o “araçá” (*Psidium* sp.), o “milho” (*Zea mays*) e o “eucalipto” (*Eucalyptus* sp.) visitadas por *M. capixaba* para alimentação e a “canela” (*Ocotea* sp e *Nectandra* sp.), o “ipê” (*Tabebuia serratifolia*) e o “Murici” (*Byrsonima seriaceae*) utilizadas tanto para alimentação quanto para nidificação. Recentemente, Resende et al. (2008) observaram, com base em análise de polinários presos ao escutelo de operárias coletadas nos municípios de Conceição do Castelo e Venda Nova do Imigrante, que *M. capixaba* pode ser polinizadora de orquídeas da Subtribo Maxillariinae.

O comportamento biológico dos meliponíneos é característico. As rainhas de meliponíneos, ao contrário de *Apis* que é fecundada em média por 17 machos durante o vôo nupcial, geralmente acasalam-se somente com um macho (Kerr, 1969). Em Meliponini, assim como na maioria dos Hymenoptera, os machos são haplóides e as fêmeas são diplóides. Porém alelos sexuais ( $xo$ ) em homozigose ( $xo^1xo^1$ ) induzem ao desenvolvimento de machos diplóides. Assim, se uma rainha de *Melipona* portando alelos sexuais  $xo^1xo^4$  acasala-se com um macho portador do alelo  $xo^1$  ou  $xo^4$ , 50 % de sua prole diplóide será composta por machos (Mackensen, 1951; Kerr, 1987; Nascimento, 1996). Esses machos diplóides, geralmente, são inviáveis e depois que nascem são eliminados da colônia pelas operárias que também matam a rainha (Camargo, 1977). Somente colônias fortes sobrevivem a esse processo devastador.

Dessa forma, – considerando que em populações pequenas da maioria dos animais, quanto menor a área de sua ocorrência, maior é a possibilidade de endogamia e menor é a variabilidade genética – a probabilidade de diminuição da variabilidade genética e o risco de extinção dos meliponíneos são ainda maiores. Além de a endogamia originar machos diplóides inviáveis as colônias, por possuírem rainhas fisogástricas (Wilson, 1971), não fogem do local em que vivem, no caso de perturbações como o fogo ou desmatamento, tornando-se extremamente suscetíveis á degradação do ambiente.

Nascimento (1996) estimou o número de alelos sexuais para a população de *M. capixaba* em Domingos Martins como sendo 24, e para manter este número seria necessária uma população míninima viável com cerca de 1000 colônias na mesma área. Para abrigar essa quantidade de colônias seriam necessários cerca de 28,26 Km<sup>2</sup> de mata. Os fragmentos de Mata Atlântica remanescentes na região, entretanto, têm em média 12,56 Km<sup>2</sup>, separadas por espaços de 2 a 11 km de campos ou culturas. Nesta mesma região Melo (1996) observou a presença de apenas 17 ninhos desta espécie, sendo 12 localizados em uma fazenda, quatro em outra e um encontrado em condições naturais.

Para o presente estudo, expedições foram realizadas abrangendo os municípios de Afonso Cláudio, Alfredo Chaves, Castelo, Conceição do Castelo, Domingos Martins, Marechal Floriano, Santa Teresa, Santa Maria de Jetibá, Vargem Alta e Venda Nova do Imigrante, todos eles localizados na porção sul

do Estado do Espírito Santo. Um total de 142 colônias de *M. capixaba* foram amostradas sendo que apenas 9 delas encontravam-se em mata nativa. As demais colônias encontravam-se em criatórios caseiros.

Poucos estudos genéticos com *M. capixaba* foram reportados até o momento. Nascimento et al. (2000) descreveram evidências de hibridização entre *M. capixaba* e *M. scutellaris* (abelha comum na chapada Diamantina no Estado da Bahia), sugerindo que essas duas espécies são evolutivamente muito relacionadas.

Benevenuto et al. (2008) utilizando marcadores microssatélites, analisaram 24 colônias de *M. capixaba* coletadas em localidades dos municípios de Domingos Martins, Afonso Cláudio, Venda Nova do Imigrante e Conceição do Castelo. Os resultados mostraram baixa estruturação genética da população de *M. capixaba* analisada. Os autores ressaltaram necessidade de estudo aprofundado analisando maior número de colônias.

Nogueira (2009) utilizou a técnica de ISSR para estudar 95 operárias de *M. capixaba* (uma de cada colônia) coletadas em 25 localidades do Estado do Espírito Santo. Os resultados mostraram que a população analisada apresentava alta estruturação com alta similaridade genética entre colônias.

Os conhecimentos referentes à biologia e genética de *M. capixaba* ainda são poucos e já chamam a atenção para o potencial risco de extinção dessa abelha e, portanto, para a necessidade de elaboração de um plano de manejo adequado para a espécie. Esse manejo deve envolver a conservação e a recuperação de habitats, a educação de meliponicultores e até mesmo a reintrodução de colônias em outras localidades para o aumento da população efetiva e da variabilidade genética.

Para a elaboração de um projeto de manejo e conservação adequado para *M. capixaba* é importante conhecer as características físicas específicas da região onde esta abelha ocorre, a disponibilidade de recursos no ambiente – principalmente alimento, substratos para nidificação e materiais de construção para o ninho – (Westrich, 1996), bem como a distribuição da variabilidade genética existente na população e as necessidades específicas da espécie.

Ampliar os estudos genéticos com *M. capixaba* é, no momento, necessário. Os conhecimentos adquiridos serão importantes para o estabelecimento de procedimentos que visem à manutenção do fluxo gênico e



da variabilidade genética da população, que são fundamentais na elaboração de estratégias que objetivam a preservação e exploração racional dessa espécie ameaçada de extinção.

## **1.2 – Marcadores moleculares baseados em PCR-RFLP**

Marcador molecular é definido como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de uma sequência específica de DNA correspondente a uma região expressa ou não. Quando um marcador molecular tem um comportamento de acordo com as leis de Mendel, ele é também definido como um marcador genético (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Existem diversas técnicas de biologia molecular que permitem a obtenção de um grande número de marcadores moleculares ao nível de DNA. Essas técnicas são capazes de cobrir todo o genoma do organismo e detectar variabilidade genética (locos polimórficos), e assim, podem ser úteis para as mais diversas aplicações (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Uma das técnicas atualmente empregadas em estudos genéticos se baseia na detecção de polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*) utilizando enzimas de restrição. Esta metodologia foi inicialmente empregada para detectar polimorfismo de comprimento de restrição de DNA de vírus (Grodzicker et al., 1974). Posteriormente, outros pesquisadores propuseram a utilização dessa técnica para análise genômica, onde o DNA é submetido à restrição por endonucleases e em seguida hibridizado com sondas para a visualização de fragmentos específicos (Botstein et al., 1980; Wyman e White, 1980). Com o advento da técnica de amplificação de fragmentos de DNA via reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) (Mullis e Faloona, 1987; Saiki et al., 1988) passou-se a realizar RFLP diretamente sobre o produto da PCR (PCR-RFLP), descartando a necessidade de utilização de sondas se tornando uma técnica relativamente rápida e eficiente.

Marcadores obtidos com base em RFLP possuem expressão co-dominante, ou seja, em cada loco estudado é possível identificar genótipos

heterozigotos e homozigotos (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Da mesma forma, análise do DNA por PCR, seguido por digestão com enzimas de restrição para determinação do fenótipo (bandas no gel) também possibilita a identificação tanto de homozigotos quanto de heterozigotos (Fujii et al., 1991; Bastos et al., 1998).

O polimorfismo de restrição pode ser ocasionado por mutações em sequências específicas (sítios de restrição), geralmente de quatro a oito pares de bases, reconhecidas pelas endonucleases de restrição ou pode ser causado por inserções, deleções ou outros rearranjos (translocações, inversões) em regiões flanqueadas pelos sítios de restrição (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

### **1.3 – DNA ribossomal nuclear (rDNA) e mitocondrial (mtDNA) em estudos genéticos**

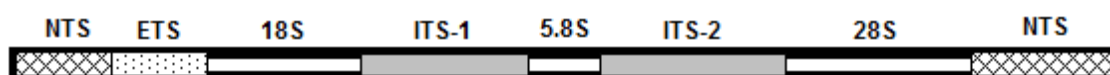
No DNA nuclear de eucariotos existem várias cópias do gene codificador para as subunidades 28S, 5.8S e 18S do rRNA. Esses genes nucleares são compostos pelas regiões conservadas 18S, 5.8S e 28S, regiões semi-conservadas ETS (*external transcribed spacer*), ITS-1 e ITS-2 (*Internal Transcribed Spacer 1 e 2*) e pela região não-conservada NTS (*non-transcribed spacer*) (**Figura 2**) (Sheppard e McPherson, 1991; Lewin, 2000; Gorab, 2001).

As sequências que codificam o pre-rRNA encontram-se organizadas em blocos, conforme a **Figura 2**, repetidos em série, organizados em grupos e ocorrem em número variável nos diversos organismos. Esse conjunto de genes codificadores para pre-rRNA é chamado de rDNA. Nos eucariotos superiores, centenas de cópias desses genes estão organizadas em uma ou mais regiões cromossômicas, principalmente na região nucleolar (Lewin, 2000; Gorab, 2001). As unidades individuais do rDNA nuclear não evoluem em total independência uma da outra, um fenômeno que é também conhecido para outros genes e chamado de evolução em concerto. O número elevado de cópias presentes nos grupos de genes pode refletir a necessidade de sintetizar certos produtos gênicos em grande quantidade, como é o caso do rRNA (Nahum, 2001). Embora essas repetições de unidades individuais do rDNA nuclear tenham evoluído juntas, alguns genomas contêm uma considerável

diversidade dessas unidades individuais do rDNA nuclear que são chamadas de unidades parálogas (Buckler, 1997).

Os espaçadores ITS do rDNA (ITS-1 e ITS-2), por serem muito variáveis entre os diferentes organismos e conseqüentemente exibir grande heterogeneidade (Yokota et al., 1989), são frequentemente utilizados para estudos inter e intra-específico.

Esses espaçadores ITS sofrem pressão seletiva menor do que as regiões codificadoras do RNA ribossômico (Shinohara e Lobuglio, 1999). A pressão seletiva nos espaçadores ITS é atribuída ao fato de que esses podem ser necessários para a manutenção da estrutura secundária do pre-rRNA, requerida para um processamento pós transcricional (Sande et al., 1992). A excisão correta dos espaçadores no processamento do pre-rRNA é passo fundamental na biogênese de uma unidade ribossomal ativa (Van Nues et al., 1995; Oliverio et al., 2002).



**Figura 2** – Esquema de uma unidade individual do rDNA nuclear de Apidae. ITS-1 e ITS-2: espaçadores internos transcritos 1 e 2. NTS: espaçador intergênico não transcrito. ETS: espaçador externo transcrito. 18S, 5.8S e 28S: regiões codificadoras das subunidades do RNA ribossomal. ETS e NTS compõem a região espaçadora intergênica (IGS - *intergenic spacer*), que é uma sequência de nucleotídeos localizada entre uma cópia do gene e outra. Adaptado de Sheppard e McPherson (1991).

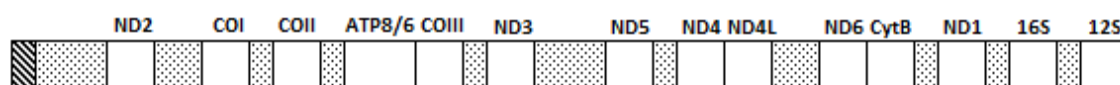
Outra característica importante dos espaçadores ITS, é que eles são flanqueados nas extremidades 5' e 3' por regiões conservadas que são codificadoras do rRNA (5.8S, 18S e 28S) possibilitando a utilização de *primers* heterólogos para a amplificação desses espaçadores via PCR.

O conteúdo genético de uma célula eucariótica não está localizado somente no núcleo. A mitocôndria e o cloroplasto são organelas celulares que também contêm material genético. O DNA mitocondrial é compacto e codifica para um pequeno número de proteínas que são necessárias para a manutenção da organela na célula e as regiões não codificadoras são raras (Lewin, 2000; Alberts et. al, 2004).

O genoma mitocondrial nos organismos de diversos grupos taxonômicos varia tanto em número de pares de bases (pb) quanto na forma molecular

(linear e/ou circular) (Nosek e Tomáška, 2003). A maioria dos animais apresenta mtDNA com tamanho variando de 13 kb a 22 kb e com cerca de 37 genes codificantes (Burger et al., 2003). Erros na replicação, altas concentrações de compostos de oxigênio na mitocôndria capazes de danificar o DNA e um sistema de reparo provavelmente ineficiente, podem ser causas do acúmulo de mutações no mtDNA. Suas características peculiares tais como, a herança uniparental geralmente materna, ausência de recombinação e altas taxas evolutivas quando comparado ao genoma nuclear, tornam o mtDNA uma ferramenta importante no estudo das relações genéticas (Wilson et al., 1985; Hartl e Jones, 1998; Lewin, 2000; Calcagnotto, 2001).

Recentemente, esforços despendidos visando sequenciar o genoma mitocondrial de meliponíneo resultou no sequenciamento de 14.422 pb, cerca de 78 % do tamanho estimado do genoma mitocondrial de *Melipona bicolor*, por Silvestre et al. (2008). A **Figura 3** representa os genes e a ordem gênica identificada.



**Figura 3** – Esquema linear de cerca de 78 % do tamanho estimado do genoma mitocondrial de *Melipona bicolor*. ND2: subunidade 2 da NADH desidrogenase. COI: subunidade 1 do citocromo c oxidase. COII: subunidade 2 do citocromo c oxidase. ATP8/6: subunidade 8 e 6 da ATP sintase. COIII: subunidade 3 do citocromo c oxidase. ND3: subunidade 3 da NADH desidrogenase. ND5: subunidade 5 da NADH desidrogenase. ND4: subunidade 4 da NADH desidrogenase. ND4L: cadeia leve da subunidade 4 da NADH desidrogenase. ND6: subunidade 6 da NADH desidrogenase. CytB: citocromo B. ND1: subunidade 1 da NADH desidrogenase. 16S: rDNA 16S. 12S: rDNA 12S. As partes pontilhadas indicam as posições dos genes de tRNA. A porção rachurada indica uma região não sequenciada. Adaptado de Silvestre et al. (2008).

Estudos populacionais e evolucionários de abelhas têm aumentado nos últimos anos. Marcadores moleculares obtidos com base na análise do rDNA nuclear e do mtDNA têm sido muito úteis nesses estudos.

Fernandes-Salomão et al. (2005) estudaram diferentes espécies de *Melipona* com base em análise de sequências ITS-1 do rDNA nuclear. Sequências ITS-1 completas foram obtidas para *M. quadrifaciata*, *M. mandacaia* e *M. scutellaris*. A comparação entre estas sequências mostrou baixo nível de divergência genética entre *M. quadrifaciata* e *M. mandacaia* e alto nível entre essas duas e *M. scutellaris*. Esses dados sustentam a hipótese

de que *M. quadrifasciata* e *M. mandacaia* divergiram recentemente. Sequências ITS-1 parciais de outras 5 espécies de *Melipona* também foram obtidas. Os resultados da análise filogenética obtida com base na comparação entre todas estas sequências foram claramente concordantes com a classificação dessas espécies baseada em caracteres morfológicos (Moure, 1992; Silveira et al, 2002) nos Subgêneros Eomelita (*M. bicolor* e *M. marginata*), Michmelia (*M. rufiventris* e *M. scutellaris*), Melipona (*M. quadrifasciata* e *M. mandacaia*) e Melikerria (*M. quinquefasciata* e *M. compressipes*).

Embora o sequenciamento de DNA seja um método direto para a análise de diversidade genética entre organismos, variações nas sequências de DNA podem, também, ser identificadas indiretamente utilizando PCR-RFLP, que é uma técnica simples, rápida, eficiente e de alta reprodutibilidade.

Francisco et al. (2001) utilizaram 17 enzimas de restrição para caracterizar, por RFLP, mtDNA total de 5 espécies de *Plebeia*. Trinta sítios de restrição espécie específicos foram identificados e foi demonstrada alta variabilidade genética entre as espécies analisadas.

