

RUTE MAGALHÃES BRITO

Análise molecular e populacional
de *Partamona mulata* (Moure In Camargo, 1980)
e *Partamona helleri* (Friese, 1900)
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Tese de doutorado apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências, na área
de Biologia/Genética.

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Cristina Arias

São Paulo - SP

2005

Ficha Catalográfica

Análise molecular e populacional de *Partamona mulata* (Moure In Camargo, 1980) e *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

xiii+189 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Biologia/Genética.

1. *Partamona* 2. DNAm 3. Microssatélites 4. Genética de populações
I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Biologia/Genética.

Comissão Jul gadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dra. Maria Cristina Arias
Orientadora

Dedicatória

*Aos meus queridos pais
Ângelo e Inez,
meu porto seguro...*

Agradecimentos

- À minha orientadora, profa. Cristina Arias, por seus ensinamentos, pela abertura e diálogo;
- Ao Dr. Warwick Estevam Kerr pela generosidade;
- Às pessoas que me ajudaram nas coletas das abelhas: pela acolhida, pelo apoio logístico, pelas dicas de ninhos e pelo suor no campo. Em especial: Sr. Lauro e Prof. Geraldo Moretto (SC); Profa. Vera Lucia Imperatriz-Fonseca e Museu de Zoologia (USP) (SP); Prof. Lucio Antônio O. Campos (MG); D. Deni e Odilon Rabelo (ES); Prof. Marco A. Costa, Fafá e Júlio (BA); NIEFA (Núcleo Integrado para Estudo da Fauna – UFMT), Assis, Kleber, Waldo e Rosina (MT);
- Aos Srs. João Lousano e Jaime Martina, em nome de todos os pequenos e grandes proprietários que nos permitiram entrar em suas terras para realização das coletas;
- À Dra. Silvia Regina de Menezes Pedro da FFCLRP – USP, pela identificação dos espécimes e pela agradável colaboração;
- Aos colegas e agregados que passaram no LGEA nesses quatro anos: Christian, Christiana, Dani λ, Dani Baby, Daniela, Profa. Eliana, Favísia, Geraldo, Leila, Profa. Lyria, Pamela, Dr. Steven Sheppard e Susy, por tudo que me ensinaram de Biologia Molecular, pela convivência e principalmente pelas festas de aniversário!
- Ao Sérgio Dias Hilário pela foto da capa e pela agradável convivência;
- Ao Gabriel Melo, Beatriz Coelho e Giselle Garcia, pela persuasão!
- À Bia e Gigi pela acolhida em São Paulo e sincera amizade;
- Aos tios “paulistanos” e suas famílias, que fizeram sentir-me em casa: Tio João, Tia Miriam, Tio Sócrates e Tia Lourdes;
- Ao Flaviô pela ajuda em todas as fases do processo, desde as coletas à análise estatística, e principalmente pela alegria na minha vida!
- Aos membros da banca examinadora por sua contribuição ao trabalho;
- À FAPESP pelo auxílio financeiro;
- À minha família querida: Mamãe Inez, Papai Ângelo, Sara, Ivo, Pedro Ivo, Leda, Marcelo e Celso (Salvem as Joaninhas!!);
- A Deus, por estar viva e feliz!

Índice

1. Introdução	1
1.1. Abelhas da tribo Meliponini: aspectos gerais	1
1.2. O gênero <i>Partamona</i> Schwarz (1939)	3
1.2.1. <i>Partamona mulata</i> (Moure In Camargo, 1980) E <i>P. helleri</i> (Friese, 1900)	5
1.3. Marcadores moleculares em estudos populacionais	8
1.3.1. DNA mitocondrial animal	9
1.3.2. Microssatélites	15
1.4. DNA mitocondrial e microssatélites em estudos com abelhas	20
2. Objetivos	25
3. Material e métodos	26
3.1. Material biológico	26
3.2. DNAmt	29
3.2.1. Extração de DNA	29
3.2.2. PCR+RFLP do DNAmt	30
3.2.3. Análises estatísticas	32
3.3. Microssatélites	34
3.3.1. Extração de DNA	34
3.3.2. PCR de microssatélites	35
3.3.3. Visualização dos fragmentos	36
3.3.4. Análises estatísticas	37
3.3.5. Estudo de parentesco	38
4. Resultados e discussão	39
4.1. Amplificação de microssatélites de <i>P. mulatae</i> e <i>P. helleri</i>	39
4.2. Análises populacionais	42
4.2.1. <i>Partamona mulata</i>	42
4.2.1.1. PCR+RFLP do DNAmt	42
4.2.1.2. Microssatélites	47
4.2.2. <i>Partamona helleri</i>	67
4.2.2.1. PCR+RFLP do DNAmt	67
4.2.2.2. Microssatélites	78

4.2.3. análise geral dos dados populacionais	96
4.2.3.1. <i>Partamona mulata</i>	96
4.2.3.1.1. DNAMt	96
4.2.3.1.2. Microssatélites	99
4.2.3.2. <i>Partamona helleri</i>	104
4.2.3.2.1. DNAMt	104
4.2.3.2.2. Microssatélites	108
4.2.3.3. Comparação interespecífica	113
4.2.3.3.1. DNAMt	113
4.2.3.3.2. Microssatélites	119
4.3. Relação de parentesco	121
5. Conclusões	131
6. Resumo	133
7. Abstract	134
8. Referências bibliográficas	135
Anexo 1	155
Anexo 2	183

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Operárias e entradas de ninhos de: *Partamona mulata* (A e B); *Partamona helleri* (C e D). 7
- Figura 2.** Mapa parcial da América do Sul apresentando os locais de coleta de *P. mulata* (▲) e *P. helleri* (●) em diferentes estados brasileiros. 28
- Figura 3.** Fracionamento em gel de poliacrilamida 5,6% dos fragmentos amplificados em *Partamona mulata*. 1: Mbi28. 2: Mbi32. 3: Mbi201. 4: Mbi215. 5: Mbi218. 6: Mbi278. 7: Mbi522. 8: T3-32. M: Marcador molecular 10pb ladder (*100pb). 41
- Figura 4.** Fracionamento em gel de poliacrilamida 5,6% dos fragmentos amplificados em *Partamona helleri*. 1: Mbi11. 2: Mbi28. 3: Mbi32. 4: Mbi33. 5: Mbi201. 6: Mbi215. 7: Mbi218. 8: Mbi278. 9: T4-171. M: Marcador molecular 10pb ladder (*100pb). 41
- Figura 5.** Fracionamento em gel de agarose 2% contendo os perfis de digestão de fragmentos de DNAmT de *P. mulata*. As enzimas usadas para digestão dos fragmentos estão discriminadas por raia: D: *Dra* I; C: *Cl* I; F: *Fba* I; Ha: *Hae* III; Hd: *Hind* III; Hf: *Hinf* I. Excetuando o perfil da raia 3 (Bm), todos os perfis observados foram designados como Am (Tabela 8). n: Fragmento não digerido. M: marcador de peso molecular 100 pb ladder. O tamanho das bandas marcadoras mais fortes são apresentados à direita do gel. 43
- Figura 6.** Mapa parcial da região Centro-Oeste do Brasil apresentando a distribuição dos haplótipos mitocondriais de *P. mulata*, em proporção, em seus locais de coleta. Em verde: H01; em laranja: H02. 45
- Figura 7.** Genótipos de locos microssatélite observados em *P. mulata*. Géis de poliacrilamida 5,6% contendo fragmentos amplificados de locos microssatélite. A): 1 - Mbi28; 2 - Mbi32; 3 - Mbi201; 4 - Mbi215; 5 - Mbi218. B) 1 - Mbi201. C) 1 e 2 - Mbi522. D) 1 e 2 - Mbi278. M: marcador de peso molecular 10 pb ladder, sendo a a banda mais forte a de 100 pb. 49
- Figura 8.** Fracionamento em gel de poliacrilamida 9% de fragmentos amplificados do loco microssatélite T3-32 de *P. mulata*. A, B, C e D: alelos observados na composição dos genótipos. 1 e 3: Marcador de peso molecular 10pb ladder, sendo a banda mais forte a de 100 pb. 50
- Figura 9.** Fracionamento em gel de poliacrilamida 9% de fragmentos amplificados do loco microssatélite T4-171 de *P. mulata*. A, B, C, F e G: alelos observados na composição dos genótipos. M: marcador de peso molecular 10 pb ladder, sendo a banda mais forte a de 100 pb. 50
- Figura 10.** Proporção entre alelos microssatélites encontrados em *P. mulata* nos diferentes locos estudados. Eixo X: locais de coleta (ver Tabela 1). Eixo Y: quantidade de alelos. Locos: A) Mbi28; B) Mbi32; C) Mbi201; D) Mbi215; E) Mbi218; F) Mbi278; G) Mbi522; H) T3-32; I) T4-171. 51
- Figura 11.** Fenograma obtido pelo método de Evolução Mínima a partir dos valores de distância genética obtidos de acordo com Cavalli-Sforza e Edwards (1967) relacionando as cinco populações de *P. mulata*. Poc, Cba, Cac, Sal e Cgd. 66
- Figura 12.** Fracionamento em gel de agarose 2% contendo os perfis de digestão dos fragmentos COI-IIIF/mtD18 e mtD26/mtD30 de *P. helleri*. As enzimas usadas para digestão dos fragmentos estão discriminadas por raia: D: *Dra* I; C: *Cl* I; F: *Fba* I; Ha: *Hae* III; Hf: *Hinf* I. Os perfis de digestão observados foram denominados por letras (Ah, Bh ou Ch). n: Fragmento não digerido. M: marcador de peso molecular 100 pb ladder. Os tamanhos das bandas marcadoras mais fortes estão descritos à direita do gel. 68