Fernandes-Salomão et al. (2002) realizaram estudo de caracterização genética comparando padrões RFLP obtidos por análise da região COI/COII do mtDNA e da região ITS-1 do rDNA nuclear de 16 espécies de *Melipona* utilizando 8 enzimas de restrição. Os autores detectaram alto nível de variabilidade genética interespecífica. No entanto, *M. capixaba*, *M. scutellaris* e *M. subnitida* mostraram padrões eletroforéticos RFLP idênticos nas duas regiões analisadas. O mesmo foi observado com *M. quadrifasciata* e *M. mandacaia*. Os resultados foram compatíveis com informações obtidas por Rocha e Pompolo (1998) em estudo por comparação de cariótipo, da composição da cromatina (heterogênea ou homogenia) e do quantitativo de heterocromatina de 23 espécies de meliponíneos brasileiros.

O mtDNA de duas espécies de *Partamona* foi caracterizado por Brito e Arias (2005) utilizando sequenciamento da região COI/COII e análise por PCR-RFLP de diversas regiões do mtDNA utilizando 8 enzimas de restrição. Os resultados obtidos pelas duas metodologias foram concordantes. Os autores sugeriram que a variabilidade encontrada pode ser utilizada para investigar relações filogenéticas entre grupos de *Partamona*.

Songram et al. (2006) estimaram a diversidade genética de *Apis cerana* de diversas regiões da Tailândia empregando PCR-RFLP da região ATPase6-ATPase8 do mtDNA utilizando 33 enzimas de restrição. Dessas, 3 enzimas foram polimórficas e evidenciaram 8 haplótipos. Os autores relataram alta divergência genética entre os indivíduos de diferentes regiões amostradas, porém, dentro das regiões a divergência entre os indivíduos foi baixa.

Taylor et al. (2006) analisaram sequências ITS-1 de indivíduos de 6 espécies de vespa do Gênero *Spalangia* (Hymenoptera: Pteromalidae), coletadas na América do Norte, América do Sul, Europa e Ásia, com o objetivo de determinar relações filogenéticas entre populações do velho e do novo mundo. O tamanho das sequências ITS-1 variou de 655 a 922 pb. Altos níveis de variação entre as sequências foram observados e análise da região ITS-1 por PCR-RFP, utilizando as enzimas *MseI* e *TaqI*, permitiu diferenciar todas as espécies analisadas.

Com base em variações nas sequências do gene 16S do mtDNA detectadas com análises de restrição, utilizando 6 enzimas de restrição, Collet et al. (2007) inferiram relações filogenéticas entre subespécies de abelhas melíferas (*A. mellifera mellifera*, *A. m. scutellata* e *A. m. ligustica*) coletadas no Brasil, no Uruguai, na Colômbia e na Venezuela. Três padrões PCR-RFLP, um para cada subespécie, foram observados quando as enzimas *DraI* ou *VspI* foram utilizadas ou quando digestão dupla foi realizada utilizando as enzimas *VspI* e *EcoRI*.

Barni et al. (2007) analisaram *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury* com base em padrões polimórficos de restrição de 9 regiões mitocondriais utilizando 4 enzimas de restrição. As duas espécies foram discriminadas por 6 sítios de restrição espécie específicos. Os resultados foram concordantes com os relatados por Melo (2003) que avaliou caracteres morfológicos destas duas espécies.

De La Rúa et al. (2007b) analisaram, empregando a técnica PCR-RFLP, a região ITS-2 de *Melipona beecheii* e *M. yucatanica* procedentes de diferentes regiões do México. Os padrões de restrição obtidos utilizando 12 endonucleases permitiram discriminar as duas espécies. Foi possível, também, discriminar três ecótipos de *M. beecheii* associados com a distribuição geográfica e caracterizados com diferentes padrões RFLP ITS-2. Os resultados

mostraram que o espaçador ITS-2, neste caso, foi útil para discriminação intra e interpopulacional. Além disso, os resultados foram concordantes com a diferenciação entre estas duas espécies estimada por caracteres morfológicos e por análise utilizando DNA mitocondrial e microssatélite proposta por Quezada-Euán et al. (2007).

Batalha-Filho et al. (2009) analisaram, por PCR-RFLP da região COI do mtDNA, espécimes compreendendo duas subespécies de *Melipona quadrifasciata* (*M. q. quadrifasciata* e *M. q. anthidioides*) coletadas em 198 localidades no Brasil. Dois padrões RFLP da região COI, quando digerida com as enzimas *HinfI* ou *Mbol*, foram observados. Isso permitiu discriminar *M. q. quadrifasciata*, que possui faixas terçais amarelas contínuas e distribuição geográfica no Brasil que vai do Rio Grande do Sul à porção sul de São Paulo, de *M. q. anthidioides*, que possui faixas terçais amarelas descontínuas e distribuição geográfica que vai da porção norte de São Paulo ao norte da Chapada da Diamantina na Bahia. Moretto e Arias (2005) também diferenciaram essas duas subespécies com base em padrões RFLP utilizando as enzimas *HinfI* e *NdeI* e 9 regiões do mtDNA.

Como visto, informações obtidas por estudos com marcadores moleculares são de grande importância para o conhecimento da variabilidade e da estrutura genética de populações de abelhas. O entendimento da composição genética de uma espécie e de como ela está organizada no ambiente estão entre os principais focos da genética de conservação sendo, assim, útil para a elaboração de estratégias para evitar a perda de alelos e diminuição da diversidade genética. É importante, também, entender como a influência antrópica (fragmentação ou degradação de habitats) está afetando esta estruturação. Do ponto de vista genético, a fragmentação pode alterar o fluxo gênico entre populações ou entre subpopulações tornando-as mais vulneráveis a processos de deriva genética e/ou endogamia. Sendo assim, a obtenção de dados moleculares é fundamental, pois, eles são muito úteis para o desenvolvimento de estratégias efetivas que visem o manejo e a conservação da *Melipona capixaba*, espécie restrita e ameaçada de extinção.

## 2 – OBJETIVOS

### **Geral:**

Ampliar os conhecimentos genéticos sobre *M. capixaba* e obter dados moleculares que possam ser utilizados em futuros programas de manejo e conservação desta espécie ameaçada de extinção.

### **Específicos:**

Estimar a diversidade genética e caracterizar a estrutura populacional de *M. capixaba*;

Avaliar o impacto da translocação de colônias de *M. capixaba* dentro da região amostrada.

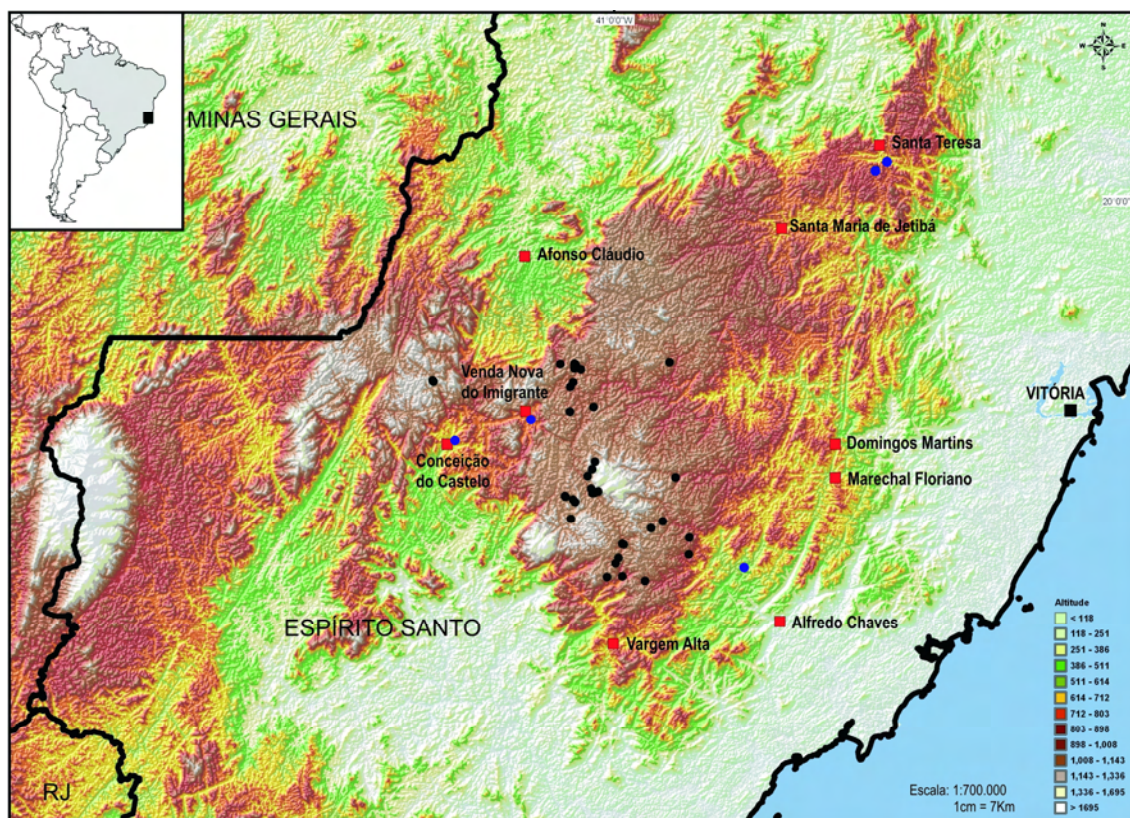


### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 – Amostragem

A área de ocorrência da *M. capixaba*, localizada na região serrana ao sul do Estado do Espírito Santo abrangendo cerca de 2660 km<sup>2</sup>, parece ter como fatores delimitantes o relevo acidentado, altitudes entre 700 a 1200 m, formação vegetal que possivelmente seja típica da região e situações climáticas próprias da região caracterizada por ser chuvosa com temperaturas médias anuais variando entre 10 e 15° C (**Figuras 13 e 14 - ANEXO**). Essa espécie pode estar bem adaptada a esse ambiente específico, o que a torna restrita e talvez incapaz de colonizar outras áreas. Região com condições de relevo e clima semelhantes a essas no Brasil é encontrada somente na região central do estado do Rio de Janeiro.

Foram analisadas amostras de DNA de 93 operárias de *M. capixaba* (uma por colônia) coletadas em 38 pontos na região serrana do Estado do Espírito Santo abrangendo 23 localidades distribuídas em 9 municípios (**Tabela 5 - Anexo, Figura 4 e Tabela 1**). Os pontos de coleta abrangem as cidades que possuem características de altitude e clima iguais ou semelhantes às da região de Pedra Azul, município de Domingos Martins. Após a coleta e transporte, as operárias foram armazenadas em ultrafreezer a -80° C nas dependências da Universidade Federal de Viçosa.



**Figura 4:** Mapa de relevo do Estado do Espírito Santo mostrando a área de coleta de *Melipona capixaba*. ■: Sede dos municípios amostrados. ●: pontos de coleta. ●: pontos de coleta de colônias translocadas.

**Tabela 1** – Municípios e localidades de coleta com suas respectivas coordenadas geográficas e número de amostras

Município	Localidade	Latitude (S)	Longitude (W)	Tamanho Amostral
Afonso Cláudio	Alto Guandu	-20° 14' 45,6"	-41° 04' 48,0"	3
Alfredo Chaves	Matilde	-20° 32' 56,4"	-40° 48' 03,6"	3
Conceição do Castelo	Ribeirão do Meio	-20° 16' 19,2"	-41° 16' 15,6"	8
	São Roque de Maravilha	-20° 33' 25,2"	-40° 51' 43,2"	2
Domingos Martins	São Bento de Urânia	-20° 30' 21,6"	-40° 53' 09,6"	6
	Alto Jucu	-20° 18' 36,0"	-41° 01' 48,0"	4
	Braço do Sul	-20° 28' 40,8"	-41° 03' 50,4"	4
	Lajinha	-20° 15' 07,2"	-41° 03' 32,4"	13
	Pedra Azul	-20° 24' 50,4"	-41° 02' 20,4"	4
Marechal Floriano	Portal Pedra Azul	-20° 23' 34,8"	-41° 01' 40,8"	2
	São Paulo do Aracê	-20° 26' 13,2"	-41° 01' 22,8"	5
	Tujuco Preto	-20° 14' 34,8"	-40° 54' 57,6"	3
	Victor Hugo	-20° 24' 57,6"	-40° 54' 25,2"	3
Santa Teresa	São Pedro	-19° 57' 10,8"	-40° 36' 21,6"	2
Vargem Alta	Santa Teresa	-19° 56' 27,6"	-40° 35' 20,4"	1
	Castelinho	-20° 30' 57,6"	-40° 59' 13,2"	4
	São Brás de Maravilha	-20° 34' 19,2"	-40° 57' 10,8"	1
	Taquaruçu	-20° 33' 54,0"	-40° 59' 13,2"	3
	Vargem Alta	-20° 33' 57,6"	-41° 00' 36,0"	1
Venda Nova do Imigrante	Vila Maria	-20° 32' 13,2"	-40° 59' 34,8"	6
	Alto Caxixe	-20° 26' 42,0"	-41° 04' 19,2"	11
	Venda Nova do Imigrante	-20° 18' 57,6"	-41° 07' 55,2"	4

\*Não há pontos de coleta no município de Santa Maria de Jetibá, porém há amostras que foram translocadas da localidade de Garrafão, localizada ao sul desse município, para o município de Santa Tereza.

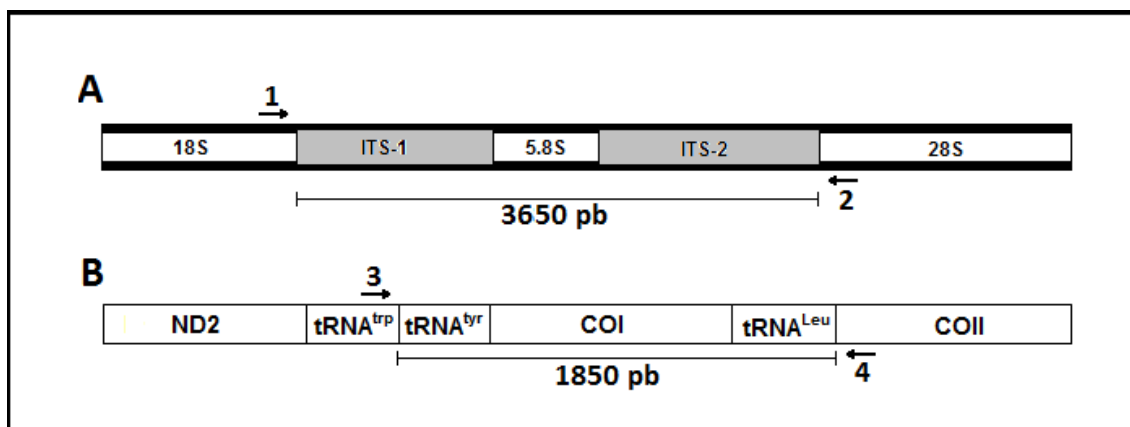
### 3.2 – Extração de DNA

Cerca de três operárias de cada colônia foram utilizadas para extração individual do DNA total. Porém somente uma das três extrações foi selecionada e utilizada nas análises.

A extração do DNA das operárias foi realizada conforme o protocolo recomendado por Fernandes-Salomão et al. (2005), com modificações. A cabeça e o mesossoma de cada indivíduo foram macerados em tubos Eppendorf de 1,5 mL contendo 1 mL de tampão de extração gelado constituído de: CTAB a 2 % (Brometo de Hexadecil Trimetil Amônio), EDTA (Ácido Tetraacético Diamino Etileno) a 20 mM (pH 8,0), NaCl a 1,4 M, Tris-HCl a 100 mM (pH 8,0) e 100 µg/mL de protease. O macerado foi incubado a 65°C por trinta minutos. A desproteinização foi feita com um volume de clorofórmio / álcool isoamílico 24:1 por duas vezes. Após cada desproteinização o macerado foi centrifugado a 13.000 rpm (13.790 g) por oito minutos em microcentrífuga refrigerada (Jouan MR23i). A precipitação do DNA foi feita com um volume de isopropanol seguida de incubação a -20° C por, no mínimo, duas horas. O material foi, então, submetido à centrifugação a 13.000 rpm (13.790 g) por trinta minutos e o precipitado formado foi lavado duas vezes com etanol 70 % e seco à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em 100 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0). Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8 % contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídio, para verificar a integridade e a pureza do DNA extraído.

### 3.3 – PCR-RFLP do mtDNA e do rDNA nuclear

As amplificações foram realizadas utilizando *primers* específicos visando amplificar sequências completas da região ITS-1 / 5.8S / ITS-2 do rDNA nuclear (ITS/5.8S) e da região tRNA<sup>Tyr</sup> / COI / tRNA<sup>Leu</sup>L2 do mtDNA (tRNA/COI). As **Figuras 5A** e **5B** ilustram as regiões do DNA nuclear e mitocondrial analisadas, genes flanqueadores e a posição aproximada do local de pareamento dos *primers* utilizados.



**Figura 5** – Esquema mostrando a posição aproximada do local de pareamento dos *primers* no rDNA nuclear (A) e no mtDNA (B) de *Melipona capixaba*. 1: CAS18sFt. 2: CAS28sB1d MOD. 3: COX1. 4: COX4. O tamanho dos blocos na Figura não corresponde ao tamanho real dos genes e espaçadores representados.

As amplificações da região ITS/5.8S foram realizadas utilizando o par de *primers* CAS28sB1d MOD (CAS28sB1d modificado de Ji et al., 2003) e CAS18sFt (Ji et al., 2003). As sequências desses *primers* são, respectivamente, 5'-TCC TCC GCT GTC TAK TAT ATG C-3' e 5'-TAC ACA CCG CCC GTC GCT ACT A-3'. A mistura de reação PCR foi composta de aproximadamente 50 ng de DNA, 0,8 µL de cada oligonucleotídio concentrado a 10 µM, 2,5 µL de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM, 2 µL de uma mistura dos quatro dNTPs a uma concentração total de 100 mM, 5 µL de tampão 10X GoTaq<sup>®</sup> Flexi Buffer (Promega), e água ultra pura para um volume final de 25 µL de reação. As amplificações foram conduzidas em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf<sup>®</sup>), programado para um passo de desnaturação inicial a 94°C por sete minutos seguido de um passo de pareamento de primer a 57°C por quarenta segundos e logo após, 70°C por dez segundos. Neste ponto, o processo foi interrompido e em cada reação foi adicionado 1,5 U de GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA polymerase (Promega). Após a adição da *Taq*, seguiu-se um passo de extensão a 70°C durante três minutos e trinta segundos e uma sequência de trinta ciclos de 94°C por quarenta segundos, 57°C por quarenta segundos e 70°C por três minutos e trinta segundos. Depois de ocorrido os trinta ciclos, foram realizados um passo de extensão final a 70°C por sete minutos e resfriamento a 4°C. Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose a 1,5 % (p/v) contendo brometo de etídio (0,2 µg/mL) e fotodocumentados utilizando o sistema AlphaDigiDoc.

Nas condições de amplificação acima, o primeiro passo de desnaturação foi realizado em condições diferentes do geralmente recomendado (95° por 2 minutos). Testes preliminares realizados neste estudo mostraram maior eficiência das amplificações quando a temperatura e o tempo para desnaturação completa do DNA foram de 94° C e 7 minutos, respectivamente. Uma possível explicação para este resultado é o fato da sequência ITS/5.8S ser uma sequência grande, tamanho esperado de 3650 pares de bases (pb), com alto conteúdo GC, o que requer tempo maior para a completa desnaturação do DNA. Adicionalmente, a *Taq* DNA polimerase tem atividade ótima à temperatura de 75-80° C e uma meia vida de 9 minutos a 97,5° C (Lawyer et al., 1993). Assim, a temperatura de 94° C por 7 minutos, diminui consideravelmente a estabilidade da enzima. Como se tratava da amplificação de fragmentos grandes, requerendo um alto desempenho da *Taq*, procurou-se manter sua integridade por maior tempo introduzindo-a na reação somente após do primeiro passo de desnaturação, o que também resultou em maior eficiência no processo de amplificação.

A região tRNA/COI foi amplificada utilizando a combinação dos *primers* COX-1 (5'-AAG TTA AAT AAA CTA TTA ATC TTC-3') localizado na posição 1389 a 1411 pb do gene tRNA<sup>Trp</sup> e COX-4 (5'-CTT GAA ATG AAA TTA TAT TTC ATG TTG-3') localizado na posição 3202 a 3228 do gene COII do genoma mitocondrial de *Melipona bicolor* (Batalha-Filho, 2008; Silvestre et al., 2008). A mistura de reação PCR foi composta de aproximadamente 50 ng DNA, 0,8 µL de cada oligonucleotídeo a 10 µM, 2,5 µL de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM, 2 µL de uma mistura dos quatro dNTPs a uma concentração total de 100 mM, 1X de Go*Taq*<sup>®</sup> Flexi Buffer (Promega), 1,25 unidades de Go*Taq*<sup>®</sup> Flexi DNA polymerase (Promega) e água ultra pura para um volume final de 25 µL. A amplificação foi conduzida em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf<sup>®</sup>), programado para um passo de desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, 34 ciclos de 94°C por um minuto, 50°C por um minuto e vinte segundos, 64°C por dois minutos e um passo de extensão final a 64°C por dez minutos seguido do resfriamento a 4°C. Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose a 1,5 % (p/v) contendo brometo de etídio (0,2 µg/mL) e fotodocumentados utilizando o sistema AlphaDigiDoc.

### 3.4 – Digestão com enzimas de restrição

A digestão dos produtos PCR foi realizada em uma mistura de reação contendo 10 a 15 µL do produto PCR, 2,5 µL do tampão 10 X específico para cada enzima de restrição, 6 U da enzima e água ultra-pura para volume final de 25 µL. A mistura de reação foi incubada durante 6 horas em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf®) à temperatura ideal de atividade para cada enzima de restrição, acrescido de quinze a vinte minutos à temperatura de inativação térmica recomendada para cada enzima. O produto da digestão foi analisado por eletroforese utilizando gel de agarose a 2 % (p/v) contendo brometo de etídio (0,2 µg/mL) ou gel de poliacrilamida 12 % (p/v) corado com solução de brometo (0,8 µg/mL). Os padrões RFLP obtidos foram fotodocumentados utilizando o sistema AlphaDigiDoc.

### 3.5 – Análises dos dados

Análises preliminares foram realizadas digerindo os produtos PCR das regiões ITS/5.8S e tRNA/COI de 12 operárias de *M. capixaba* (uma de cada colônia) com 50 enzimas de restrição (**Tabela 6 - Anexo**). O objetivo dessas análises foi selecionar, com base nos padrões de restrição obtidos, enzimas adequadas para avaliar as regiões ITS/5.8S e tRNA/COI das 93 operárias de *M. capixaba* previstas neste estudo.

O software DNAFRAG versão 3.03 (Nash, 1991) foi utilizado para calcular o tamanho em pares de bases (pb) dos fragmentos de DNA amplificados e dos fragmentos de DNA resultantes da digestão com enzimas. Foi utilizado como referência os marcadores de peso molecular 1 kb (Invitrogen) e 100 pb plus (Fermentas).

Os padrões PCR-RFLP polimórficos obtidos com cada enzima de restrição foram analisados e nomeados (A, B, C e D) por ordem alfabética de acordo com a ordem de detecção de cada um no gel de eletroforese. A composição haplotípica foi determinada por combinação dos padrões observados para cada enzima utilizada. Como foram cinco enzimas de restrição, dentre as 50 previamente testadas, que resultaram em padrões

polimórficos, a composição haplotípica foi composta pela combinação de 5 letras.

A partir da determinação da composição haplotípica dos 93 espécimes analisados, foi construída uma matriz binária utilizando o software GENERATE, do programa REAP versão 4.0 (McElroy et al., 1991), onde 1 representou a presença de sítio de restrição e 0 à ausência desse sítio. Somente sítios polimórficos foram considerados para a construção da matriz binária. Essa tabela foi submetida ao software GROUP, do programa REAP, onde as composições haplotípicas duplicadas foram removidas.

A matriz binária dos 8 haplótipos resultantes foi introduzida no software D, do programa REAP, para construção de uma matriz de distância genética com base na estimativa do número médio de substituição nucleotídica dos sítios de restrição (Nei e Tajima, 1981; Nei e Miller, 1990).

A matriz de distância genética foi feita com atribuição de pesos para cada enzima de restrição conforme a classificação (valores  $r = 4, 14/3, 5, 16/3$  ou 6) proposta por Nei e Tajima (1981) com base no número de bases específicas reconhecidas pelas enzimas de restrição. Assim, para as enzimas *HinfI*, *MspI* e *KspAI* ( $r = 4$ ) foi atribuído peso 4 e para as enzimas *DraI* e *SspI* ( $r = 6$ ) peso 6.

Essa matriz de distância foi, então, introduzida no software SAHN, do programa NTSYSpc versão 2.2 (Rohlf, 1988), para agrupamento dos haplótipos pelo método UPGMA.

Os softwares SEQBOOT, DOLLOP e CONSENSE, ambos do programa PHYLIP versão 3.57c (Felsenstein, 1989), foram utilizados para a construção de um fenograma pelo método Dollo Parcimônia, com 10000 replicações, a partir da matriz binária, obtida com o programa REAP, sem atribuição de pesos para enzimas de restrição.

A matriz binária também foi utilizada no programa NETWORK, versão 4.5.1.0 (2004–2009 Fluxus Technology), para a construção de uma rede de haplótipos por *median-joining* e no programa GENES (Cruz, 2005) para a elaboração de uma projeção tridimensional da distância no plano.

O software Alles In Space (AIS) (Miller, 2005) foi utilizado para avaliar a correlação entre a distância genética (baseada na matriz binária das 93

amostras sem atribuição de pesos) e a distância geográfica através do Teste Mantel (Mantel, 1967).

Duas análises de variância molecular (AMOVA - Excoffier et al., 1992) foram realizadas. Uma delas foi considerando a região de origem de todas as colônias como sendo a região de coleta e a outra considerando algumas colônias translocadas como sendo procedentes da sua real região de origem e não da região de coleta. Para isso, as 93 amostras analisadas foram divididas em grupos de acordo com a distribuição geográfica das mesmas. A AMOVA foi realizada no programa ARLEQUIN, versão 3.11 (Schneider et al., 2000), utilizando a frequência de haplótipos observada em cada grupo.



#### 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tamanho da região ITS/5.8S do rDNA nuclear de *M. capixaba* foi estimado em 3650 pb. Resultado similar foi relatado para populações de *Melipona subnitida* do nordeste do Brasil, em que a região ITS/5.8S do rDNA nuclear foi amplificada e as estimativas de tamanho variaram de 3650 a 3700 pb (Cruz et al., 2006).

O tamanho da região tRNA/COI de *M. capixaba* foi estimado em 1850 pb. Tamanhos similares foram obtidos para sequências tRNA/COI de *Melipona bicolor* - 1838 pb (Silvestre et al., 2008 – GeneBank, acesso NC\_004529), *M. scutellaris* e *M. quadrifasciata* - 1837 pb (Cristiano, 2009 - comunicação pessoal).

As regiões ITS-1 e ITS2 do rDNA nuclear não são codificadoras e, portanto, são mais variáveis em relação às regiões codificadoras do DNA nuclear. No entanto, as análises preliminares demonstraram que nenhum polimorfismo PCR-RFLP foi detectado quando sequências ITS/5.8S, das operárias de *M. capixaba* avaliadas, foram digeridas com 50 enzimas de restrição. A não detecção de polimorfismos nessa região sugere, portanto, baixa variabilidade genética na população de *M. capixaba* analisada.

Em outras espécies de abelhas e até mesmo em outros insetos, polimorfismos genéticos na região ITS têm sido reportados e utilizados para inferências filogenéticas, estrutura populacional e discriminação de espécies.

Ciociola et al. (2001) analisaram 7 espécies do Genero *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) comparando sequências e padrões de restrição da região ITS-2 das mesmas. Com base no tamanho das sequências ITS-2 e na presença ou ausência de sítios de restrição foi construída uma chave molecular simples e precisa que permitiu a identificação dessas vespas.

Cruz et al. (2006) analisaram sequências parciais da região ITS-1 de *Melipona subnitida*, abelha endêmica da região nordeste do Brasil, procedentes de 30 localidades com distâncias geográficas variando de 23 a 737 km e observaram altos níveis de divergência genética entre elas. Segundo o autor, essa alta divergência genética entre as populações pode ser consequência do

fato de *Melipona subnitida* estar amplamente distribuída e ser muito antiga na região.

No caso de *M. capixaba*, neste estudo, a baixa distância geográfica entre os locais de coleta pode estar contribuindo para a baixa variabilidade genética observada.

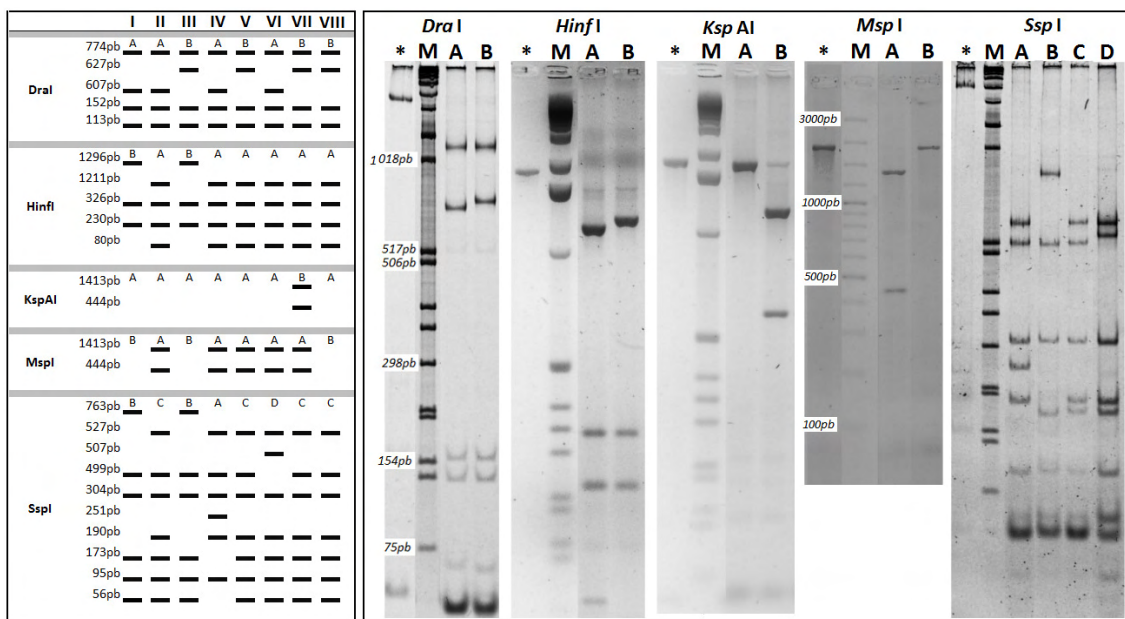
A região ITS-1 foi utilizada por De La Rúa et al. (2007a) em estudos filogenéticos e populacionais com subespécies de *Apis mellifera*. A comparação entre as sequências obtidas permitiu discriminar *A. m. scutellata* de *A. m. intermissa*. Essas duas subespécies exibem distribuição norte e sul da África, respectivamente.

Apesar de nas análises preliminares nenhum polimorfismo RFLP ter sido detectado para a região ITS/5.8S, antes de descartar a possibilidade de utilização desta região nas análises previstas neste estudo, DNA total de 93 operárias de *M. capixaba* foi amplificado e digerido com as enzimas *HinfI*, *MspI* e *TaqI*. A escolha dessas enzimas foi feita com base nos padrões RFLP obtidos nas análises preliminares. Novamente nenhum sítio polimórfico RFLP foi detectado.