Figura 13. Fracionamento em gel de agarose 2% contendo os perfis de digestão dos fragmentos mtD19/Seq11 e 5612R/tPheF de *P. helleri*. As enzimas usadas para digestão dos fragmentos estão discriminadas por raia: D: *Dra* I; Hd: *Hind* III; Hf: *Hinf* I. Os perfis de digestão observados foram denominados por letras (Ah, Bh, Ch, Dh). **n**: Fragmento não digerido. **M**: marcador de peso molecular 100 pb *ladder*. Tamanho das bandas marcadas com asterisco em pares de bases: **M**: 600 e **M**₂: 500. 68

Figura 14. Mapa parcial da costa do Brasil apresentando a distribuição dos haplótipos mitocondriais de *P. helleri*, em proporção, em seus locais de coleta. Na legenda cada cor representa um dos haplótipos referidos na tabela 25. 71

Figura 15. Fenograma obtido pelo método de Evolução Mínima a partir de *d*, relacionando todos os haplótipos obtidos nas cinco populações de *Partamona helleri*. Haplótipos na cor **rosa**: Santa Catarina; **vermelho**: São Paulo; **azul**: Minas Gerais; **verde**: Bahia. **Cinza**: MG, ES, SP; **violeta**: MG e SC; **preto**: SP, ES. 73

Figura 16. Rede de inter-relações entre haplótipos de *P. helleri*. Ramos lisos indicam um sítio diferente entre haplótipos. Barras indicam número de diferenças entre os padrões de bandas observados. Haplótipos na cor **rosa**: SC; **vermelho**: SP; **azul**: MG; **verde**: BA; **cinza**: MG, ES e SP; **violeta**: MG e SC; **preto**: SP e ES. 74

Figura 17. Fenogramas obtidos pelo método de Evolução Mínima relacionando as cinco populações de *P. helleri*, SC, SP, MG, ES, BA. **A**: Fenograma a partir dos valores de δ . **B**: Fenograma a partir dos valores de F_{ST} . 76

Figura 18. Fracionamento em gel de poliacrilamida 5,6% de microssatélites amplificados de *P. helleri* correspondentes aos locos 1: **Mbi28**, 2: **Mbi201**, 3: **Mbi33**, 4: **Mbi215**. **M**: Marcador molecular 10pb *ladder* (*: 100pb). Os genótipos correspondentes às bandas observadas estão descritos acima das mesmas. 79

Figura 19. Fracionamento em gel de poliacrilamida 9% de microssatélites amplificados de *P. helleri*. A) **Mbi32**; B) **Mbi278**; C) **Mbi522**; D) **T4-171**. **M**: Marcador molecular 10pb *ladder*. (*: 100pb). Genótipos correspondentes às bandas observadas estão descritos acima das mesmas. (Na figura A, as bandas acima da barra são inespecíficas). 79

Figura 20. Proporção entre alelos microssatélites encontrados em *P. helleri* nos diferentes locos estudados. Eixo X: locais de coleta (ver Tabela 1). Eixo Y: quantidade de alelos. Locos: A) Mbi28; B) Mbi 32; C) Mbi 33; D) Mbi 201 E) Mbi 218; F) Mbi 522; G) Mbi 215; H) Mbi 278; I) T4-171. 80

Figura 21. Fenograma obtido pelo método de Evolução Mínima, a partir dos valores de distância genética obtidos de acordo com Cavalli-Sforza e Edwards (1967), relacionando as cinco populações de *P. helleri*: **S C, SP, MG, ES e BA**. 95

Figura 22. Fenograma obtido pelo método de Evolução Mínima a partir de valores de *d*, relacionando todos os haplótipos obtidos nas 10 populações de *Partamona*. **H**: haplótipos de *P. helleri*; **M**: haplótipos de *P. mulata*. 115

Figura 23. Mapa parcial da América do Sul apresentando parte dos componentes biogeográficos que integram a região Neotropical (Revisado por Camargo e Pedro, 2003). **NW**: noroeste da América do Sul; **SE**: Sudeste da América do Sul. **SWAm**: sudoeste da Amazônia; **Chocó-CA**: noroeste dos Andes até o Panamá; **NAm**: norte dos rios Negro e Amazonas – cráton Brasil/Guianas; **SEAm**: região ao sul dos rios Madeira/Amazonas, incluindo todo o Brasil central e nordeste, até o noroeste da Argentina; **Atl**: região atlântica, Bahia ao Paraná. Linhas pontilhadas apresentam principais eventos de vicariância postulados como possíveis responsáveis pelas disjunções observadas entre os grupos de *Partamona*, em ordem crescente do mais antigo para o mais recente segundo Camargo e Pedro (2003). **Elipses**: Traçados biogeográficos principais da América do Sul. **NW**: traçado noroeste; **SE**: traçado sudeste. 117

Figura 24. Fracionamento em gel de poliacrilamida 9% de fragmentos amplificados do loco **T4-171** de *P. helleri*, colônia Ph01. **M:** marcador de peso molecular 10 pb *ladder*. (*: 100pb). Os genótipos correspondentes às bandas observadas estão descritos acima das mesmas. 122

Figura 25. Alinhamento, obtido através do *software* MultiAlign (Corpet, 1988), entre seqüências de *Partamona mulata* e *P. helleri* localizadas entre os *primers* COI-IIF/mtD18 do DNAmT de ambas espécies. **1 a 263:** região 3' do gene COI; **264 a 268:** região espaçadora; **269 a 334:** tRNA Leu; **335 a 929:** região 5' do gene COII. Região marcada em amarelo: duplo códon de parada em *P. mulata* e incompleto de *P. helleri* Região marcada em azul: seqüência do tRNA^{Leu}. Substituições de bases estão destacadas em azul (bases C e A) e preto (bases T e G). 180

Figura 26. Alinhamento, obtido através do *software* MultiAlign (Corpet, 1988), entre seqüências de *Partamona mulata* e *Melipona bicolor* (Silvestre, 2002) localizadas entre os *primers* COI-IIF/mtD18 do DNAmT de ambas espécies. **1 a 265:** região 3' do gene COI; **265 a 269:** região espaçadora; **270 a 336:** tRNA^{Leu}; **337 a 931:** região 5' do gene COII. Região marcada em azul: seqüência do tRNA^{Leu}. Substituições de bases estão destacadas em azul. 181

Figura 27. Alinhamento, obtido através do *software* MultiAlign (Corpet, 1988), entre seqüências de *Partamona helleri* e *Melipona bicolor* (Silvestre, 2002) localizadas entre os *primers* COI-IIF/mtD18 do DNAmT de ambas espécies. **1 a 267:** região 3' do gene COI; **268 a 325:** tRNA^{Leu}; **326 a 929:** região 5' do gene COII. Região marcada em azul: seqüência do tRNA^{Leu}. Substituições de bases estão destacadas em azul. 182



Figura 28. Comparação entre os tRNAs da Leucina (L2) de A) *Melipona bicolor*; B) *Partamona mulata* e C) *P. helleri*. **I**  **C**el; **M**  **ç**ação. 183

Figura 29. Seqüências de locos microssatélites amplificados de *Partamona*. Os números indicam os tamanhos das seqüências em pares de bases. Em cinza: *primers*. Em azul e vermelho: repetições microssatélites. Em verde: estrutura semelhante à repetição de *M. bicolor*. As seqüências foram depositadas no GenBank sob os números de acesso, respectivamente: AY866506; AY866507; AY866508; AY866509; AY866510; AY866511; AY866512; AY866513; AY866514; AY866515; AY866516. 189

Lista de tabelas

Tabela 1. Locais de coleta, procedência e número de colônias amostradas de <i>P. mulata</i> e <i>P. helleri</i>	27
Tabela 2. Condições de PCR e pares de <i>primers</i> usados para amplificação do DNAm de <i>Partamona</i> para o PCR+RFLP. São mostrados: Conteúdo gênico por região; (Cf) Comprimento do fragmento em pares de bases; (Ta) Temperatura de anelamento em °C e enzimas utilizadas para digestão dos fragmentos.	32
Tabela 3. <i>Primers</i> derivados de <i>Apis mellifera</i> (A), <i>Bombus terrestris</i> (B), <i>Melipona bicolor</i> (Mbi) e <i>Scaptotrigona postica</i> (T), testados para a amplificação de locos microsatélites em <i>P. mulata</i> e <i>P. helleri</i> , respectiva repetição e referência. Cf: comprimento do fragmento.	36
Tabela 4. Locos de microsatélites amplificados nas espécies <i>P. mulata</i> e <i>P. helleri</i> Ta: Temperatura de hibridação dos <i>primers</i> (com número de ciclos entre parêntesis); Cfe: Comprimento esperado do fragmento (pares de bases) de acordo com a literatura; Cfo: comprimento do fragmento (pares de bases) observado. Pm: <i>P. mulata</i> ; Ph: <i>P. helleri</i> (-): Não houve amplificação.	40
Tabela 5. Fragmentos obtidos, em pares de bases, por meio de PCR+RFLP de regiões mitocondriais amplificadas de <i>P. mulata</i> , codificados como presença (1) ou ausência (0). Enzimas usadas: I - <i>Dra</i> I; II - <i>Hinf</i> I; III - <i>Cla</i> I; <i>Fba</i> I; <i>Hae</i> III; <i>Hind</i> III. (Frag.: Fragmentos).	44
Tabela 6. Haplótipos mitocondriais de <i>P. mulata</i> obtidos pela composição de perfis de digestão de fragmentos amplificados.	44
Tabela 7. Valores de divergência de seqüência de nucleotídeos (δ) (acima da diagonal) e estimativa de F_{ST} (abaixo da diagonal), entre pares de populações estudadas de <i>P. mulata</i> .	47
Tabela 8. Resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) em <i>Partamona mulata</i> . <i>P.</i> probabilidade de se obter um valor de ϕ maior do que o observado.	47
Tabela 9. Freqüências alélicas e taxas de heterozigose observada (<i>Ho</i>), esperada sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg (<i>He</i>) e não tendenciosa (<i>Hn</i>) por loco e por par de populações de <i>Partamona mulata</i> . n = número de alelos amostrados por loco e por população.	53
Tabela 10. Genótipos encontrados por loco analisado de <i>P. mulata</i> . N = número total de indivíduos analisados por localidade.	54
Tabela 11. Resumo da variação genética para cada população de <i>P. mulata</i> . N: número amostral médio, A: número médio de alelos por locos. PLP: porcentagem de locos polimórficos. (número entre parêntesis: erro padrão).	55
Tabela 12. Teste de probabilidade para a verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos locos e populações. G.L.: Graus de liberdade. (Erro padrão entre parêntesis).	56
Tabela 13. Teste para verificação de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg por deficiência de heterozigotos (Rousset e Raymond, 1995). (Erro padrão entre parêntesis).	57
Tabela 14. Valores de <i>P</i> para verificação de desequilíbrio de ligação entre pares de locos em cada população. Valores entre parêntesis: erros padrão.	58
Tabela 15. Valores de <i>P</i> para cada par de locos para todas populações para teste de verificação de desequilíbrio de ligação (Método de Fisher). G.L.: graus de liberdade.	58
Tabela 16. Estimativa de F_{ST} , entre pares de populações estudadas de <i>P. mulata</i> .	59

Tabela 17. Valores de P resultantes de teste de diferenciação alélica para cada loco. Valores entre parêntesis: erros padrão.	60
Tabela 18. Valores de P resultantes do teste de diferenciação alélica por loco para cada par de populações de <i>P. mulata</i> . Valores entre parêntesis: Erros padrão.	61
Tabela 19. Teste de diferenciação alélica para cada par de populações envolvendo todos os locos. (g.l.): graus de liberdade.	62
Tabela 20. Teste de diferenciação genotípica para cada loco estudado de <i>P. mulata</i> .	63
Tabela 21. Valores de P resultantes do teste de diferenciação genotípica por loco para cada par de populações de <i>P. mulata</i> . Valores entre parêntesis: Erros padrão.	64
Tabela 22. Teste de diferenciação genotípica para cada par de populações envolvendo todos os locos. (g.l.): Graus de Liberdade.	65
Tabela 23. Valores de distância genética entre os pares de populações de <i>P. mulata</i> de acordo com Cavalli-Sforza e Edwards (1967).	65
Tabela 24. Fragmentos obtidos, em pares de bases, por meio de PCR+RFLP de fragmentos mitocondriais amplificados de <i>P. helleri</i> , codificados como presença (1) ou ausência (0) entre diferentes padrões. Enzimas usadas: I - <i>Dra</i> I; II - <i>Hinf</i> I; III - <i>Cla</i> I; <i>Fba</i> I; <i>Hae</i> III; <i>Hind</i> III. (Frag.: Fragmentos).	69
Tabela 25. Haplótipos mitocondriais de <i>P. helleri</i> obtidos pela composição de perfis de digestão de fragmentos amplificados.	70
Tabela 26. Porcentagem de divergência de sequência de nucleotídeos entre pares de haplótipos de <i>P. helleri</i> (d) (abaixo da diagonal) e erro padrão (acima da diagonal).	72
Tabela 27. Número de haplótipos encontrados e valores de diversidade haplotípica (h) <i>non-selfing</i> e nucleotídica (π) para cada uma das populações de <i>P. helleri</i> .	73
Tabela 28. Valores de divergência de sequência de nucleotídeos (δ) entre pares de populações estudadas de <i>P. helleri</i>	75
Tabela 29. Valores de estimativa de F_{ST} (abaixo da diagonal) e de P (acima da diagonal) com erro padrão entre parêntesis, entre pares de populações estudadas de <i>P. helleri</i>	75
Tabela 30. Valores de P de acordo com o teste exato de diferenciação entre os pares de população de <i>P. helleri</i> (Entre parêntesis: erro padrão).	77
Tabela 31. Resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) em <i>Partamona helleri</i> . P : probabilidade de se obter um valor de ϕ maior do que o observado.	77
Tabela 32. Frequências alélicas e taxas de heterozigose observada (H_o), esperada sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e) e não tendenciosa (H_n) por loco e por par de populações de <i>Partamona helleri</i> n = número de alelos amostrados por loco e por população.	82
Tabela 33. Tipos de genótipos encontrados por loco analisado e suas ocorrências entre as populações estudadas. N = número total de indivíduos analisados por localidade.	83
Tabela 34. Resumo da variação genética para cada população de <i>P. helleri</i> N: número amostral médio. A: número médio de alelos por locos. PLP : porcentagem de locos polimórficos. (número entre parêntesis: erro padrão).	84

Tabela 35. Teste de probabilidade para a verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos locos e populações. G.l.: Graus de liberdade.	86
Tabela 36. Teste para verificação de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg por deficiência de heterozigotos (Rousset e Raymond, 1995).	86
Tabela 37. Valores de P para verificação de desequilíbrio de ligação entre pares de locos em cada população.	87
Tabela 38. Valores de P para cada par de locos para todas populações para teste de verificação de desequilíbrio de ligação (Método de Fisher). (g.l.): graus de liberdade.	88
Tabela 39. Estimativa de F_{ST} entre pares de populações estudadas de <i>P. helleri</i> .	88
Tabela 40. Valores de P resultantes de teste de diferenciação alélica para cada loco. Valores entre parêntesis: erro padrão.	89
Tabela 41. Valores de P resultantes do teste de diferenciação alélica por loco para cada par de populações de <i>P. helleri</i> Valores entre parêntesis: erro padrão.	90
Tabela 42. Teste de diferenciação alélica para cada par de populações envolvendo todos os locos. (g.l.): graus de liberdade.	91
Tabela 43. Teste de diferenciação genotípica para cada loco estudado de <i>P. helleri</i> .	92
Tabela 44. Valores de P resultantes do teste de diferenciação genotípica por loco para cada par de populações. Valores entre parêntesis: erro padrão.	93
Tabela 45. Teste de diferenciação genotípica para cada par de populações envolvendo todos os locos. (g.l.): Graus de Liberdade.	94
Tabela 46. Valores de distância genética entre os pares de populações de <i>P. helleri</i> de acordo com Cavalli-Sforza e Edwards (1967).	95
Tabela 47. Comparação entre resultados de análises estatísticas populacionais entre <i>Apis cerana</i> (Sittipraneed <i>et al.</i> , 2001), <i>P. remota</i> (Francisco, 2002), <i>P. mulata</i> e <i>P. helleri</i> * Média.	119
Tabela 48. Genótipos observados para os locos Mbi278, T3-32 e T4-171; número de patrilíneas estimadas e grau de parentesco observado entre indivíduos de uma mesma colônia de <i>P. mulata</i> .	123
Tabela 49. Genótipos observados para os locos Mbi215, Mbi278 e T4-171; número de patrilíneas estimadas e grau de parentesco observado entre indivíduos de uma mesma colônia de <i>P. helleri</i>	125
Tabela 50. Combinações de <i>primers</i> e temperaturas de hibridação dos <i>primers</i> testadas para regiões do DNAm de <i>P. mulata</i> e <i>P. helleri</i> não amplificadas com os pares usados em <i>Plebeia</i> (Francisco <i>et al.</i> , 2001). Cf – comprimento do fragmento; Ta – temperatura de hibridação dos <i>primers</i> testada.	158

ABREVIATURAS DOS GENES MITOCONDRIAIS

- **12S**: Subunidade ribossômica menor;
- **16S**: Subunidade ribossômica maior;
- **6**: ATP F₀ sintase subunidade 6;
- **8**: ATP F₀ sintase subunidade 8;
- **COI**: subunidade I do complexo citocromo oxidase c;
- **COII**: subunidade II do complexo citocromo oxidase c;
- **COIII**: subunidade III do complexo citocromo oxidase c;
- **CytB**: citocromo B;
- **ND 1**: subunidade 1 do complexo da NADH desidrogenase;
- **ND 2**: subunidade 2 do complexo da NADH desidrogenase;
- **ND 3**: subunidade 3 do complexo da NADH desidrogenase;
- **ND 4**: subunidade 4 do complexo da NADH desidrogenase;
- **ND 5**: subunidade 5 do complexo da NADH desidrogenase;
- **ND 6**: subunidade 6 do complexo da NADH desidrogenase;
- **A**: RNA transportador de alanina;
- **C**: RNA transportador de cisteína;
- **D**: RNA transportador de ácido aspártico;
- **E**: RNA transportador de ácido glutâmico;
- **F**: RNA transportador de fenilalanina;
- **G**: RNA transportador de glicina;
- **H**: RNA transportador de histidina;
- **I**: RNA transportador de isoleucina;
- **K**: RNA transportador de lisina;
- **L**: RNA transportador de leucina;
- **M**: RNA transportador de metionina;
- **N**: RNA transportador de asparagina;
- **P**: RNA transportador de prolina;
- **Q**: RNA transportador de glutamina;
- **R**: RNA transportador de arginina;
- **S**: RNA transportador de serina;
- **T**: RNA transportador de treonina;
- **V**: RNA transportador de valina;
- **W**: RNA transportador de triptofano;
- **Y**: RNA transportador de tirosina.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Abelhas da tribo Meliponini: aspectos gerais.