Diante desse resultado, as análises prosseguiram analisando apenas fragmentos PCR obtidos por amplificação da região tRNA/COI de *M. capixaba*. Em contraste ao resultado obtido com análises da região ITS-5.8S, polimorfismos foram identificados quando a região tRNA/COI de 12 operárias de *M. capixaba* foi digerida com as enzimas de restrição *DraI*, *HinfI*, *KspAI*, *MspI* ou *SspI*.

Os produtos da amplificação da região tRNA/COI de 93 operárias de *M. capixaba* foram, então, digeridos com as enzimas *DraI*, *HinfI*, *KspAI*, *MspI* e *SspI*. Os padrões PCR-RFLP (**Figura 6**) foram analisados e 8 haplótipos mitocondriais foram observados (**Tabela 2**). A distribuição geográfica dos haplótipos, das 93 amostras de *M. capixaba* analisadas, está representada na **Figura 7A** e o local de coleta de cada amostra está descrito na **Tabela 5 do Anexo**.

Essa distribuição geográfica de haplótipos mitocondriais identificados para *M. capixaba* demonstra uma estruturação haplotípica onde cada haplótipo, exceto os denominados II, VI e VIII, encontra-se com mais frequência em uma dada região geográfica.



**Figura 6** – À esquerda: Esquema dos padrões PCR-RFLP obtidos por digestão da sequência tRNA/COI do DNA de 93 amostras de *M. capixaba* com as enzimas *DraI*, *HinfI*, *KspAI*, *MspI* e *SspI*. I a VIII representam os 8 haplótipos mitocondriais identificados. À direita: Perfil eletroforético dos padrões obtidos. A, B, C e D: Padrões RFLP. \*: DNA sem digerir. M: marcador de peso molecular 100 pb plus (Fermentas) para *MspI* e 1 kb (Invitrogen) para as demais enzimas. Fragmentos menores que 50 pb não foram considerados.

**Tabela 2** – Haplótipos mitocondriais de *M. capixaba* identificados

Haplótipo	Padrões RFLP tRNA/COI				
	<i>DraI</i>	<i>HinfI</i>	<i>KspAI</i>	<i>MspI</i>	<i>SspI</i>
I	A	B	A	B	B
II	A	A	A	A	C
III	B	B	A	B	B
IV	A	A	A	A	A
V	B	A	A	A	C
VI	A	A	A	A	D
VII	B	A	B	A	C
VIII	B	A	A	B	C

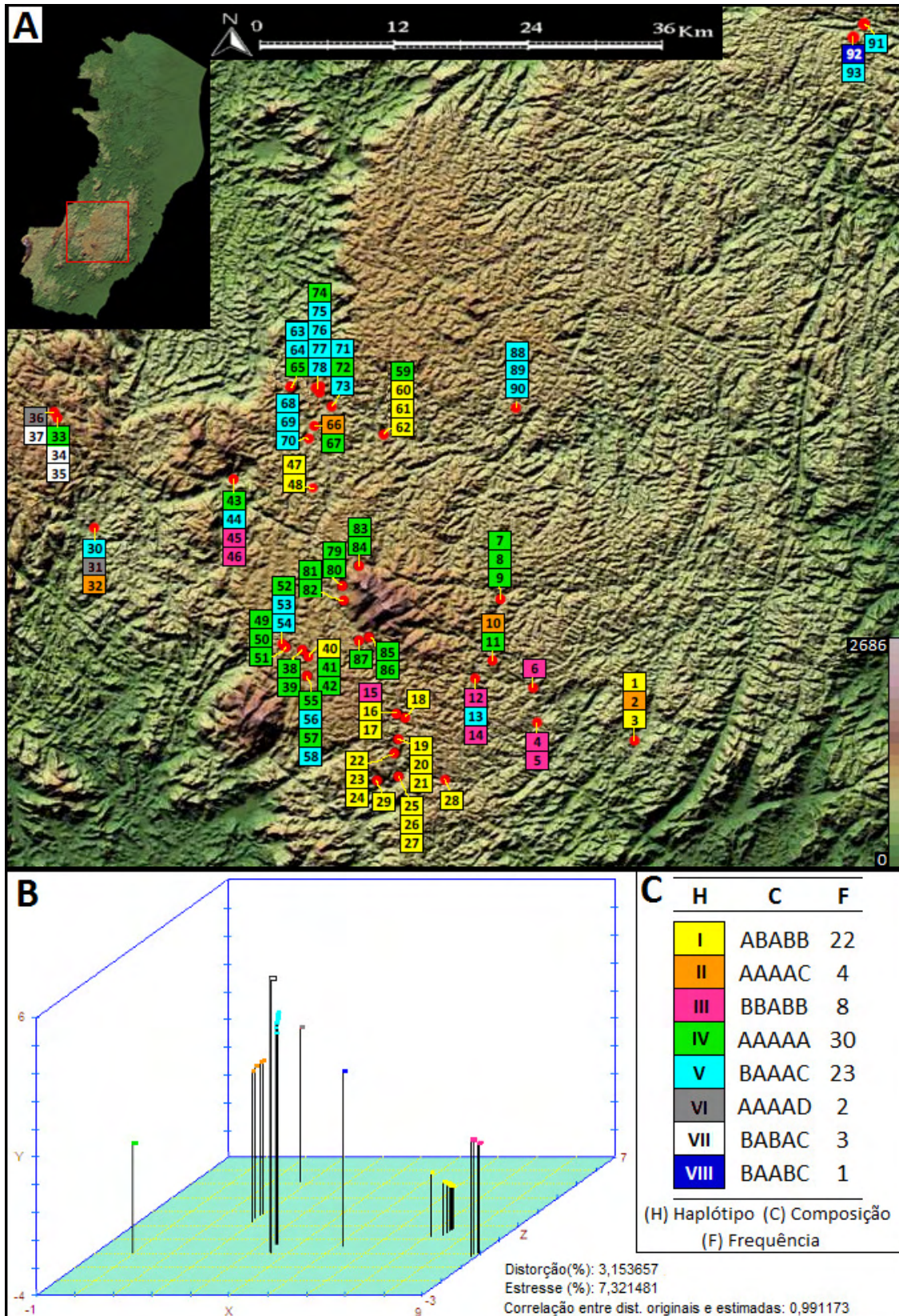
Haplótipos com ampla distribuição na região amostrada, como é o caso dos haplótipos I, II e V, também são observados. Os haplótipos I, IV e V foram os mais frequentes, abrangendo 81 % das amostras analisadas (**Figura 7C**). Os haplótipos II, III, VI, VII e VIII foram os menos frequentes sendo o haplótipo VIII detectado exclusivamente na amostra de número 92. A extinção de colônias de *M. capixaba* por predadores (incluindo meleiros), desmatamento

e/ou até mesmo a não amostragem podem ter contribuído para a baixa frequência observada para estes haplótipos.

Não é possível identificar com precisão qual haplótipo mitocondrial é o ancestral, por não saber ao certo qual o rumo da evolução. Contudo, considerando que a probabilidade de se perder um sítio de restrição é maior do que a de ganhá-lo, pois a substituição de um único nucleotídeo já é o suficiente para que a enzima não reconheça o sítio, os haplótipos possivelmente ancestrais seriam aqueles determinados pelos maiores números de sítios reconhecidos pelas enzimas (Arias e Infante-Malachias, 2001). Desta forma, os haplótipos que apresentam o maior número de “1” (presença de sítio de restrição) na matriz binária podem ser considerados os haplótipos ancestrais. A matriz binária de haplótipos obtida para *M. capixaba* (**Tabela 7 - ANEXO**), mostra que os haplótipos II e VII (apresentam 6 dos 7 sítios de restrição que se mostraram polimórficos) seriam então os haplótipos mais antigos seguido pelos haplótipos IV, V e VI (apresentam 5 dos 7 sítios de restrição que se mostraram polimórficos) e haplótipos VIII, I e III (apresentam respectivamente 4, 3 e 2 dos 7 sítios de restrição que se mostraram polimórficos). Assim, parece que a dispersão para a porção mais ao sul da região de ocorrência de *M. capixaba* (haplótipos I e III na **Figura 7A**) se deu recentemente.

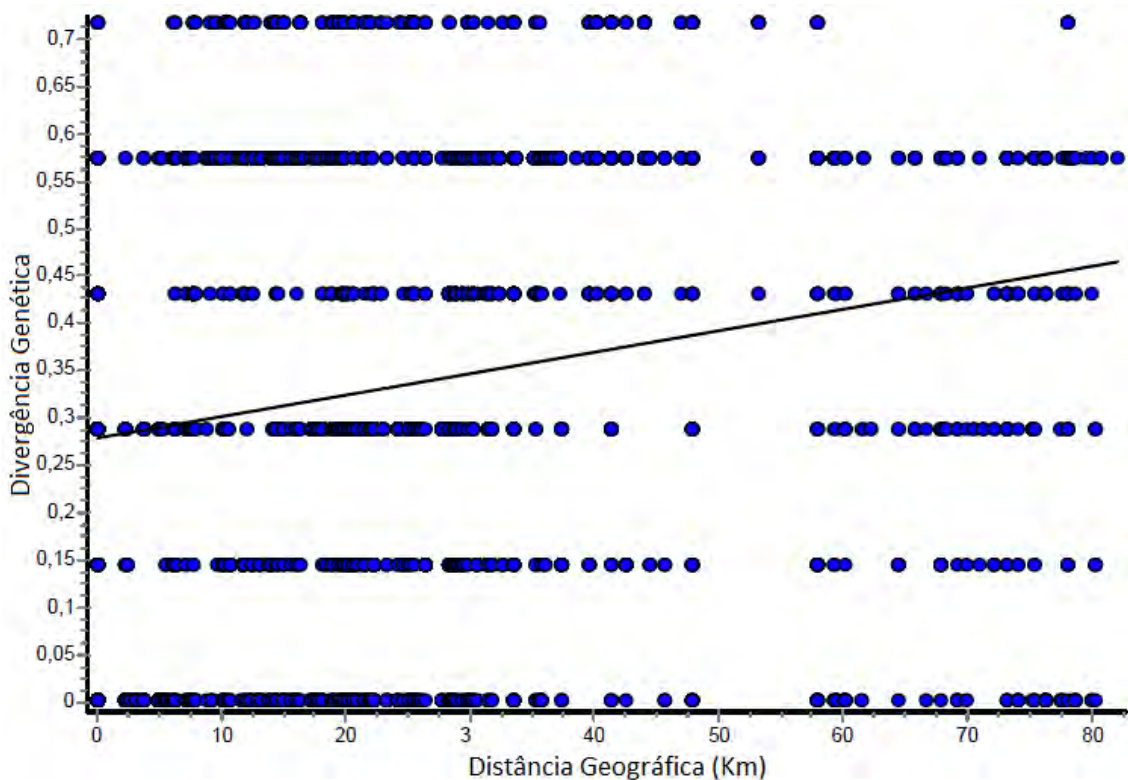
A projeção tridimensional da distância genética no plano (**Figura 7B**) apresentou valores de eficiência adequados com níveis de estresse e distorção bem inferiores a 20 % (7,32 e 3,15 % respectivamente). Além disso, a correlação entre distâncias originais e estimadas foi superior a 0,95 (0,99), evidenciando alta correlação entre as distâncias genéticas analisadas e a dispersão gráfica representada.

O gráfico de projeção tridimensional da distância genética no plano (**Figura 7B**) mostra que os haplótipos tRNA/COI de *M. capixaba* foram distribuídos em 3 grupos. Um dos grupos formado pelos haplótipos II, V, VI, VII e VIII, outro pelos haplótipos I e III e o terceiro inclui apenas o haplótipo IV. O agrupamento observado corresponde parcialmente com a distribuição geográfica dos 8 haplótipos. Essas análises demonstram que haplótipos geneticamente distantes se encontram lado a lado, como é o caso, por exemplo, dos haplótipos da colônia de número 13 com os das colônias de número 12 e 14.



**Figura 7 – A:** Mapa de relevo, adaptado de Miranda (2005), representando a distribuição geográfica dos 8 haplótipos tRNA/COI detectados na população de *M. capixaba*. **B:** Projeção tridimensional da distância genética no plano sugerindo que, para algumas amostras, não há correlação entre a distribuição geográfica dos haplótipos e a distância genética. **C:** Legenda de haplótipos com suas respectivas composição e frequência.

Agrupamento semelhante foi relatado por Nogueira (2009) ao utilizar projeção tridimensional da distância genética no plano para analisar, por ISSR, 95 amostras de *M. capixaba* procedentes de 25 localidades da região serrana do Espírito Santo. Correspondência parcial entre projeção tridimensional e distribuição geográfica, também, foi observada por Borges (2007) ao analisar operárias de 66 colônias da abelha sem ferrão *Partamona helleri* coletadas em 5 localidades do Estado de Minas Gerais.



**Figura 8** - Resultado do Teste Mantel mostrando baixa correlação entre distância genética (com base na matriz binária) e distância geográfica (km). Correlação entre distâncias genéticas e geográficas:  $r = 0,177$ . Probabilidade de observar uma correlação maior ou igual à observada:  $p = 0,0001$ . Probabilidade de observar correlação menor ou igual à observada:  $p = 1,0$ . 1000 replicações foram realizadas.

O Teste Mantel (**Figura 8**) mostrou magnitude do valor  $r$  baixa, apesar de significativa (0,177), evidenciando baixa correlação entre distância genética e geográfica das colônias de *M. capixaba*. Esse resultado é consistente com observações feitas através da distribuição de haplótipos e da projeção tridimensional da distância genética no plano (**Figuras 7A e 7B**).

Essa correlação parcial entre distâncias geográficas e genéticas observada na população de *M. capixaba*, tanto através da comparação entre a projeção tridimensional da distância genética no plano com a distância

geográfica quanto através do Teste Mantel, tem se mostrado comum quando se trata de meliponíneos, principalmente os localizados na mata atlântica que sofrem grande influência antrópica. Colônias são retiradas das matas por criadores, transportadas de uma região para outra e se tornam semidomesticadas para exploração. Essas colônias, na maioria das vezes, por péssimas condições de manejo, acabam sendo extintas. Há também os meliponicultores, que fazem divisão racional de colônias e promovem seu transporte de uma localidade para outra.

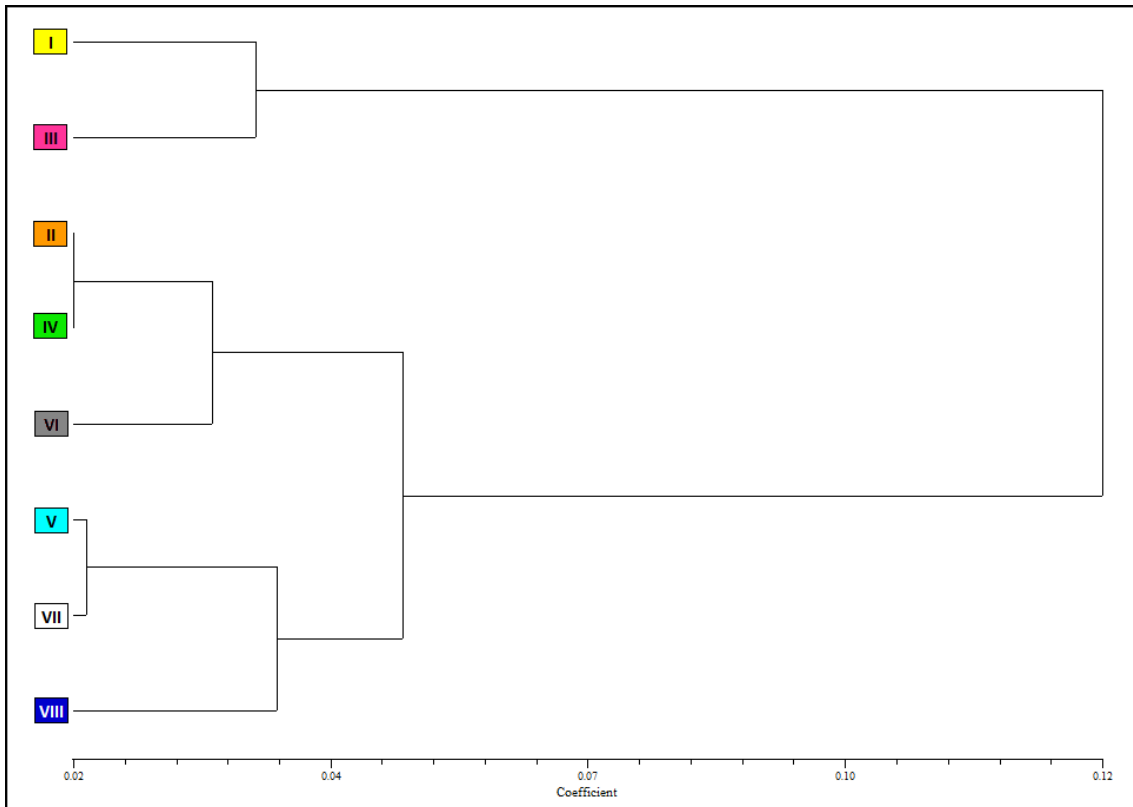
Considerando que a maioria das colônias de *M. capixaba* se encontra nas mãos de criadores (apenas 9 amostras foram coletadas de colônias em condições naturais), a influência antrópica tem reflexos diretos na dispersão e na perpetuação dessa espécie.