As abelhas da tribo Meliponini pertencem à família Apidae, subfamília Apinae (Michener, 2000). É um grupo bastante antigo, havendo fósseis datados do período cretáceo (135 a 65 milhões de anos atrás). Acredita-se que o grupo possa ser ainda mais antigo devido à sua distribuição geográfica. Segundo Silveira *et al.* (2002), estas abelhas estão presentes em todas regiões tropicais do mundo, bem como nas regiões subtropicais do hemisfério sul. Portanto, a origem dessas abelhas seria anterior à separação dos continentes, quando estariam distribuídas por toda Gondwana (Roubik, 1989; Camargo e Pedro, 1992; Velthuis, 1997).

Não há um consenso na literatura a respeito do número de espécies que constitui essa tribo visto que novas descrições são publicadas frequentemente. Sabe-se que há mais de 300 espécies distribuídas na região neotropical (Velthuis, 1997). Estas abelhas são conhecidas como “abelhas sem ferrão” devido ao fato das fêmeas apresentarem o ferrão e estruturas associadas extremamente reduzidos (Michener, 2000). As espécies variam muito de tamanho e todas apresentam comportamento eussocial, embora algumas espécies como as do gênero *Lestrimelitta* sejam cleptobióticas (Silveira *et al.*, 2002).

Diversos substratos são usados para nidificação. A grande maioria das espécies utiliza cavidades pré-existentes como ocos de árvores, tocas vazias, ninhos de pássaros, termiteiros abandonados ou ativos. Há ainda espécies que constroem ninhos expostos apoiados em galhos de árvores e em frestas de rochas (Kerr *et al.*, 1996; Velthuis, 1997; Michener, 2000). A estreita relação de tais abelhas com seu meio é perturbada em razão

da degradação do ambiente pelo desmatamento, uso indiscriminado de defensivos agrícolas e queimadas.

Do ponto de vista econômico, os meliponínios podem ser manejados para fins de produção de mel e subprodutos. O valor comercial do mel de *Tetragonisca angustula* (jataí) chega a ser de oito a dez vezes maior que o de *Apis mellifera* (Nogueira-Neto, 1997). A meliponicultura é uma prática comum no Brasil. Pesquisadores vêm incentivando o manejo de espécies regionais como forma de conservação das espécies nativas bem como fonte alternativa de renda para famílias carentes da zona rural (Kerr, 1996; Kerr *et al.*, 1996; Nogueira-Neto, 1997). Aidar (1996) defende que a meliponicultura deva ser usada para promover a polinização de plantas cultivadas como no caso do morango (*Fragaria vesca* L.), que pode ter sua produção melhorada com auxílio de abelhas da espécie *Nannotrigona testaceicornis* (iraí) em casas de vegetação (Bego *et al.*, 1989).

As abelhas têm fundamental papel ecológico, pois atuam na polinização cruzada de espécies vegetais nativas, promovendo a produção de sementes. De acordo com Kerr *et al.* (1996) os meliponínios seriam responsáveis pela polinização de 40 a 90% das árvores nativas, dependendo do ecossistema. Há dados de que no cerrado, 60 a 75% das espécies vegetais sejam polinizadas por abelhas sem ferrão (Silberbauer-Gottsberger e Gottsberger, 1988). Segundo Michener (2000) a conservação de muitos habitats depende, sobretudo, da conservação das populações de abelhas, pois caso contrário, a reprodução de grande parte dos elementos da flora pode ficar severamente limitada. Devido à grande importância ecológica e econômica das abelhas sem ferrão, estas têm sido objeto de estudo em vários níveis biológicos como Taxonomia, Etologia, Morfologia e Genética.

1.2. O gênero *Partamona* Schwarz (1939)

O gênero *Partamona* compreende 33 espécies e apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrado do sul do México até o sul do Brasil (Pedro e Camargo, 2003).

Estas abelhas ocorrem em florestas, cerrados, caatinga, regiões montanhosas, cordilheiras andinas e centro-americanas, chegando a até mais de 2.000 m de altitude. Segundo Pedro e Camargo (2003), os hábitos de nidificação são diversificados havendo espécies adaptadas ao ambiente antrópico, observadas freqüentemente em vasos de plantas e frestas de paredes, enquanto outras são termitófilas obrigatórias. A população nos ninhos de *Partamona* varia entre 1.000 e 3.000 indivíduos adultos (Michener, 1946 *apud* Camargo e Pedro, 2003). Essas abelhas apresentam comportamento agressivo atacando massivamente o invasor com mordidas, enroscando nos cabelos e entrando nos ouvidos de quem chega perto da entrada do ninho.

O gênero *Partamona* vem sendo amplamente estudado em nível morfológico, tendo sua taxonomia sido revisada por Pedro e Camargo (2003). Em nível etológico, estudos de atividade de vôo foram realizados por Azevedo (1997) em *P. helleri*; também foram observados os padrões de comportamento de postura, oviposição e aprovisionamento (POP) para *P. helleri*, *P. aff. nigrior*, *P. mulata*, *P. aiylae*, *P. sp.1*, *P. sp.2* e *P. vicina* (Azevedo e Zucchi, 2000). Em nível citogenético foram estudadas oito espécies, todas apresentando $2n=34$ cromossomos: *P. pearsoni*, (Tarelho, 1973), *P. seridoensis* (mencionada como *aff. nigrior*) (Brito, 1998) *P. mulata*, *P. aiylae*, *P. vicina* e *P. nhambiquara* (mencionada como *Partamona* sp.) (Brito-Ribon *et al.*, 1999) e *P. peckolti* (Brito *et al.*, 2003). Para *P. helleri*, foi observado um sistema de cromossomos

supranumerários, além dos 34 do complemento normal, variando de 0 a 4 tanto inter-colônia quanto intra-colônia (Costa *et al.*, 1992; Brito *et al.*, 1997; Brito, 1998; Tosta *et al.*, 1998).

Análises filogenéticas e biogeográficas foram realizadas por Pedro e Camargo (2003). Os autores apontaram, no entanto, uma grande dificuldade em se propor uma hipótese filogenética consistente devido à escassez de caracteres morfológicos, passíveis de codificação e polarização. Em um outro trabalho, Camargo e Pedro (2003) ressaltam que as espécies de *Partamona* são muito semelhantes quanto à morfologia e padrão de cores das abelhas adultas, tendo sido importante a inclusão de dados de hábitos de nidificação e atributos da estrutura da entrada dos ninhos para o reconhecimento das espécies. Apesar dessa homogeneidade entre as espécies de *Partamona*, Pedro e Camargo (2003) associaram eventos de disjunções e quebras geográficas à origem dos grandes grupos filogenéticos do gênero: *bilineata/epiphytophyla*, *musarum*, *testacea*, *nigrior* e *cupira*. Tais eventos e quebras foram sugeridos inicialmente por Camargo (1996), a partir da revisão de dados dos traçados biogeográficos de *Aparatrigona* e *Paratrigona* (Camargo, 1996) e *Geotrigona* (Camargo e Moure, 1996), como um possível modelo que explicaria a diversidade atual de Meliponini na região neotropical. Seriam estes:

1 - Um primeiro grande evento de vicariância teria dividido a região que vai do sul do México ao sul da América do Sul em duas grandes áreas faunísticas: NW (noroeste da América do Sul, América Central e sul do México) e SE (Sudeste da América do Sul).

2 - Outros dois eventos de vicariância ainda teriam ocorrido na região NW dividindo-a em três regiões, noroeste na Amazônia (NAm), oeste da Amazônia

(SWAm) e pacífico (Chocó-CA) compreendendo o sul do México ao sudoeste do Equador;

3 - No traçado SE, um evento de vicariância posterior teria isolado a porção abaixo dos rios Madeira e Amazonas (SEAm) da porção Atlântica (Atl.).

Azevedo (2001) também realizou análises filogenéticas para o gênero *Partamona*, usando caracteres comportamentais. Nesse estudo foram analisadas as seqüências de eventos do POP de nove espécies de *Partamona*. No entanto, os dados também se mostraram homogêneos e conseqüentemente, não informativos para um maior detalhamento das relações filogenéticas entre as espécies, tendo sido possível, entretanto, confirmar a monofilia do grupo.

1.2.1. *Partamona mulata* (Moure in Camargo, 1980) E *P. helleri* (Friese, 1900)

As espécies estudadas no presente trabalho apresentam diferentes distribuições geográficas, não havendo sobreposição entre estas.

P. mulata (Figura 1, A e B) era descrita inicialmente como endêmica da região de Cuiabá no estado de Mato Grosso (Camargo, 1980), porém, os esforços de captura das duas últimas décadas mostraram que sua distribuição geográfica é bem mais ampla, podendo ser encontrada no Cerrado do sudoeste brasileiro (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Pantanal Mato-grossense e nas savanas da Bolívia (Pedro e Camargo, 2003). Esta é uma espécie termitófila obrigatória, ocupando termiteiros epígeos do tipo “murundu” ou associados a árvores (Camargo e Pedro, 2003).

P. helleri (Figura 1, C e D) é uma espécie amplamente distribuída, ocorrendo ao longo de toda Mata Atlântica. Segundo Pedro e Camargo (2003), pode ser encontrada

desde o nordeste de Santa Catarina até a região de Salvador na Bahia. A oeste, chega até o vale do São Francisco em Minas Gerais, na região dos cerrados. Os hábitos de nidificação de *P. helleri* são bastante diversificados. Em áreas livres de influência antrópica, são encontrados ninhos em ocós de árvores, associados a raízes de epífitas, ocupando ninhos abandonados de pássaro graveteiro (*Phacellodomus* sp.), e até ninhos totalmente livres, apenas apoiados sobre galhos de árvores. Em áreas urbanas, encontramos essas abelhas sob beirais e cumeeiras de casas, em máquinas abandonadas, em vasos de plantas e em frestas de paredes (Camargo e Pedro, 2003). Segundo Camargo e Pedro (2003), esta é a única espécie do sudeste brasileiro que não nidifica em associação com formigas.

Apesar de o gênero *Partamona* ter sido dividido morfológicamente em cinco clados, *bilineata/epiphytophyla*, *musarum*, *testacea*, *nigrior* e *cupira*, a distribuição de algumas espécies destes grupos não corresponde ao cinco traçados biogeográficos propostos por Camargo (1996). Um exemplo é o caso de *P. mulata* e *P. helleri*, ambas reunidas no grupo *cupira* e distribuídas em traçados biogeográficos diferentes, **CSE** e **Atl**, respectivamente.

Atualmente, vários autores têm proposto hipóteses para a ocupação das áreas de distribuição das espécies com base em genealogia de genes do DNA mitocondrial (DNAm), relacionando-as com eventos paleoclimáticos e paleogeográficos (Lunt *et al.*, 1998; Lenk *et al.*, 1999; Ress *et al.*, 2001; de Brito *et al.*, 2002; Goropashnaya *et al.*, 2004; entre outros).

Escolhemos estudar *P. mulata* e *P. helleri* pela diferença na distribuição geográfica das mesmas; a primeira de distribuição restrita ao sul de Mato Grosso e norte do Mato Grosso do Sul, e a segunda com distribuição ampla, ao longo da Mata Atlântica, do sul

da Bahia até o norte de Santa Catarina. A análise populacional de ambas espécies, com base em marcadores moleculares, nos permitirá comparar a diversidade genética das espécies e verificar a possível relação da variação encontrada com suas distribuições geográficas.

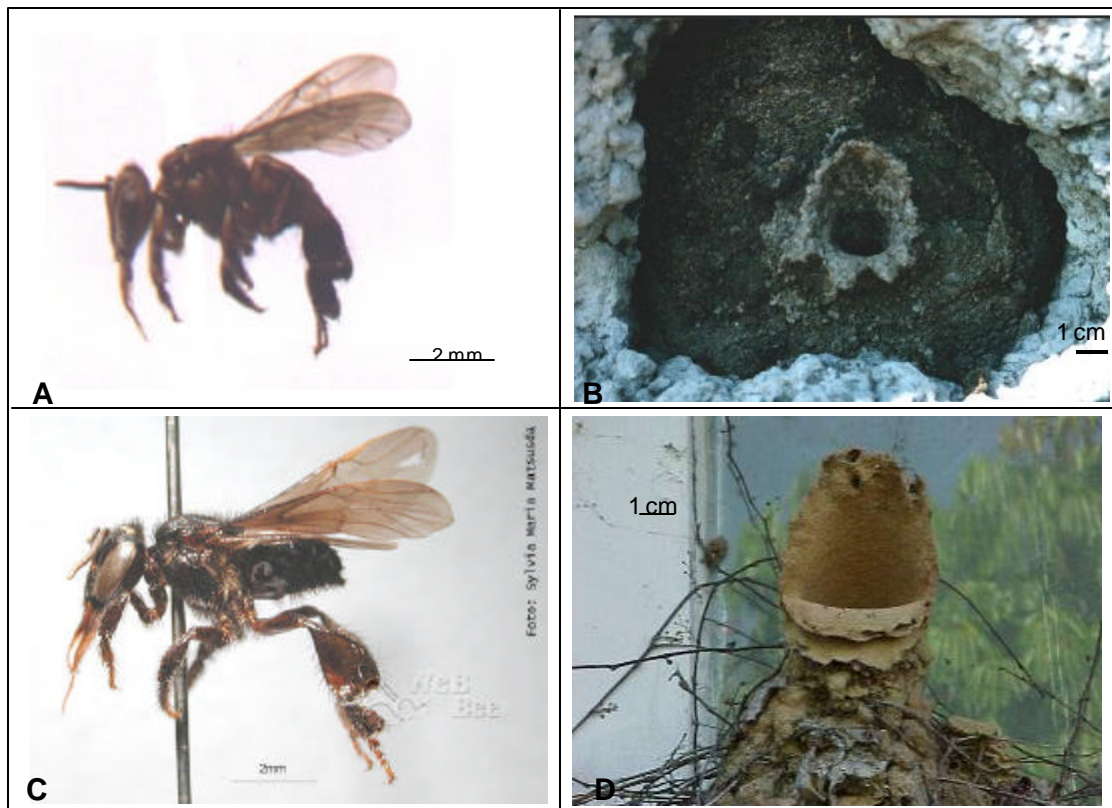


Figura 1. Operárias e entradas de ninhos de: *Partamona mulata* (A e B); *Partamona helleri* (C e D).

1.3. Marcadores moleculares em estudos populacionais

Os primeiros trabalhos realizados sobre genética de populações eram baseados em polimorfismos de caracteres morfológicos, com observação da segregação de fenótipos. Em vista disso, poucos organismos podiam ser estudados como: humanos, *Drosophila* e milho. Tais caracteres apresentam baixo polimorfismo e diferentes tipos de herança mendeliana, quantitativa, interações gênicas, e por isso, foram substituídos por uma classe de marcadores desenvolvida na década de 1960, as isoenzimas.

Posteriormente, marcadores moleculares de DNA foram tomando espaço nas publicações sobre genética populacional. Isto porque o DNA pode ser extraído de qualquer organismo, mesmo preservado em condições precárias (Dowling *et al.*, 1996; Parker *et al.*, 1998). Como se analisa o genótipo (DNA) e não o fenótipo (proteína), o polimorfismo detectado é maior.

Várias são as abordagens para acessar a variação do DNA. A comparação entre seqüências de DNA oferece alta resolução e fornece dados que podem ser convertidos em estimativas de divergência de seqüência. Esta variação pode ser também estimada indiretamente pela comparação de fragmentos de DNA separados por eletroforese, verificando-se o polimorfismo de tamanho e número destes, técnica esta chamada de RFLP (polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição).

A origem do DNA a ser analisado por RFLP pode ser nuclear ou de genomas citoplasmáticos como o DNA mitocondrial (DNAm_t). Este genoma apresenta alta taxa de mutação em relação ao DNA nuclear (Brown *et al.*, 1979), o que implica em alto nível de polimorfismo intra-específico. O RFLP do DNAm_t vem sendo amplamente utilizado em estudos populacionais e tem fornecido informações acerca de biogeografia,

dispersão, fluxo gênico, colonização e estruturação de populações (Arias e Infante-Malachias, 2001).

A descrição de marcadores moleculares baseados na PCR (*reação em cadeia da polimerase*) tais como RADP, PCR+RFLP, microssatélites, entre outros, aumentou a eficiência de detecção de polimorfismos no nível do DNA, traduzida em redução do tempo de execução dos experimentos, do seu custo e da sua complexidade (Matioli e Passos-Bueno, 2001). Tais marcadores têm se mostrado efetivos na amostragem de numerosos locos polimórficos a partir de pequenas quantidades de DNA (Dowling *et al.*, 1996).

Em vista de características mencionadas como: fácil extração a partir de tecidos preservados e alto polimorfismo, utilizamos marcadores de DNA na investigação das estruturas populacionais de *Partamona helleri* e *P. mulata*. Escolhemos analisar o polimorfismo de marcadores do tipo RFLP do DNAm_t e microssatélites pelo fato de que o primeiro permite inferências históricas acerca da colonização das áreas geográficas onde as espécies ocorrem, e o segundo, a análise da dinâmica populacional nos tempo atuais. As características de ambos marcadores são detalhadas a seguir.

1.3.1. DNA mitocondrial Animal

O DNA mitocondrial animal é geralmente uma molécula circular, de tamanho variável entre organismos (14 a 42 kb em animais). Bastante econômico, pois não apresenta espaçadores entre genes, introns ou regiões repetitivas, com raras exceções (Wolstenholme, 1992).

Na grande maioria dos genomas mitocondriais estudados, o conteúdo gênico consiste em dois genes para as subunidades ribossômicas (12S e 16S), 22 para RNAs

transportadores (tRNA) e 13 genes para enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa: as subunidades da citocromo oxidase (I, II, III), citocromo b, as subunidades 6 e 8 da ATPase e as sete subunidades da NADH desidrogenase. Possui ainda uma região conhecida como *D-loop* (em vertebrados e equinodermas) ou região rica em A+T (em invertebrados), que exibe grande variação de tamanho entre os organismos, a qual contém regiões putativas de controle da replicação e transcrição do DNAm (Wolstenholme, 1992).

A herança do DNAm é materna, embora alguns poucos casos de herança biparental tenham sido observados em moluscos (Wolstenholme, 1992). Desta forma, mutações acumuladas não são dispersas por meio de recombinação (Awise *et al.*, 1987). Tal característica permite que diferenças acumuladas entre matrilineas sejam usadas para inferências de genealogias de genes.

Outra característica importante do DNAm é a sua alta taxa de evolução. Há autores que relatam que a taxa de evolução de alguns genes mitocondriais é cerca de 10 vezes maior do que a observada em determinados genes nucleares de cópia única (Brown *et al.*, 1979; Vawter e Brown, 1986). Esta alta taxa de mutação deve-se ao fato da molécula de DNAm estar exposta aos metabólitos resultantes dos processos que ocorrem dentro da organela, como a fosforilação oxidativa, e ausência de sistema de reparo eficiente (Wilson *et al.*, 1985).