Praticamente os mesmos grupos observados na projeção tridimensional da distância genética no plano foram também observados nos fenogramas obtidos pelos métodos UPGMA (utilizando matriz de distância genética com atribuição de pesos para cada enzima de restrição - **Tabela 3**) e Dollo parcimônia (utilizando matriz binária dos haplótipos tRNA/COI – **Tabela 7 - Anexo**) mostrados nas **Figuras 9 e 10**, respectivamente. Nesses agrupamentos, a população de *M. capixaba* foi dividida em dois grupos principais. Um dos grupos formado pelos haplótipos I e III e o outro pelos haplótipos II, IV, V, VI, VII e VIII, sendo este último subdividido em dois subgrupos compostos pelos haplótipos II, IV e VI e haplótipos V, VII e VIII.

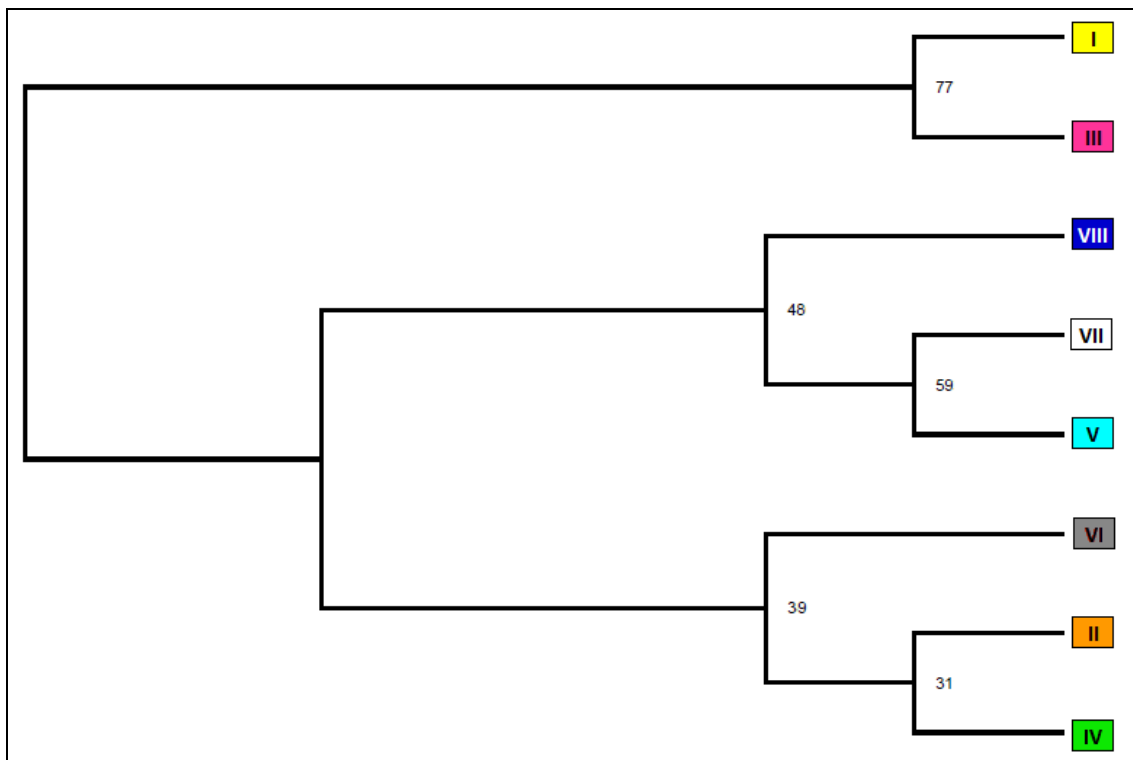
A **Tabela 3**, matriz da distância genética entre haplótipos tRNA/COI de *M. capixaba*, mostra que a maior distância genética (0,194) foi observada entre o haplótipo III e os haplótipos IV e VI, enquanto que a menor (0,019) foi observada entre o haplótipo II e os haplótipos IV, V e VI.

**Tabela 3** – Matriz da distância genética entre haplótipos tRNA/COI de *M. capixaba* com base no número estimado de substituição nucleotídica dos sítios de restrição

	I	II	III	IV	V	VI	VII
II	0.078						
III	0.037	0.119					
IV	0.119	0.019	0.194				
V	0.119	0.019	0.103	0.047			
VI	0.119	0.019	0.194	0.047	0.047		
VII	0.138	0.035	0.126	0.063	0.020	0.063	
VIII	0.096	0.042	0.074	0.076	0.025	0.076	0.053



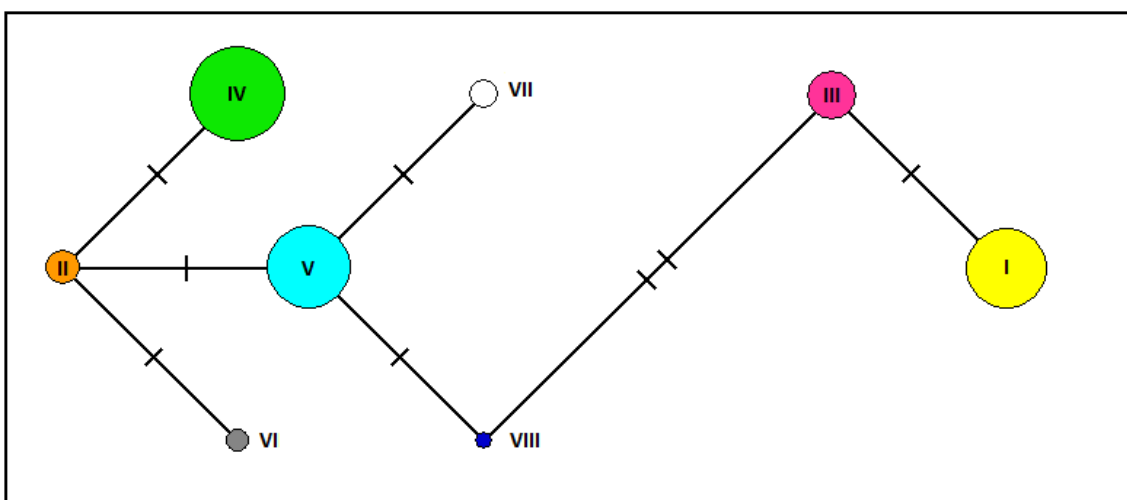
**Figura 9** – Fenograma UPGMA de haplótipos mitocondriais de *M. capixaba* obtido com base na matriz de distância genética da Tabela 3.



**Figura 10** – Fenograma de haplótipos mitocondriais de *M. capixaba* por Dollo parcimônia com 10000 repetições e sem atribuição de pesos para enzimas de restrição.



A rede de haplótipos obtida para *M. capixaba* (**Figura 11**) também corrobora com os agrupamentos obtidos pelos métodos descritos acima. Os agrupamentos definidos na rede de haplótipos mostraram baixa divergência genética entre os haplótipos mitocondriais. Apenas dois passos mutacionais separam os dois grupos principais. É possível que outros haplótipos intermediários não tenham sido amostrados e/ou que a ação de melieiros e a retirada de colônias da mata nativa por criadores, somado ao alto grau de fragmentação da região de ocorrência de *M. capixaba*, tenham acarretado a extinção de haplótipos intermediários.



**Figura 11** – Rede de haplótipos tRNA/COI de *M. capixaba*. Os traços transversais entre dois haplótipos representam o número de passos mutacionais entre eles. O diâmetro de cada círculo é proporcional à frequência do haplótipo.

Os meliponíneos são altamente suscetíveis ao desmatamento. Brown e Albrecht (2001) mediram a abundância de espécies do Gênero *Melipona* em locais com diversos graus de perturbação antrópica em uma área de 3150 km<sup>2</sup> da floresta amazônica no Estado de Rondônia e sugeriram que essas abelhas apresentam um grande potencial como bioindicadores. Um dos fatores responsáveis por essa sensibilidade é a presença de um abdome desenvolvido nas rainhas que as impedem de voar. Dessa forma, as colônias são incapazes de fugirem de áreas que sofreram algum tipo de distúrbio, como desmatamentos ou queimadas.

Gouvêa et al. (2007) estudaram o efeito da fragmentação sobre a diversidade de Meliponini no corredor central da mata atlântica. Os autores realizaram coletas mensais em um período de 11 meses na RPPN da

Michelin/Bahia que compreende uma área de 9000ha localizada no baixo sul desse Estado. Do total de indivíduos coletados (5726), 95 % foram encontrados em áreas de mata primária (fragmentos na escala de centenas e acima de 1000ha) e apenas 5 % em áreas de fragmentos florestados (fragmentos na escala de dezenas de hectares). A riqueza de espécies também foi maior em áreas de mata primária (21 espécies distribuídas em 5 gêneros) do que nas áreas de fragmentos florestados (12 espécies e 4 gêneros). O Gênero *Melipona* foi encontrado somente em áreas de mata primária. Os autores relataram que a ausência deste gênero nos fragmentos florestados pode estar relacionada à falta de árvores de grande porte ou à baixa disponibilidade de cavidades arbóreas naturais requeridas por espécies do Gênero *Melipona* para nidificação.

Diante do exposto, a preservação da vegetação existente e a recolonização de áreas onde *M. capixaba* foi extinta são ações fundamentais para conservação dessa espécie.

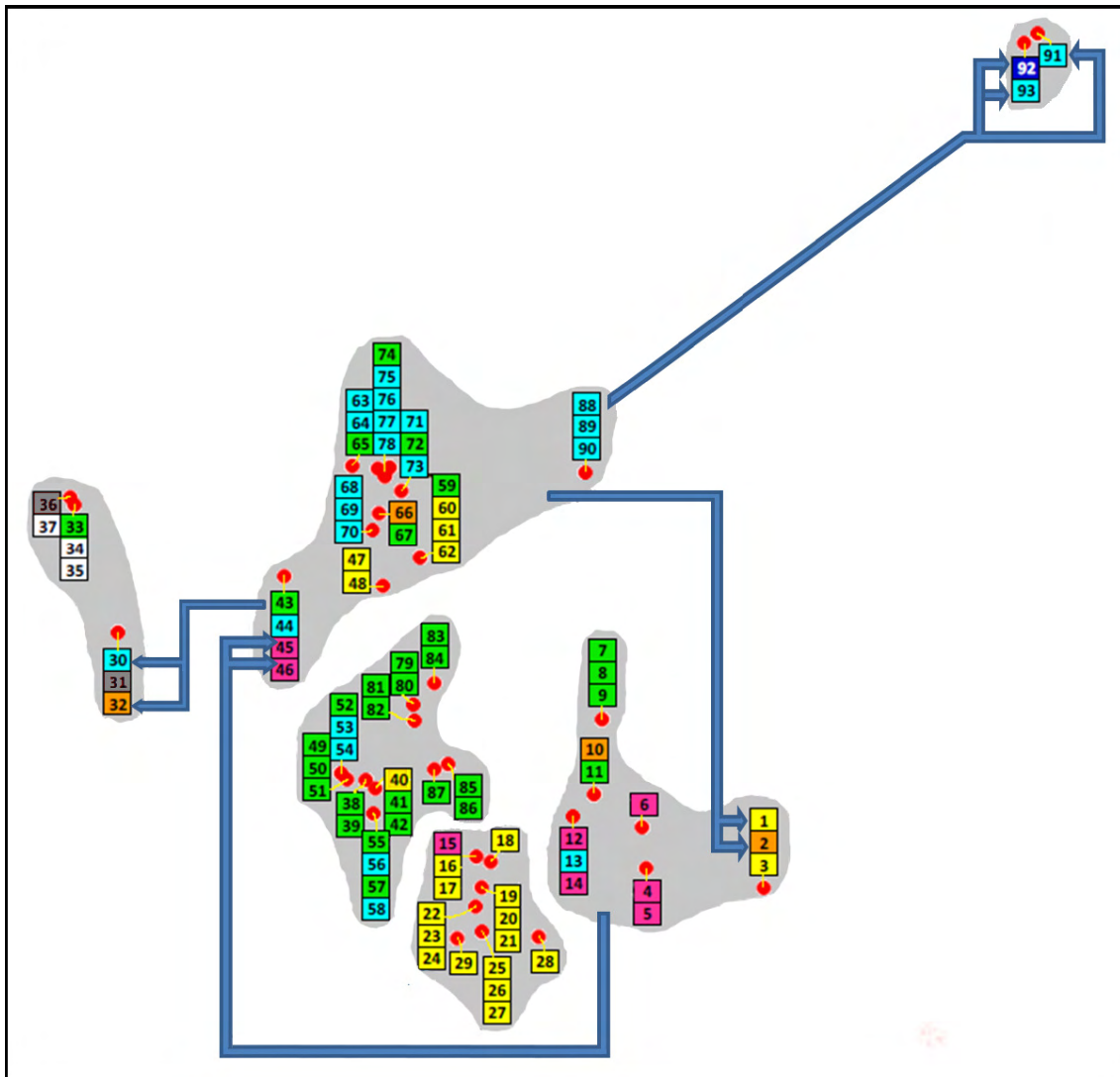
As colônias de número 91, 92 e 93 foram transportadas da região de Garrafão no município de Santa Maria de Jetibá para a cidade de Santa Tereza. A sobrevivência destas colônias em outra área a qual fica localizada a cerca de 25 km de sua região de origem, mostra que é possível a colonização de *M. capixaba* em áreas com condições de relevo e clima similares às do entorno de Pedra Azul no município de Domingos Martins. A manutenção de grupos mais distantes pode possibilitar o estabelecimento, mesmo que em longo prazo, de outra unidade evolutiva, fortalecendo a capacidade de sobrevivência da *M. capixaba* diante dos processos de seleção natural. Além disso, a existência de um haplótipo mitocondrial exclusivo na população amostrada (haplótipo VIII, colônia de número 92) e o transporte desse haplótipo para a região de Santa Tereza onde não foram observadas colônias nativas, pode originar um novo grupo de colônias com diferenciação genética divergente das demais pelo efeito fundador.

A recolonização de outras localidades pode ser feita a partir da divisão racional de colônias de *M. capixaba* pré-existentes. Luiz Fabio Feitoza Caliman, um meliponicultor do município de Venda Nova do Imigrante, relatou à revista Mensagem Doce (nº 96, maio de 2008) que começou sua criação de *M. capixaba* com três colônias no ano de 1994 e que em 2008 chegou a um total

de 94 colônias empregando técnicas de manejo para essa espécie. A Reserva Particular de Patrimônio Natural (RPPN) Oitrem, única unidade de conservação localizada na área de ocorrência de *M. capixaba* e primeira RPPN estadual do Espírito Santo, localizada em Matilde no município de Alfredo Chaves, também possui em seu meliponário colônias de *M. capixaba* com o objetivo de desenvolver técnicas de manejo, reprodução de enxames e produção de mel.

Kerr e Vencovsky (1982) recomendaram um número mínimo de 44 colônias em uma mesma região para uma população de Meliponini ser mantida. Os Meliponini requerem esse número de colônias para manter 6 alelos determinadores do sexo (xo). Quanto maior o número de alelos sexuais, menor é a probabilidade de ocorrerem acasalamentos entre indivíduos idênticos o que prejudicaria o desenvolvimento da colônia com a geração de machos diplóides. Os autores estimaram que a frequência de acasalamentos que resulta em 50 % de machos diplóides para 10 colônias de *M. quadrifasciata* em uma mesma região é de 35,97 %, com taxa de 13 % de possibilidade de eliminação de colônias. Essas estimativas diminuem para 17,33 % e 3 % respectivamente quando há 40 colônias em uma mesma região.

Diante dessas observações, um melhor entendimento da estrutura genética da população de *M. capixaba* e da influência antrópica nessa estrutura se fez necessário. Para isso, a população de *M. capixaba* foi dividida em grupos de colônias conforme o tipo e a frequência de determinado haplótipo (**Figura 12**). Haplótipos compartilhados entre os grupos propostos é claramente observado. Uma possível explicação para esse compartilhamento de haplótipos é a prática comum de transporte de colônias de *M. capixaba* entre localidades, conduzidas por meliponicultores ou criadores. Um exemplo dessa prática é a translocação das colônias de número 91, 92 e 93 da região do Garrafão no município de Santa Maria de Jetibá para o município de Santa Tereza. A **Tabela 5 do Anexo** mostra outros exemplos de colônias translocadas. A identificação do local de origem dessas colônias foi feita com base em informações fornecidas por proprietários de colônias de *M. capixaba*.



**Figura 12:** Divisão das amostras de colônias de *M. capixaba* em grupos para realização da AMOVA. É demonstrada, de acordo com informações fornecidas pelos proprietários das colônias, a translocação de colônias de *M. capixaba* entre grupos. As setas partem do grupo de origem (não exatamente o local) apontando para a colônia que foi transportada. As amostras de número 6, 4, 5, 42, 70, 84, 85, 86, 89 foram coletadas de colônias em condições naturais na região amostrada. As colônias de número 91 a 93 têm sua origem nas proximidades das colônias de número 88 a 90 e não foram encontradas colônias nativas na região em que estas últimas foram amostradas. Demais amostras, mesmo as suspeitas de terem sido translocadas, foram consideradas nas análises como sendo sua região de origem a região de coleta das mesmas.

Os grupos formados foram, então, submetidos a duas análises de variância molecular (AMOVA). Uma das análises foi realizada considerando a região de origem de todas as colônias como sendo a região de coleta das mesmas e a outra, considerando colônias que foram translocadas como sendo procedentes da região de onde foram translocadas e não da região de coleta das mesmas.

**Tabela 4** – Análises de variância molecular (AMOVA) com base em sítios de restrição das sequências tRNA/COI de *M. Capixaba*

Transporte de colônia	Fonte de variação	GL	SQ	Estimativa	%
Antes	Entre grupos	4	13,217	0,175	40,72
	Dentro dos grupos	88	22,493	0,266	59,28
	Total	92	35,710	0,431	100
	$\Phi_{ST} = 0,41$				
Depois	Entre grupos	5	12,288	0,151	35,94
	Dentro dos grupos	87	23,422	0,269	64,06
	Total	92	35,710	0,420	100
	$\Phi_{ST} = 0,36$				

\* GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. Estimativa: estimativa dos componentes de variância. %: porcentagem de variação.  $p = 0,000 \pm 0,000$ .

Os resultados das análises de variância molecular mostraram que nas duas condições avaliadas a variação genética estimada foi maior dentro (59,28 e 64,06 % respectivamente) do que entre os grupos (40,72 e 35,94 % respectivamente). Esses resultados, somados à baixa divergência genética observada entre os 8 haplótipos tRNA/COI, sugerem que não há grande divergência genética entre os grupos propostos, de forma que a população de *M. capixaba* pode estar compartilhando o mesmo *pool* gênico. Resultado similar foi relatado por Nogueira (2009) que também obteve maior variação dentro do que entre grupos ao analisar *M. capixaba* por ISSR.

O aumento da variabilidade haplotípica tRNA/COI dentro dos grupos propostos para *M. capixaba*, (de 59,28 % para 64,06 %) sugere que o transporte de colônias pode estar contribuindo para o aumento do fluxo gênico e, conseqüentemente, diminuição de endogamia. Outra vantagem de se ter uma distribuição ampla dos haplótipos na região de ocorrência, principalmente em áreas fragmentadas, é a possibilidade de que o haplótipo não vá desaparecer com apenas um evento catastrófico, como por exemplo, a degradação de uma região pelo fogo.

Os valores  $\Phi_{ST}$  estimados por PCR-RFLP da região tRNA/COI de *M. capixaba* foram acima de 0,25 (0,41 e 0,36 antes e depois do transporte de colônias, respectivamente), sugerindo alta estruturação da população de *M. capixaba* analisada. Valor  $\Phi_{ST}$  indicando alta estruturação da população

também foi relatado por Nogueira (2009) ( $\Phi_{ST}$  0,28) ao analisar, por ISSR, 95 amostras (uma por colônia) de *M. capixaba* procedentes de 25 localidades da região serrana do Estado do Espírito Santo.

Ao avaliar os valores  $\Phi_{ST}$  obtidos para *M. capixaba* é importante considerar o comportamento biológico desta abelha. Rainhas fecundadas de abelhas sem ferrão possuem o abdome altamente desenvolvido o que as impedem de voar, dificultando a migração entre os grupos. Além disso, as abelhas operárias não voam muito longe por dependerem de uma orientação para retornarem ao ninho e as rainhas virgens de meliponíneos, geralmente, fundam ninho próximo à matriz e mantêm ligação com esta por um determinado tempo. Já os machos voam sem rumo e a distâncias maiores sem a “preocupação” de retornarem para a colônia (Campos, 2009 - comunicação pessoal). Nesse modelo de estruturação, em que cada grupo de colônias troca migrante somente com o grupo vizinho (modelo passo a passo – Wright, 1978), um haplótipo recém surgido é disperso na região por etapas (de geração em geração). Como ninhos de meliponíneos descendentes mantêm vínculo com a matriz no início do desenvolvimento (Wilson, 1971) o deslocamento de rainhas virgens de *M. capixaba* é limitado, levando-se considerável tempo para a dispersão de um haplótipo mitocondrial por toda a região de ocorrência.

Borges (2007) estudou a abelha sem ferrão *Partamona helleri* coletada nos municípios de Porto Firme, Rio Vermelho, São Miguel do Anta, Teixeiras e Viçosa no Estado de Minas Gerais. Um total de 66 colônias foi analisado com base em marcadores microssatélites e o valor  $F_{st}$  estimado foi de 0,55. Considerando as proximidades dos pontos de coleta de *P. helleri*, a autora atribuiu à causa desse valor  $F_{st}$  alto à limitada capacidade de vôo desta abelha que foi estimada, também pela autora, em aproximadamente 1710 m.

Harizanis e Bouga (2003) ao analisarem 60 colônias de *Apis mellifera adami* distribuídas na Ilha de Creta, na Grécia, observaram variação intrapopulacional quando segmentos gênicos COI foram amplificados e digeridos com a enzima de restrição *Bst*UI. Os autores relataram que a estrutura da população pode ter mudado devido à apicultura migratória e à reprodução comercial com a importação de rainhas de outras localidades da Grécia para a Ilha de Creta.

O entendimento da estrutura de determinada população é de grande importância para a elaboração de planos de manejo e conservação da mesma. Se uma espécie que ocupa uma determinada área encontra-se dividida em grupos geneticamente distantes, a estratégia de conservação deve ser no sentido de assegurar a diversidade genética de toda a área, pois podem existir adaptações locais que se perderiam caso o conteúdo genético fosse compartilhado. Se a espécie é geneticamente homogênea dentro da sua área de ocupação, as estratégias de conservação podem se concentrar em um determinado local e os indivíduos dessa região podem ser utilizados para recolonizar outras áreas (Lopes, 2004). Porém, aspectos da biologia da espécie e ecologia da região, também, são de importância fundamental e devem ser considerados a fim de planejar estratégias eficazes para a conservação da espécie.

Diversas características de *M. capixaba* como seu comportamento biológico, tamanho restrito da população, dispersão limitada, o problema da endogamia, área de ocorrência relativamente pequena e fragmentada associadas aos dados genéticos obtidos neste estudo que mostram alta estruturação geográfica da população, baixa divergência genética entre os haplótipos mitocondriais detectados e a não detecção de polimorfismo na região ITS/5.8S do rDNA nuclear, sugerem a preservação de toda a área de ocorrência de *M. capixaba* e, até mesmo, recomposição florestal.

Apesar de *M. capixaba* ser endêmica, sua biologia geral é pouco conhecida. Estudos adicionais referentes à alimentação e comportamento dessa abelha, bem como o aperfeiçoamento de técnicas de criação devem ser realizados a fim de elaborar um projeto de manejo adequado para a conservação e exploração racional dessa espécie.

Parcerias com as comunidades locais devem ser realizadas, a fim de conscientizar sobre a importância da proteção e manutenção de colônias de *M. capixaba* em seu habitat natural. Também é importante orientar os meliponicultores sobre técnicas de manejo adequadas procurando manter níveis recomendáveis de alelos sexuais de *M. capixaba* em seus meliponários. Recomenda-se, até mesmo, o transporte racional de algumas colônias de *M. capixaba* em prol da conservação dessa espécie símbolo da região serrana do Espírito Santo.

## 5 – CONCLUSÕES

A baixa variabilidade genética, inferida pela baixa detecção de polimorfismos na população de *M. capixaba* analisada, somada à baixa divergência genética observada, são preocupantes e, certamente, estão contribuindo com a condição de espécie ameaçada de extinção.

A alta estruturação da população de *M. capixaba* inferida pelos valores de  $\Phi_{ST}$ , estimados através de polimorfismos tRNA/COI, deve ser interpretada com cuidado, considerando o comportamento biológico da mesma, tamanho da população, influência antrópica e outros fatores, incluindo seleção natural e frequência de haplótipos.

As barreiras da fragmentação florestal e da limitação de dispersão da *M. capixaba* parecem estar sendo ultrapassadas através de translocações de colônias conduzidas por meliponicultores e/ou criadores. Essa translocação de colônias pode estar contribuindo para a diminuição da endogamia e com isso favorecendo a espécie.

Esforços no sentido de conduzir o manejo e conservação de *M. capixaba* devem ser efetuados visando elevar a população em número de colônias, aumentar a diversidade genética, recolonizar áreas onde essa espécie foi extinta, bem como garantir a integridade de sua área de ocorrência.



## 6 – ANEXO

**Tabela 5** – Amostras avaliadas, haplótipos identificados e localidades de coleta

<b>A</b>	<b>H</b>	<b>Município e respectiva localidade</b>
1	I	AIC - Matilde (RPPN Oiutrem) - Adquirida na região de Tijuco Preto – DM
2	II	AIC - Matilde (RPPN Oiutrem) - Adquirida na região de Tijuco Preto – DM
3	I	AIC - Matilde (RPPN Oiutrem) - Adquirida na região de São Bento de Urânia
4	III	AIC - São Roque de Maravilha - Nativa da região
5	III	AIC - São Roque de Maravilha - Nativa da região
6	III	AIC - Três Cruzes / São Bento de Urânia - Nativa da região
7	IV	MF - Victor Hugo
8	IV	MF - Victor Hugo
9	IV	MF - Victor Hugo
10	II	AIC - São Bento de Urânia (A)
11	IV	AIC - São Bento de Urânia (A)
12	III	AIC - São Bento de Urânia (B)
13	V	AIC - São Bento de Urânia (B)
14	III	AIC - São Bento de Urânia (B)
15	III	VA - Castelinho (A)
16	I	VA - Castelinho (A)
17	I	VA - Castelinho (A)
18	I	VA - Castelinho (B)
19	I	VA - Vila Maria (A)
20	I	VA - Vila Maria (A)
21	I	VA - Vila Maria (A)
22	I	VA - Vila Maria (B)
23	I	VA - Vila Maria (B)
24	I	VA - Vila Maria (B)
25	I	VA - Taquaraçu
26	I	VA - Taquaraçu
27	I	VA - Taquaraçu
28	I	VA - São Brás de Maravilha
29	I	VA
30	V	CC - Adquirida em Mata Fria
31	VI	CC - Adquirida em Ribeirão do Meio
32	II	CC - Adquirida em Mata Fria
33	IV	CC - Ribeirão do Meio - Córrego do Pilão - BR262 Km 125
34	VII	CC - Ribeirão do Meio - Córrego do Pilão - BR262 Km 125
35	VII	CC - Ribeirão do Meio - Córrego do Pilão - BR262 Km 125
36	VI	CC - Vizinho da fazenda acima
37	VII	CC - Vizinho da fazenda acima
38	IV	VNI - Alto Caxixe - (A)
39	IV	VNI - Alto Caxixe - (A)
40	I	VNI - Alto Caxixe - (B)
41	IV	VNI - Alto Caxixe - (B)
42	IV	VNI - Alto Caxixe - (B)- Nativa da região
43	IV	VNI
44	V	VNI
45	III	VNI - Adquirida na região de Alfredo Chaves
46	III	VNI - Adquirida na região de Alfredo Chaves
47	I	DM - São Paulo do Aracê - (A)
48	I	DM - São Paulo do Aracê - (A)
49	IV	VNI - Alto Caxixe - (C)
50	IV	VNI - Alto Caxixe - (C)
51	IV	VNI - Alto Caxixe - (C)
52	IV	VNI - Alto Caxixe - (D)
53	V	VNI - Alto Caxixe - (D)

**Tabela 5 – Continuação**

<b>A</b>	<b>H</b>	<b>Município e respectiva localidade</b>
54	V	VNI - Alto Caxixe - (D)
55	IV	DM - Braço do Sul
56	V	DM - Braço do Sul - Adquirida em São Paulo do Aracê
57	IV	DM - Braço do Sul
58	V	DM - Braço do Sul - Adquirida em São Paulo do Aracê
59	IV	DM - Alto Jucu
60	I	DM - Alto Jucu
61	I	DM - Alto Jucu
62	I	DM - Alto Jucu
63	V	AfC - Fazenda Alto Guandu
64	V	AfC - Fazenda Alto Guandu
65	IV	AfC - Fazenda Alto Guandu
66	II	DM - Lajinha (Fazenda Roda D'agua)
67	IV	DM - Lajinha (Fazenda Roda D'agua)
68	V	DM - Lajinha (estrada para Afonso Cláudio)
69	V	DM - Lajinha (estrada para Afonso Cláudio)
70	V	DM - Lajinha (estrada para Afonso Cláudio) - Nativa da região
71	V	DM - Lajinha (Fazenda Santo Antônio)
72	IV	DM - Lajinha (Fazenda Santo Antônio)
73	V	DM - Lajinha (Fazenda Santo Antônio)
74	IV	DM - Lajinha
75	V	DM - Lajinha (Fazenda Fundação Faesia)
76	V	DM - Lajinha (Fazenda Fundação Faesia)
77	V	DM - Lajinha (Sítio do Vovô)
78	V	DM - Lajinha (Sítio do Vovô)
79	IV	DM - Rota do Lagarto Km3 - Pedra Azul
80	IV	DM - Rota do Lagarto Km3 - Pedra Azul
81	IV	DM - Rota do Lagarto Km5 - Pedra Azul
82	IV	DM - Rota do Lagarto Km5 - Pedra Azul
83	IV	DM - Sítio Pedra Azul
84	IV	DM - Sítio Pedra Azul - Nativa da região
85	IV	DM - São Paulo do Aracê (B)- Nativa da região
86	IV	DM - São Paulo do Aracê (B)- Nativa da região
87	IV	DM - São Paulo do Aracê (C)
88	V	DM - Tijuco Preto
89	V	DM - Tijuco Preto - Nativa da região
90	V	DM - Tijuco Preto
91	V	ST - São Pedro - Adquirida em Garrafão - SMJ
92	VIII	ST - São Pedro - Adquirida em Garrafão - SMJ
93	V	ST - Adquirida em Domingos Martins

\* A: Amostra. H: haplótipos. AfC: Afonso Cláudio. AfC: Alfredo Chaves. CC: Conceição do Castelo. DM: Domingos Martins. MF: Marechal Floriano. SMJ: Santa Maria de Jetibá. ST: Santa Tereza. VA: Vargem Alta. VNI: Venda Nova do Imigrante. As amostras identificadas como nativa da região foram coletas na mata. A, B, C e D indicam pontos de coleta distintos na mesma localidade.