O polimorfismo mencionado não se resume a substituições ou *indels* de bases nitrogenadas, mas também compreende as translocações de genes, mais comuns entre os tRNAs (Wolstenholme, 1992; Dowling *et al.*, 1996; Silvestre *et al.*, 2002). Segundo Boore *et al.* (1995), mudanças na ordem gênica do DNAm são filogeneticamente informativas e têm sido usadas em estudos de sistemática molecular de invertebrados.

A combinação das características mencionadas, herança materna, elevada taxa de mutação e relativa facilidade com que o DNAMt pode ser isolado e analisado tornou a análise deste genoma uma ferramenta importante para estudos acerca da dinâmica populacional, filogenia e relações genética e biogeográficas entre espécies (Avice *et al.*, 1987).

O estudo do DNAMt permite abordagens que podem ser assim exemplificadas: análises populacionais e filogenéticas, por meio de mapeamento de restrição ou seqüenciamento, como realizado para o díptero *Ceratitis capitata* (McPheron *et al.*, 1994); análise de introgressão de haplótipos mitocondriais em zonas de contato entre espécies, como observado em coiotes em relação ao lobo cinza na América do Norte (Lehman *et al.*, 1991); verificação de introduções e reintroduções de espécies de importância econômica, como moscas da família Tephritidae nos Estados Unidos, inseto praga que utiliza polpa de frutas para oviposição e desenvolvimento de larvas (Meixner *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2003); conhecimento das estruturas genéticas das populações para formulação de estratégias de conservação de espécies ameaçadas de extinção, como realizado para a gazela, na Arábia Saudita (*Gazella saudiya*) (Hammond *et al.*, 2001); conhecimento das estruturas populacionais e proposição de eventos históricos, como as glaciações do Pleistoceno, para compreensão da distribuição da variabilidade atual. Este último tipo de abordagem é o mais freqüente na literatura, e vem sendo realizado para várias espécies como o gafanhoto *Chortippuus parallelus* na Europa (Lunt *et al.*, 1998); peixes da espécie *Coregonus* sp. na Dinamarca (Hansen *et al.*, 1999); em tartarugas *Emys orbicularis* na Europa (Lenk *et al.*, 1999); em besouros do gênero *Nesotes* nas Ilhas Canárias (Ress *et al.*, 2001); em *Drosophila buzzatti* no Brasil (de Brito *et al.*, 2002); em espécies de formiga (*Formica pratensis* e *F. lugubris*) na

“Eurásia” (Goropashnaya *et al.*, 2004); em populações de borboletas da espécie *Polyommatus bellargus* no Reino Unido (Harper *et al.*, 2004); entre vários outros.

Muitos trabalhos também abordam as relações filogenéticas com base na variação do DNAm, tanto em nível intra quanto inter-populacional, correlacionando-as com as distribuições geográficas dos clados. Juntos estes elementos constituem a filogeografia (Avise *et al.*, 1987; Avise, 2000). Segundo Avise (2000), as populações naturais podem ser classificadas em diferentes categorias filogeográficas, facilitando a compreensão acerca da dinâmica populacional e dos padrões de dispersão e colonização nas áreas de distribuição das espécies. São cinco categorias:

- Categoria I: Haplótipos mitocondriais distintos ocupando regiões geográficas separadas (alopatria) dentro da distribuição geográfica da espécie. A principal explicação para este padrão envolve a existência de barreiras ao fluxo gênico, extrínsecas e duradouras. Outra possibilidade seria extinção de haplótipos intermediários em espécies amplamente distribuídas, com capacidade de dispersão (e fluxo gênico) limitada. Por exemplo, na borboleta tropical *Heliconius erato*, uma separação basal na árvore de genes de DNAm (datada de cerca de 1,5 a 2 milhões de anos) distingue populações distribuídas à leste e à oeste da cadeia montanhosa dos Andes (Brower, 1994).
- Categoria II: Pronunciadas discontinuidades filogenéticas entre os haplótipos, com as principais linhagens co-distribuídas em uma grande área. Neste caso, podem ter ocorrido zonas secundárias de contato ou, barreiras intrínsecas (como isolamento reprodutivo) entre espécies simpátricas relacionadas. Em moluscos das espécies *Cepa nemoralis* e *Helix aspersa*

(Thomaz *et al.*, 1996), populações locais co-específicas frequentemente apresentam haplótipos mitocondriais com divergência de sequência excedendo a 10% (comparável a distâncias obtidas para táxons distintos como gêneros ou famílias).

- Categoria III: Maioria dos haplótipos estreitamente relacionados, ainda que isolados geograficamente. A explicação mais provável para tal padrão envolve fluxo gênico historicamente limitado entre populações em espécies não subdivididas por barreiras duradouras à dispersão. Portanto, mutações recentes estariam confinadas a subgrupos na distribuição da espécie. Na formiga *Solenopsis invicta*, a limitada movimentação das rainhas, ao invés de uma barreira ambiental duradoura ao fluxo gênico, pode contribuir com a diferenciação regional, observada nas frequências dos haplótipos de DNAm (e também de alozimas e marcadores microssatélites) em populações sul-americanas (Ross *et al.*, 1997).
- Categoria IV: Populações com haplótipos estreitamente relacionados sem nenhum isolamento geográfico. Tal como na categoria III, a ausência de barreiras à dispersão seria a principal explicação para este padrão, porém neste caso o fluxo gênico entre populações teria sido intenso. Um exemplo interessante é o dos gafanhotos migratórios *Melanoplus sanguinipes*. Conhecidos por sua grande mobilidade ao longo da distribuição geográfica, apresentaram pouca ou nenhuma diferenciação entre haplótipos de DNAm entre populações distribuídas no Canadá e nos Estados Unidos (Chapco *et al.*, 1992).

- Categoria V: Esta categoria é intermediária entre as III e IV. Envolve linhagens frequentes amplamente distribuídas juntamente com haplótipos exclusivos, localmente distribuídos. Níveis intermediários de fluxo gênico entre populações geográficas seriam a melhor explicação para este padrão. Tal como na categoria III, possíveis genótipos ancestrais ocorreriam em uma ampla área, enquanto que tal como na categoria IV, novas mutações não teriam ainda se disseminado ao longo da distribuição geográfica da espécie. Segundo *Avise et al.* (1987) os seres humanos podem ser incluídos na categoria V.

De acordo com *Avise et al.* (1987), fatores históricos biogeográficos, ecologias contemporâneas e comportamento de organismos têm desempenhado importantes papéis na compreensão das estruturas genéticas das espécies e levaram à proposição de hipóteses filogeográficas. Hipóteses importantes para avaliação das populações têm sido propostas à medida que novas metodologias moleculares têm se tornado disponíveis. Hipóteses como:

- a) A maioria das espécies é composta de populações cujos membros ocupam diferentes ramos de uma árvore filogenética intra-específica;
- b) Espécies com limitada estrutura populacional filogeográfica têm histórias de vida que levam à dispersão e ocupação de áreas livres de barreiras ao fluxo gênico;
- c) Grupos monofiléticos distinguidos por grandes intervalos filogenéticos normalmente surgem de barreiras ao fluxo gênico, extrínsecas e duradouras.

Essa hipótese tem corolários importantes que também servem como predições para futuros testes:

1. À medida que o tempo de isolamento aumenta, o grau de concordância filogeográfica entre diferentes genealogias de genes também aumenta;
2. As localizações geográficas de *gaps* filogeográficos são concordantes entre espécies;
3. Intervalos filogenéticos entre espécies são geograficamente concordantes, com fronteiras entre províncias zoogeográficas tradicionalmente conhecidas.

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

1.3.2. microssatélites

Os microssatélites são marcadores moleculares neutros, constituídos de pequenas seqüências de 1 a 6 pares de bases repetidas *in tandem*, os quais têm sido descritos em todos os organismos até hoje analisados (Hancock, 1999).

De acordo com Goldstein e Schlötterer (1999), os microssatélites podem ser classificados como: 1 – **perfeito** se a seqüência de bases é repetida sem interrupções

(CACACACACA); 2 – **imperfeito** se uma ou mais repetições apresentam uma base que não se encaixa na estrutura repetitiva (CACATCACACA); 3 – **interrompido** se há inserção de um pequeno número de bases que não se encaixam na estrutura repetitiva (CACACATTACATTCA); 4 – **composto** quando dois ou mais microsatélites estão justapostos (CACACACAGTGTGT).

Os diferentes alelos são caracterizados pelo comprimento exato em pares de bases de um fragmento obtido por meio de PCR, usando para isso *primers* que flanqueiam a região das repetições *in tandem*. A obtenção de *primers* para amplificação de microsatélites constitui-se no maior desafio para a utilização deste marcador molecular (Queller *et al.*, 1993; Matioli e Passos-Bueno, 2001; Zane *et al.*, 2002). Para o desenvolvimento de *primers* homoespecíficos, há a necessidade de se construir uma biblioteca genômica da espécie e realizar a varredura dos clones com sondas complementares às repetições. Por exemplo, Jones *et al.* (2003), realizaram a varredura de 336 clones e obtiveram após vários passos de refinamento da procura, apenas 13 pares de *primers* para locos microsatélites de uma espécie de lagosta (*Homarus americanus*).