**Tabela 6** – Enzimas de restrição utilizadas para avaliar DNA de 12 operárias de *M. capixaba* e o número de fragmentos observados

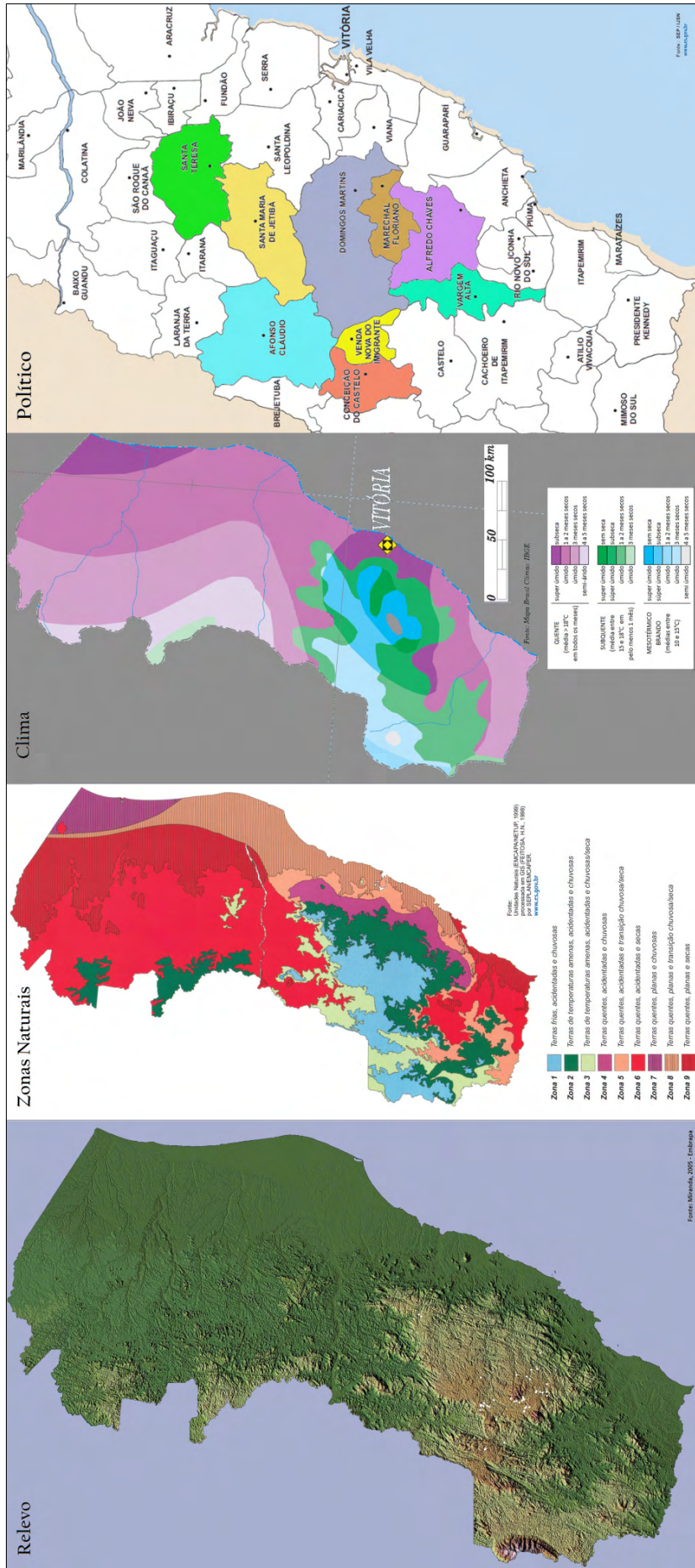
Enzima	Sítio de restrição	Nº de fragmentos observados	
		rDNA	mtDNA
<i>Acu</i> I (BioLabs)	5' CTGAAGN <sub>16</sub> 3'	0	2
<i>Bam</i> HI (Invitrogen)	5' GGATCC 3'	0	0
<i>Ban</i> II (BioLabs)	5' GRGCTC 3'	2	2
<i>Bcl</i> I (BioLabs)	5' CCATCNNNNN 3'	3	2
<i>Bcl</i> I (Promega)	5' TGATCA 3'	3	4
<i>Bcn</i> I ( <i>Cau</i> II) (Fermentas)	5' CCCGG 3'	5	0
<i>Bfal</i> (BioLabs)	5' CTAG 3'	6	0
<i>Bgl</i> I (BioLabs)	5' GCCNNNNNG 3'	2	0
<i>Bgl</i> II (Amersham Pharmacia)	5' AGATCT 3'	2	0
<i>Bsa</i> BI (BioLabs)	5' GATNNNNATC 3'	0	3
<i>Bse</i> G I ( <i>Fok</i> I) (Fermentas)	5' GGATGNN 3'	2	2
<i>Bst</i> I (BioLabs)	5' CCNNNNNNNGG 3'	6	3
<i>Bsp</i> 68 I ( <i>Nru</i> I) (Fermentas)	5' T CGCGA 3'	3	0
<i>Bsr</i> I (BioLabs)	5' ACTGGN 3'	2	4
<i>Bst</i> NI (BioLabs)	5' CCWGG 3'	3	3
<i>Bts</i> CI (BioLabs)	5' GGATGNN 3'	3	2
<i>Cfr</i> 42 I ( <i>Sac</i> II) (Fermentas)	5' CCGCGG 3'	5	0
<i>Cla</i> I (Invitrogen)	5' ATCGAT 3'	0	0
<i>Dra</i> I (Fermentas)	5' TTTAAA 3'	2	4 ou 5
<i>Eco</i> R I (Invitrogen)	5' GAATTC 3'	0	0
<i>Eco</i> R V (Invitrogen)	5' GATATC 3'	2	0
<i>Fok</i> I (BioLabs)	5' GGATGN <sub>13</sub> 3'	3	2
<i>Hae</i> II (BioLabs)	5' RGCCTC 3'	0	0
<i>Hind</i> III (Invitrogen)	5' AAGCTT 3'	0	0
<i>Hinf</i> I (Fermentas)	5' GANTC 3'	9	3 ou 4
<i>Hph</i> I (Fermentas)	5' GGTGANNNNNNN 3'	3	0
<i>Hpy</i> CH4IV (BioLabs)	5' ACGT 3'	7	2
<i>Ksp</i> A I ( <i>Hpa</i> I) (Fermentas)	5' GTTAAC 3'	2	0 ou 2
<i>Mfe</i> I (BioLabs)	5' CAATTG 3'	2	3
<i>Mme</i> I (BioLabs)	5' TCCRACN <sub>20</sub> 3'	3	2
<i>Msp</i> I (Sigma)	5' CCGG 3'	11	0 ou 2
<i>Nco</i> I (Fermentas)	5' CCATGG 3'	0	0
<i>Nde</i> I (Invitrogen)	5' CATATG 3'	0	0
<i>Nmu</i> C I ( <i>Tsp</i> 45 I) (Fermentas)	5' GTSAC 3'	7	0
<i>Pst</i> I (Invitrogen)	5' CTGCAG 3'	0	0
<i>Pvu</i> II (Invitrogen)	5' CAGCTG 3'	2	0
<i>Rsa</i> I (Invitrogen)	5' GTAC 3'	3	0
<i>Sac</i> I (Promega)	5' GAGCTC 3'	0	3
<i>Sau</i> 3A I ( <i>Mbo</i> I) (Promega)	5' GATC 3'	2	5
<i>Sca</i> I (Invitrogen)	5' AGTACT 3'	0	0
<i>Scr</i> FI (BioLabs)	5' CCNGG 3'	0	4
<i>Sma</i> I (Promega)	5' CCCGGG 3'	3	0
<i>Ssp</i> I (Sigma)	5' AATATT 3'	0	5 ou 6
<i>Sty</i> D4I (BioLabs)	5' CCNGG 3'	0	4
<i>Taq</i> I (Invitrogen)	5' TCGA 3'	3	3
<i>Tas</i> I ( <i>Tsp</i> E I) (Fermentas)	5' AATT 3'	7	3
<i>Tse</i> I (BioLabs)	5' GCWGC 3'	4	5
<i>Tsp</i> RI (BioLabs)	5' NNCASTGNN 3'	0	0
<i>Xba</i> I (Invitrogen)	5' TCTAGA 3'	0	0
<i>Xho</i> I (Invitrogen)	5' CTCGAG 3'	3	0

\* (R) G ou A. (Y) C ou T. (W) A ou T. (S) C ou G. (N) G, A, T ou C. Fragmentos menores que 50 pb não foram considerados.

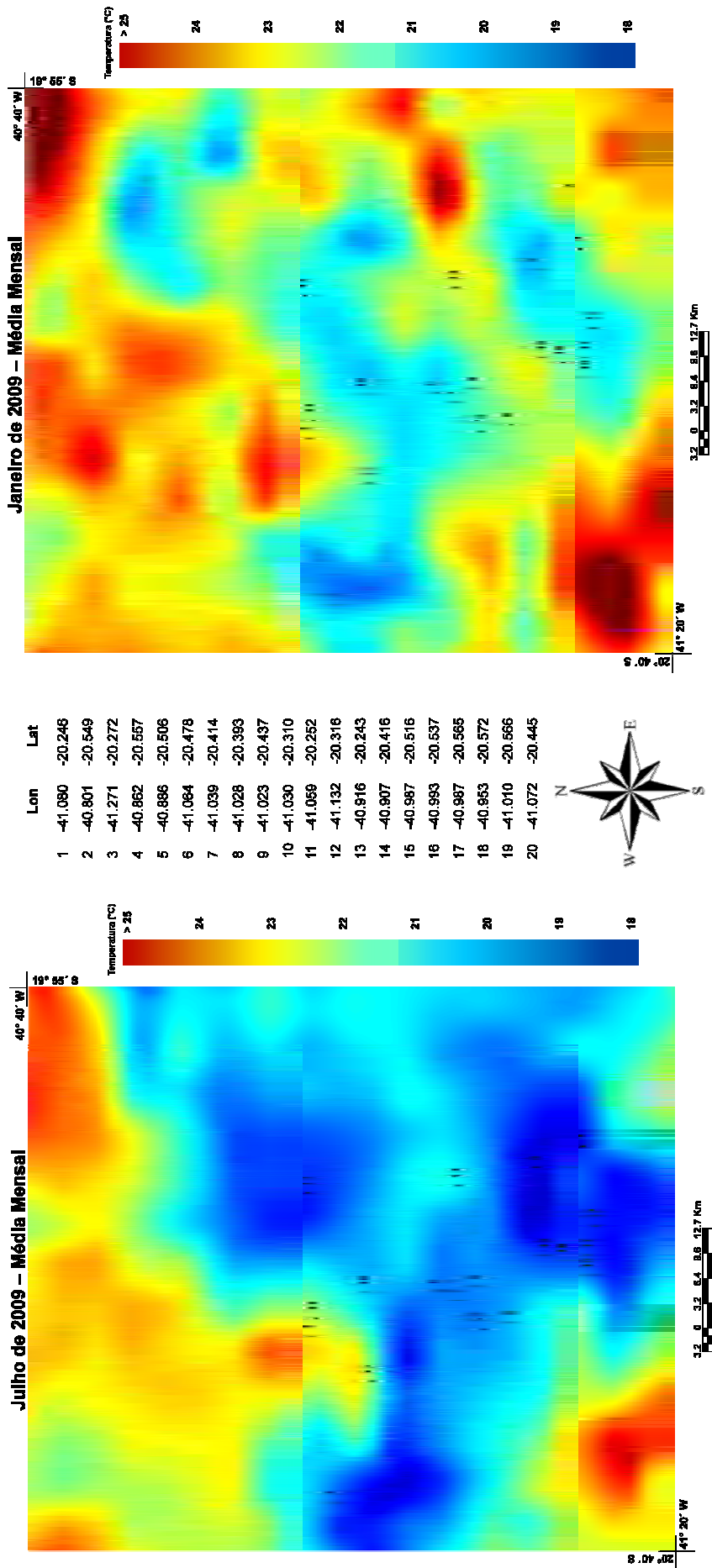
**Tabela 7** – Matriz binária de haplótipos estimada com base nos sítio de restrição polimórficos para a região tRNA/COI do mtDNA de *M. capixaba*

<b>HAPLÓTIPO</b>	<b><i>Dra</i>I</b>	<b><i>Hin</i>I</b>	<b><i>Ksp</i>AI</b>	<b><i>Msp</i>I</b>	<b><i>Ssp</i>I</b>
<b>I</b>	1	0	0	0	011
<b>II</b>	1	1	0	1	111
<b>III</b>	0	0	0	0	011
<b>IV</b>	1	1	0	1	110
<b>V</b>	0	1	0	1	111
<b>VI</b>	1	1	0	1	101
<b>VII</b>	0	1	1	1	111
<b>VIII</b>	0	1	0	0	111

\* 1: presença de sítio de restrição. 0: ausência de sítio de restrição



**Figura 13** – Mapas de relevo, zonas naturais, clima e político do Estado do Espírito Santo. Note o relevo acentuado no local de ocorrência da abelha *M. capixaba* ao sul do estado. Terras frias, acidentadas e chuvosas na região corada em azul no mapa de zonas naturais. Médias anuais de temperatura entre 10 e 15°C representada pelos tons de azul no mapa de clima, quanto mais forte o tom da cor maior é a umidade relativa do ar. Cidades, mostradas em cores no mapa político, em que foram coletadas operárias de *Melipona capixaba*. Fontes dos mapas: Relevo (Embrapa/MIRANDA, 2005 – www.relevobr.cnpn.embrapa.br), Clima (IBGE, 2002 – www.ibge.gov.br), Zonas Naturais e Político (SEP/IJSN – www.es.gov.br).



**Figura 14** – Mapas climáticos, correspondentes às temperaturas médias dos meses de janeiro e julho, da região de ocorrência de *M. capixaba*. Os pontos enumerados correspondem a localidades de coleta de *M. capixaba*. Mapas cedidos gentilmente pela Dr<sup>a</sup>. Elisabete Caria Morais do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE).

## 7 – REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS J.; RAFF M.; ROBERTS K.; WALTER P. Molecular Biology of the Cell. ed. 4 New York: Garland Sciences, 2004.

ARIAS, M.C.; INFANTE-MALACHIAS, M.E. O emprego de enzimas de restrição para a detecção de polimorfismo no DNA. *In: Biologia Molecular e evolução*. Holos Editora. p. 143-152, 2001.

BARNI, G.S.; STRAPAZZON, R.; GUERRA Jr.; J.C.V.; MORETTO, G. Mitochondrial genome differences between the stingless bees *Melipona rufiventris* and *Melipona mondury* (Apidae: Meliponini). *Genetics and Molecular Research*. 6(1): 8-14, 2007.

BASTOS, R.G.; DESCHAMPS, J.C.; DELLAGOSTIN, O.A. Characterization of the swine stress gene. *Ciência Rural*, Santa Maria. 28(2): 317-319, 1998.

BATALHA-FILHO, H.; Distribuição geográfica, filogeografia e história evolutiva da abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Viçosa-MG. 67 p., 2008.

BATALHA-FILHO, H.; MELO, G.A.R.; WALDSCHMIDT, A.M.; CAMPOS, L.A.O.; FERNANDES-SALOMÃO, T.M. Geographic distribution and spatial differentiation in the color pattern of abdominal stripes of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae). *Zoologia*. 26 (2): 213-219, 2009.