Entretanto, a utilização de *primers* desenvolvidos para outra espécie, de preferência mais próxima taxonomicamente possível daquela de interesse, pode ser uma estratégia para iniciar um estudo antes de se investir na construção de *primers* específicos (Queller *et al.*, 1993; Parker *et al.*, 1998). Porém, deve-se saber que a utilização de *primers* heteroespecíficos pode incorrer no aparecimento de alelos nulos, pois qualquer mutação que ocorra na seqüência de DNA complementar aos *primers* pode inibir ou impedir completamente a ligação destes, resultando tanto em redução como em perda completa do produto de PCR (Callen *et al.*, 1993).

Em populações naturais, o polimorfismo de locos microssatélites é consequência de novas mutações, deriva genética e de seleção em regiões cromossômicas ligadas (Schlötterer e Wiehe, 1999). Dois modelos são descritos para explicar o modo de mutação nos microssatélites: 1 – “crossing-over” desigual por erro no emparelhamento dos cromossomos homólogos na prófase I da meiose, o que incorreria em alteração no número original de repetições nas cromátides envolvidas com a troca (Smith, 1976); 2 – “escorregão” da DNA polimerase durante a replicação do DNA, que acarretaria a diminuição ou o aumento de repetições.

Devido à alta variabilidade, os microssatélites constituem-se em marcadores nucleares confiáveis para testes de identidade, mapeamento gênico e *linkage* (revisado por Estoup *et al.*, 1993). Ainda, por ser um marcador codominante, este é uma ferramenta útil para estudos populacionais, principalmente em espécies que tenham, por exemplo, baixa variabilidade em estudos com alozimas (Estoup *et al.*, 1995).

Análises populacionais vêm sendo amplamente realizadas por meio da análise de polimorfismo de microssatélites em todos os grupos de animais. Exemplos podem ser citados como: diferenciação de populações de besouros *Pogonus chalceus*, em que os autores compararam dados de alozimas com microssatélites e verificaram, com ambos marcadores, grande isolamento das populações Atlânticas em relação às populações do Mediterrâneo (Dhuyvetter *et al.*, 2004); em populações de peixes da espécie *Salvelinus alpinus*, a qual era considerada geneticamente depauperada em estudos populacionais anteriores, foi observada alta variabilidade genética (até 49 alelos em um loco) e estruturação em lagos da região dos Alpes, na Europa (Brunner *et al.*, 1998); em um trabalho realizado com o anfíbio *Litoria aurea*, na Austrália, Burns *et al.* (2004) encontraram alta diversidade genética e estruturação entre as populações dessa espécie

de rã, e sugeriram a preservação de áreas contínuas de habitats para a conservação da espécie; em aves foi observado isolamento da população espanhola da espécie *Ficedula hypoleuca*, em relação às populações da República Tcheca e Noruega, causada provavelmente pela presença dos Alpes, que consistiria em barreira ao fluxo gênico (Haavie *et al.*, 2000); em mamíferos podemos citar um estudo realizado com baleias corcundas em que populações da região do Alasca e da Califórnia mostraram-se diferenciadas mas com certo nível de fluxo gênico via machos (Baker *et al.*, 1998).

Atualmente, várias publicações têm ressaltado a possibilidade de interpretações errôneas de dados populacionais em vista de não haver um modelo consolidado para evolução dos microssatélites (Baloux e Lugon-Moulin, 2002; Estoup *et al.*, 2002). Há uma classe de modelos (“modelo de duas fases”; “*stepwise mutation model*” (SMM); “*generalized mutation model*” (GSM); “*K-allele model*” (KAM)) que prediz que alelos microssatélites podem mutar em direção a estados alélicos já presentes na população e, portanto, podem gerar homoplasias de tamanho (indivíduos que partilham alelos idênticos em estado, porém não por herança). Há um outro modelo, “modelo de alelos infinitos” (IAM), em que uma mutação envolve qualquer número de repetições *in tandem* e sempre resulta em estado alélico não encontrado previamente na população. A fim de contornar esse problema, Baloux e Lugon-Moulin (2002) propõem que diferentes métodos estatísticos de estimativa de diferenciação de populações, os quais assumem diferentes modelos de evolução, sejam usados para comparação crítica e interpretação cuidadosa dos resultados.

Os microssatélites também podem ser usados num outro tipo de abordagem: o estudo de parentesco e paternidade. Segundo Parker *et al.* (1998), os microssatélites apresentam vantagens sobre outras técnicas para estudos de parentesco entre indivíduos

de uma população por fornecerem informações sobre locos individuais o que permite cálculos de frequências alélicas e também, por exibirem altos níveis de diversidade gênica e conseqüentemente altos níveis de polimorfismo.

De acordo com Avise (1994), estudos de parentesco (a proporção de genes idênticos por herança) surgem em praticamente todas discussões sobre espécies sociais, em que morfologias e comportamentos peculiares poderiam ter evoluído sob influência de seleção de parentes (*kin selection*) ou *inclusive fitness* (valor adaptativo de um indivíduo que envolve a média de sucesso reprodutivo próprio e de seus parentes). No caso de estudo de parentesco, para que dois indivíduos retirados ao acaso de uma colônia sejam irmãos completos estes devem: 1 - exibir no máximo três alelos por loco no caso de espécies haplo-diplóides como os Hymenoptera; 2 - exibir alelos em frequências consistentes com a transmissão vinda somente de dois parentais; 3 - partilhar algum alelo que foi observado no estudo da população; 4 - exibir com frequência excesso de indivíduos heterozigotos com relação às frequências alélicas esperadas na coorte; 5 - exibir valores de parentesco genotípico próximo a 0,5 (0,75 no caso dos Hymenoptera); 6 - alta variância em frequências alélicas entre coortes; 7 - grandes diferenças nas frequências genotípicas entre coortes (Avise, 1994).

Este tipo de investigação tem sido freqüente na literatura, como por exemplo, o estudo da estrutura genética de populações e de parentesco em colônias de cupins no Japão (Vargo *et al.*, 2003), que mostrou que a fundação de ninhos aconteceu provavelmente por acasalamento de fundadores alados aparentados.

1.4. DNA mitocondrial e microssatélites em estudos com abelhas

Entre os Apidae, os estudos envolvendo a análise do DNAMt são recentes. Estes se restringem quase na totalidade às abelhas do gênero *Apis* sendo *A. mellifera* a única espécie cujo genoma mitocondrial já foi totalmente sequenciado (Crozier e Crozier, 1993). Os polimorfismos detectados no DNAMt deste gênero se mostraram excelentes marcas para caracterização genética de: populações (Sheppard *et al.*, 1991; Estoup *et al.*, 1995; Sihanuntavong *et al.*, 1999; Franck *et al.*, 2000; De La Rúa *et al.*, 2001); subespécies (Arias *et al.*, 1990; Garnery *et al.*, 1992; Arias e Sheppard, 1996; Sheppard *et al.*, 1996 e 1997; Meixner *et al.*, 2000) e espécies (Garnery *et al.*, 1991 e Arias *et al.*, 1996). Estudos filogenéticos com base no DNAMt (Arias e Sheppard, 1996; Garnery *et al.*, 1992) têm confirmado os ramos evidenciados por meio da morfometria (Ruttner *et al.*, 1978): A subespécies africanas; M subespécies do norte da Europa e norte da África; C subespécies encontradas no leste da Europa e norte do Mediterrâneo; e O subespécies que ocorrem no Oriente Médio.

Em Meliponini, análises de DNAMt vêm sendo ampliadas pela publicação de caracterizações deste genoma em diferentes espécies como realizado por Silvestre (2002), em que foram sequenciados 14.442 dos 18.500 pb do genoma mitocondrial de *Melipona bicolor*. Foram analisados: a ordem gênica, características dos produtos gênicos, estruturas secundárias dos tRNAs e viés para bases adenina e timina. Esses dados introduziram um novo modelo para comparação entre as abelhas sem ferrão, pois estudos anteriores sempre usavam o DNAMt de *Apis* como base. Além da caracterização deste genoma, Silvestre (2002) desenhou 44 *primers* que facilitaram a amplificação do DNAMt de meliponínios. Caracterizações por meio de RFLP também vêm sendo realizadas e mapas de restrição já foram descritos para cinco espécies de

Plebeia (*P. droryana*, *P. emerina*, *P. remota*, *P. saiqui* e *Plebeia* sp.) (Francisco *et al.*, 2001) e seis espécies de *Melipona* (*M. bicolor*, *M. compressipes*, *M. melanoventer*, *M. quadrifasciata*, *M. rufiventris*, *M. subnitida*) (Weinlich *et al.*, 2004). Esses mapas têm sido usados em abordagens filogenéticas, como realizado por Arias *et al.* (2003) incluindo a espécie *Schwarziana quadripunctata*. Esses dados também podem ser úteis em abordagens populacionais como realizado com *Plebeia remota* (Francisco, 2002) e *M. q. quadrifasciata* e *M. q. anthidiodes* (Moretto e Arias, comunicação pessoal). Tais resultados têm permitido a verificação de variabilidade genética em todos os níveis, intergenérica, inter e intra-específica (Silvestre *et al.*, 1999; Francisco *et al.*, 2001; Francisco, 2002 e Weinlich *et al.*, 2004).

Para a espécie *P. remota*, em especial, Francisco (2002) verificou isolamento entre quatro populações estudadas, com raro compartilhamento de haplótipos. Ainda, foi observada grande distância genética entre três populações em relação a uma outra população proveniente de Prudentópolis (PR), o que pode ser interpretado como um indício de que esteja ocorrendo processo de especiação nessas abelhas.

Análises de locos microssatélites também têm sido realizadas em abelhas para o entendimento das relações de parentesco e estruturas populacionais. Estes estudos se tornaram possíveis a partir da descrição de *primers* flanqueadores de regiões microssatélite para *Apis mellifera* e *Bombus terrestris* (Estoup *et al.*, 1993), *Melipona bicolor* (Peters *et al.*, 1998) e *Scaptotrigna postica* (Paxton *et al.*, 1999a).