BENEVENUTO, J; PASSAMANI, P.Z.; TAVARES, M.G.; FERNANDES-SALOMÃO, T.M.; CAMPOS, L.A.O. Análise do grau de variabilidade genética de populações de *Melipona capixaba* (Hymenoptera: Apidae) através de marcadores microssatélites. *Anais do 54º Congresso Brasileiro de Genética*. Salvador-BA, 2008.

BORGES, A. B. Variabilidade genética de *Partamona helleri* Friese, 1900 (Hymenoptera, Apidae). Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Viçosa-MG. 67 p., 2007.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*. 32: 314-331, 1980.

BRITO, R.M.; ARIAS M.C. Mitochondrial DNA characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by PCR+RFLP and sequencing. *Apidologie*. 36: 431-437, 2005.

BROWN, J.C.; ALBRECHT, C. The effect of tropical deforestation on stingless bees of the Genus *Melipona* (Insecta: Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in central Rondônia, Brazil. *Journal of Biogeography*. 28: 623-634, 2001.

BUCKLER, I.E.S.; IPPOLITO, A.; HOLTSFORD, T.P. The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications. *Genetics*. 145: 821-832, 1997.

BURGER, G.; FORGET, L.; ZHU, Y.; GRAY, M.W.; LANG, F.B. Unique mitochondrial genome architecture in unicellular relatives of animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(3): 892-897, 2003.

CALCAGNOTTO, D. Taxas de evolução e o relógio molecular. *In: Biologia Molecular e evolução*. Holos Editora. p. 51-63, 2001.

CAMARGO, C.A. Properties of the X<sup>o</sup> gene, sex-determining in *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). VIII Congress International Union for the Study of Social Insects, p. 191-192, 1977.

CAMPOS, L.A.O. *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836. *In: Machado, A. B. M.; Fonseca, R. B.; Machado, L. M. S; Aguiar, L.V. L. (ed.). Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna de Minas Gerais*. Belo Horizonte. Biodiversitas. p. 560-561, 1998.

CIOCIOLA, A.I.; ZUCCHI, R.A.; STOUTHAMER, R. Molecular key to seven Brazilian species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) using sequences of the ITS2 region and restriction analysis. *Neotropical Entomology*. 30(2): 259-262, 2001.

COLLET, T.; ARIAS, M.C.; LAMA, A.D. 16S mtDNA variation in *Apis mellifera* detected by PCR-RFLP. *Apidologie*. 38: 1-8, 2007.

CRUZ, C.D. Programa Genes; versão Windows, Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV. 2005

CRUZ, D.O.; JORGE, D.M.M.; PEREIRA, J.O.P.; TORRES, C.E.A.S.; FREITAS, B.M.; GRANGEIRO, T.B. Intraspecific variation in the first internal transcribed spacer (ITS1) of the nuclear ribosomal DNA in *Melipona subnitida* (Hymenoptera, Apidae) an endemic stingless bee from northeastern Brazil. *Apidologie*. 37: 376-386, 2006.

DE LA RÚA, P.; FUCHS S.; SERRANO, J. A scientific note on the ITS-1 region of *Apis mellifera* subspecies. *Apidologie*. 38: 378-379, 2007a.

DE LA RÚA, P.; MAY-ITZÁ, W.J.; SERRANO, J.; QUEZADA-EUÁN J.J.G. Sequence and RFLP analysis of the ITS2 ribosomal DNA in two neotropical



social bees, *Melipona beecheii* and *Melipona yucatanica* (Apidae, Meliponini). *Insectes Sociaux*. 54: 418-423, 2007b.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131: 479-491, 1992.

FERNANDES-SALOMÃO, T.M.; MURO-ABAD, J.I.; CAMPOS, L.A.O.; ARAÚJO, E.F. Brief report Mitochondrial and nuclear DNA characterization in the *Melipona* species (Hymenoptera, Meliponini) by RFLP analysis. *Hereditas*. 137: 229-233, 2002.

FERNANDES-SALOMÃO, T.M.; ROCHA, R.B.; CAMPOS, L.A.O.; ARAÚJO, E.F. The first internal transcribed spacer (ITS-1) of *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): characterization and phylogenetic analysis. *Insectes Sociaux*. 52: 11-18, 2005.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ªed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220 p., 1998.

FRANCISCO, F.O.; SILVESTRE, D.; ARIAS, M.C. Mitochondrial DNA characterization of five species of *Plebeia* (Apidae: Meliponini): RFLP and restriction maps. *Apidologie*. 32: 323-332, 2001.

FUJII, J.; OTSU, K.; ZORZATO, F.; LEON, S.; KHANNA, V.K.; WEILER, J.E.; O'BRIEN, P.J.; McLENNAN, D.H. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*. 253: 448-451, 1991.

GIANNINI, K.M.; BEGO, L.R. Labor division among workers of *Melipona compressipes* fasciculata with comments on task specialization (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Iheringia. Série Zoologia*. 85: 109-114, 1988.

GORAB, E.G. Evolução dos genes nucleares de RNA ribossômico. *In: Matioli, S. R. Biologia Molecular e Evolução*. Holos Editora. p. 64-69, 2001.

GOUVÊA, P.C.L.; SILVA, M.D.; FLORENCE, C. T.; ROSA J.F.; M. RAMALHO; OLIVEIRA J.P.L.; MONTEIRO D. Efeito da fragmentação sobre a diversidade de Meliponina (Apidae) na escala da paisagem em mosaico no corredor central da mata atlântica (BA). *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*. Caxambu-MG, 2007.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS. J.; SHARP. P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*. 39: 439-446, 1974.

FELSENSTEIN, J. PHYLIP - phylogeny inference package (v3.5). *Cladistics*. 5: 164–166, 1989.

HARIZANIS, P.; BOUGA, M. Genetic structure of the bee from Crete Island (Greece). XXVIIIth International Apicultural Congress, Final Programme and Book of Abstracts, Ljubljana, Slovenia. p. 696, 2003.

HARTL, D.L.; JONES, E.W. *Genetics principles and analysis*. Jones and Bartlett Publishers. ed.4, 1998.

HEBLING, N.J.; KERR, W.E.; KERR, F.S. Divisão de trabalho entre operárias de *Trigona (Scaptotrigona) xanthotricha* Moure. *Papéis Avulsos de Zoologia*. 16: 115-127, 1964.

JI, YA-JIE; ZHANG, DE-XING; HE, LI-JUN. Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. *Molecular Ecology Notes*. 3: 581-585, 2003.

LAWYER F.C.; STOFFEL S.; SAIKI R.K.; CHANG S.Y.; LANDRE P.A.; ABRAMSON R.D.; GELFAND D.H. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods and Applications*. 2: 275-287, 1993.

KERR, W.E. *Biologia, manejo e genética de Melipona compressipes fasciculata* Smith (*Hymenoptera: Apidae*). Tese Prof. Titular, UFM, São Luiz / MA. 141p., 1987.

KERR, W.E. Some aspects of the evolution of social bees (Apidae). *Evolutionary Biology*. 3(4): 119-175, 1969.

KERR, W.E.; CARVALHO, G.A., NASCIMENTO, V.A. The probable consequences of the destruction of brazilian stingless bees: 395-404. *In*: Padoch, C.; Ayres, J. M.; Pinedo-Vasquez, M.; Henderson, A. *Várzea: diversity, development and conservation of Amazonia's whitewater floodplains*. New York botanical Garden Press, New York. 407 p., 1999.

KERR W.E.; CARVALHO G.A.; SILVA A.C.; ASSIS, M.G.P.; Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *In*: *Parcerias Estratégicas*, nº 12. Brasília: (Ministério da Ciência e Tecnologia Centro de Estudos Estratégicos), 2001.

KERR, W.E.; LELLO, E. Sting glands in stingless bees a vestigial character (*Hymenoptera, Apidae*). *Journal of the New York Entomological Society*. 70: 190-214, 1962.

KERR, W.E.; VENCOSKY, R. Melhoramento genético em abelhas. I. Efeito do número de colônias sobre o melhoramento. *Brazilian Journal of Genetics*, Ribeirão Preto. v. 2, p. 279-285, 1982.

LEWIN, B. Clusters and repeats. *In: Genes VII*, Oxford University Press Inc. New York. 990 p., 2000.

LOPES D.M. Diversidade e estrutura genética em populações de *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae) por análise de microssatélites. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Viçosa-MG. 2004.

MANTEL N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220, 1967.

MILLER, M.P. Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* 96: 722-724, 2005.

McELROY, D.; MORAN, P.; BIRMINGHAM, E.; KORNFIELD, I. REAP (restriction enzyme analysis package) version 4.0, Orono: University of Maine. 1991.

MELO, G.A.R. Notes on the nesting biology of *Melipona capixaba* (Hymenoptera, Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*. 69(2): 207-210, 1996.

MELO, G.A.R. Notas sobre meliponíneos neotropicais, com a descrição de três novas espécies (Hymenoptera, Apidae). *In: Apoidea Neotropica* (Melo G.A.R. e Santos I.A., eds.). Unesc, Criciúma. 85-91, 2003.

MICHENER, C.D. The social behavior of the bees. Harvard University Press. 404 pp., 1974.

MICHENER, C.D. The bees of the world. The John Hopkins University Press. Baltimore. 913 p., 2000.

MORETTO, G.; ARIAS M.C. Detection of mitochondrial DNA restriction site differences between the subspecies of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Neotropical Entomology*. 34(3): 381-385, 2005.

MOURE, J.S. *Melikerria* e *Eomelipona*, dois subgeneros novos em *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera, Apidae). *Anais do Encontro Brasileiro de Biologia de Abelhas e outros Insetos Sociais: Naturalia* (edição especial). 62-66, 1992.

MOURE, J.S.; CAMARGO, J.M.F. *Melipona (Michmelia) capixaba*, uma nova espécie de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) do sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 11(2): 289-296, 1994.

MOURE, J.S.; URBAN, D.; MELO, A.R. Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the neotropical region. Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia. p. 272, 2007.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 55: 335-350, 1987.

NAHUM, L.A. Evolução dos genomas. *In*: Mاتيoli, S. R. *Biologia molecular e evolução*. Holos Editora. p. 51-63, 2001.

NASCIMENTO, V.A.; MATUSITA, S.H.; KERR, W.E. Evidence of hybridization between two species of *Melipona* bees. *Genetics and Molecular Biology*. 23(1): 79-81, 2000.

NASCIMENTO, V.A. Aspectos biológicos, ecológicos e genéticos da *Melipona (Michmelia) capixaba* – Moure e Camargo, 1994 (Hymenoptera, Apidae). Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Uberlândia-MG. 73 p., 1996.

NASH, J.H.E. DNAfrag, v. 3.03. Ottawa: Institute for Biological Sciences. 1991.

NEI, M.; MILLER J.C. A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. *Genetics*. 125: 873-879, 1990.

NEI, M.; TAJIMA, F. DNA Polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*. 97: 145-163, 1981.

NOGUEIRA, J. Variabilidade genética de *Melipona capixaba* Moure & Camargo, 1994 (Hymenoptera: Apidae), espécie ameaçada de extinção: subsídios para sua conservação. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Viçosa-MG. 2009.

NOSEK, J.; TOMÁŠKA, L. Mitochondrial genome diversity: evolution of the molecular architecture and replication strategy. *Current Genetics*. 44: 73-84, 2003.

OLIVERIO, M.; CERVELLI, M.; MARIOTTINI, P. ITS2 rRNA evolution and its congruence with the phylogeny of muricid neogastropods (Caenogastropoda, Muricoida). *Molecular Biology and Evolution*. 25: 63-69, 2002.

QUEZADA-EUÁN, J.J.G.; PAXTON R.J.; PALMER, K.A.; MAY-ITZÁ W.J.; TAY W.T.; OLDROYD B.P. Morphological and molecular characters reveal

differentiation in an Neotropical social bee, *Melipona beecheii* (Apidae: Meliponini). *Apidologie* 38: 247-258, 2007.

RESENDE H.C.; BARROS F.; CAMPOS, L.A.O.; FERNANDES-SALOMÃO T. M. Visitação de orquídea por *Melipona capixaba* Moure & Camargo (Hymenoptera: Apidae), abelha ameaçada de extinção. *Neotropical Entomology*. 37(5): 609-611, 2008.

ROCHA, M.P.; POMPOLO, S.G.; CAMPOS, L.A.O. Citogenética da Tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). *In*: MELO, G.A.R.; ALVES-DOS-SANTOS, I. Citogenética da Tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). Editora Unesc, Crisciúma. 2003.

ROHLF F.J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system for the IBM PC microcomputer (and compatible), version 1.40, Oxford University Press, New York. 1988.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOEFFEL, S.; SHCARF, S.J.; HIGUCHI, G.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239: 487-491, 1988.

SANDE C.A.F.M.; van der KWA M.; VAN NUES R.W.; VAN HEERIKHUIZEN H.; RAUE H.A.; PLANTA R.J. Functional analysis of internal transcribed spacer 2 of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA. *Journal of Molecular Biology*. 223: 899-910, 1992.

SCHNEIDER S.; ROESSLI D.; EXCOFFIER L. Arlequin, Version: 2.0: A software for population data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. 2000.

SHEPPARD, W.S.; McPHERON B.A. Ribosomal DNA diversity in Apidae. *In*: Smith D. R. (ed.). *Diversity in the Genus Apis*. Boulder, Colorado, Westview Press. p. 89-102, 1991.

SHINOHARA M.L.; LOBUGLIO K.F.; ROGERS S.O. Comparison of ribosomal DNA ITS regions among geographic isolates of *Cenococcum geophilum*. *Current Genetics*. 35: 527-535, 1999.

SILVEIRA, A.F., MELO G.A.R; ALMEIDA E.A.B. Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. Fundação Araucária, Belo Horizonte, 253p., 2002.

SILVESTRE, D. Sequenciamento e análise do genoma mitocondrial de *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo. 119p., 2002.

SILVESTRE, D.; DOWTON, M.; ARIAS, M.C. 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. *Genetic and Molecular Biology*. 31(2): 451-460, 2008.

SONGRAM, O.; SITTIPRANEED, S.; KLINBUNGA, S. Mitochondrial DNA diversity and genetic differentiation of the honeybee (*Apis cerana*) in Thailand. *Biochemical Genetics*. 44(5/6), 2006.

TAYLOR, D.B.; MOON, R.; GIBSON G.; SZALANSKI. Genetic and morphological comparisons of new and old world populations of *Spalangia* species (Hymenoptera: Pteromalidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 99(5): 799-808, 2006.

VAN NUES, R.W.; VENEMA, J.; RIENTJES, J.M.J.; DIRKS-MULDER, A.; AUE, H.A. Processing of eukaryotic pre-rRNA: the role of the transcribed spacers. *Biochemistry and Cell Biology*. 73: 789-801, 1995.

WESTRICH, P. Habitat requirements of central European bees and the problems of partial habitats. *In: Matheson A.; Buchmann S.L.; O'Toole, C.; Westrich, P.; Williams, I.H. (eds.) The conservation of bees. Linnean Society Symposium Series no.18. Londres, Academic. p. 1-16, 1996.*

WILSON, A.C.; CANN R.L.; CARR S.M.; GEORGE M.; GYLLENSTEN, U.B.; HELM-BYCHOWSKI, K.M.; HIGUCHI, R.G.; PALUMBI S.R.; PRAGER E.M.; SAGE R.D.; STONEKING M. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*. 26: 375-400, 1985.

WILSON, E.O. The insect societies. Press of Havard University Press. Cambridge, Massachusetts. p. 89-93, 1971.

WRIGHT, S. Evolution and the genetics of populations. The University of Chicago Press, London. 1978.

WYMAN, A.R.; WHITE, R. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 77: 6754-6758, 1980.

YOKOTA, Y.; KAWATA, T.; IIDA, Y.; KATO, A.; TANIFUJI, S. Nucleotide sequences of the 5.8S rRNA gene and transcribed spacer regions in carrot and broad bean ribosomal DNA. *Journal of Molecular Evolution*. 29: 294-301, 1989.