Populações de *Apis mellifera* foram estudadas por Franck *et al.* (1998, 2000 e 2001), e linhagens evolutivas já descritas com base na morfologia (Ruttner, 1998) e no DNAm (Arias e Sheppard, 1996) foram confirmadas.

Dados de *Bombus* foram obtidos por Widmer *et al.* (1998) que reconstruíram a história da colonização das ilhas Canárias e da Madeira por *B. terrestris*, com base em dados de microsatélites; para *B. pascuorum*, Widmer e Schmid-Hempel (1999), observaram isolamento parcial entre populações divididas pelos Alpes.

Em Meliponini, há apenas um estudo populacional baseado em marcadores microsatélites (Francisco, 2002). Nesse estudo, foram analisadas quatro populações de *Plebeia remota* provenientes de diferentes localizações geográficas: Paraná (Curitiba e Prudentópolis), São Paulo, e Santa Catarina. Foi observada estruturação entre as quatro populações, concordante com os dados para DNAm já mencionados. O autor também compara resultados de diferenciação genotípica analisando um ou cinco indivíduos por ninho para quatro amostras, duas de Cunha (SP) e duas de Prudentópolis (PR). Duas amostras, uma de cada estado, eram mantidas no meliponário do Laboratório de abelhas da USP em São Paulo, enquanto que as outras duas eram mantidas em seus estados de origem. Os resultados foram contrastantes, pois a análise com cinco indivíduos resultou em diferenciação genotípica entre as quatro amostras, e a análise com um indivíduo por ninho diferenciou apenas as colônias provenientes de locais distintos. Esses dados mostram que a inclusão de indivíduos altamente aparentados nas análises incorre em interpretações errôneas da estrutura genética das populações de abelhas.

O parentesco entre abelhas de uma mesma colônia tem se tornando um importante tema de estudo. Acredita-se que as diferenças observadas em comportamentos entre abelhas do gênero *Apis* e de meliponínios como oviposição por operárias e destruição de ovos postos por outras operárias, rituais de oviposição, tolerância a rainhas novas, escolha da rainha que deve abandonar o ninho (rainha mãe ou rainha virgem) e tolerância à progênie de machos, filhos de operárias, pelas irmãs, se

devam à diferença no número de acasalamentos da rainha, via seleção de parentesco (Peters *et al.*, 1999). Dados de contagem de espermatozoides em espermatecas de rainhas, bem como a observação de que rainhas apresentam o aparelho reprodutor masculino acoplado ao seu corpo após a copula, levou os pesquisadores a acreditarem que em Meliponini a rainha copule uma única vez durante sua vida (Kerr *et al.*, 1962; da Silva *et al.*, 1972). Dados obtidos por meio de análise de alozimas em *Plebeia droryana* reforçaram essa hipótese (Machado *et al.*, 1984).

Com objetivo de testar essa hipótese, Paxton *et al.* (1999b) estudaram as relações de parentesco em *Melipona beecheii* e *Scaptotrigona postica*. Os autores encontraram mais de três alelos de microssatélites nas amostras de abelhas coletadas de uma mesma colônia, o que os levou a afirmar que ambas espécies são fecundadas por mais de um macho. Genótipos discordantes com a hipótese de monoandria também foram encontrados em *Plebeia remota* (Francisco, 2002). No entanto, o autor acredita que isto se deva à presença de campeiras de outros ninhos ou substituição recente de rainha. Em contraste com os dados de Paxton *et al.* (1999b), Peters *et al.* (1999) obtiveram coeficientes de parentesco “*r*” entre 0,602 a 0,855 para treze espécies pertencentes a 10 gêneros distintos de Meliponini (inclusive *Melipona* e *Scaptotrigona*), os quais foram considerados altos e indicativos de que as operárias das colônias são irmãs completas, filhas de um mesmo casal.

O presente trabalho apresenta o emprego de análises moleculares do DNAm^t e de locos microssatélites em espécies do gênero *Partamona* com objetivo de proporcionar um melhor entendimento das relações genéticas entre populações naturais. O estudo da estruturação genética de *P. mulata* e *P. helleri* nos permitiu inferir sobre eventos históricos que teriam influenciado a filogeografia das populações, e sobre a

relação entre a degradação das áreas de ocorrência destas (Cerrado e Mata Atlântica, respectivamente) e o *status* genético de suas populações.

Para a realização desse trabalho populacional foi necessária inicialmente uma caracterização dos marcadores moleculares que seriam empregados. Sendo assim, os mapas de restrição parciais para o genoma mitocondrial de *P. mulata* e *P. helleri* foram obtidos e os alelos dos locos de microssatélites seqüenciados. A caracterização dos genomas mitocondriais das duas espécies resultou em uma publicação na revista *Apidologie* (Anexo 1) e os resultados, bem como a metodologia, das análises de seqüenciamento dos microssatélites estão descritas no anexo 2.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho apresenta o estudo populacional de duas espécies do gênero *Partamona*: *P. mulata* e *P. helleri*. O principal objetivo foi comparar as possíveis relações entre distribuição geográfica e variabilidade genética das espécies e, com base na frequência de haplótipos e alelos de microssatélites, inferir sobre a dinâmica populacional e biologia de cada espécie.

Para atingir tal objetivo, tínhamos especificamente as metas de:

1. Construir o mapa de restrição e localizar os genes principais do genoma mitocondrial das duas espécies (*P. helleri* e *P. mulata*);
2. Identificar os haplótipos mitocondriais existentes ao longo da distribuição geográfica de cada espécie e inferir as possíveis correlações (haplótipos *versus* biogeografia) com a colonização e dispersão de ambas;
3. Verificar as relações genéticas e filogenéticas entre os haplótipos mitocondriais encontrados;
4. Analisar regiões de DNA microssatélite em ambas espécies e respectivas populações e realizar as mesmas correlações acima referidas (item 2), agora utilizando um marcador de origem nuclear;
5. Verificar possível fluxo gênico entre populações;
6. Em havendo fluxo gênico, se este ocorre igualmente via fêmea e via macho;
7. Verificar quantos machos fecundam as rainhas de ambas espécies;
8. Finalmente, verificar a possível influência entre distribuição geográfica restrita (*P. mulata*) e ampla (*P. helleri*) na dinâmica populacional dessas duas espécies, com base nos marcadores moleculares determinados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Biológico

Foram coletados 50 indivíduos em média, de 58 colônias de *Partamona mulata* e de 47 de *Partamona helleri*, provenientes de várias localidades no Brasil (Tabela 1, Figuras 1 e 2). As colônias, provenientes de Viçosa e Porto Firme (MG), foram coletadas no Apiário da Universidade Federal de Viçosa, lá mantidas desde 1990. Em São Paulo, uma colônia mantida no meliponário do Laboratório de Abelhas da Universidade de São Paulo também foi amostrada. Todas as outras colônias de *P. helleri* e de *P. mulata* foram coletadas na natureza.

As abelhas coletadas em São Paulo foram mantidas a -80 °C até a extração de DNA. As abelhas coletadas nas outras localidades foram trazidas em nitrogênio líquido e depois armazenadas a -80 °C até o momento da extração de DNA.

Os espécimes foram identificados pela Dra. Silvia Regina de Menezes Pedro (FFCLRP/USP) e depositados na Coleção do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP.

A denominação das populações ao longo do texto será como se segue:

- ***P. mulata*:**
 - **Poc:** colônias provenientes de Poconé – MT;
 - **Cac:** colônias provenientes de Cáceres – MT;
 - **Cba:** colônias provenientes de Cuiabá – MT;
 - **Sal:** colônias provenientes de Santo Antônio do Leverger – MT;
 - **Cgd:** colônias provenientes de Campo Grande – MS.

- ***P. helleri*:**
 - **SC:** colônias provenientes de Blumenau e Luiz Alves – SC;
 - **SP:** colônias provenientes de São Paulo e Biritiba Mirim – SP;
 - **MG:** colônias provenientes de Viçosa, São Miguel do Anta e Porto Firme - MG;
 - **ES:** colônias provenientes de Colatina – ES;
 - **BA:** colônias provenientes de Ilhéus e Coaraci – BA.

Tabela 1. Locais de coleta, procedência e número de colônias amostradas de *P. mulata* e *P. helleri*.

Espécie	Local de Coleta	No. de ninhos amostrados	Coordenadas Geográficas
<i>P. mulata</i>	Cáceres – MT	13	S 16° 11' / W 57° 40'
	Cuiabá – MT	12	S 15° 23' / W 55° 59'
	Poconé – MT	14	S 16° 18' / W 56° 31'
	Santo Antônio de Leverger – MT	6	S 15° 45' / W 55° 39'
	Campo Grande – MS	13	S 20° 28' / W 54° 37'
<i>P. helleri</i>	Blumenau – SC	8	S 26° 55' / W 49° 03'
	Luis Alves – SC	2	S 26° 35' / W 48° 50'
	Biritiba Mirim – SP	2	S 23° 36' / W 45° 59'
	São Paulo – SP	11	S 23° 32' / W 46° 38'
	Porto Firme – MG	3	S 20° 40' / W 43° 05'
	Viçosa – MG	8	S 20° 45' / W 42° 52'
	São Miguel do Anta – MG	1	S 20° 42' / W 42° 43'
	Colatina – ES	9	S 19° 23' / W 40° 41'
	Ilhéus – BA	1	S 14° 47' / W 39° 10'
	Coaraci – BA	2	S 14° 94' / W 39° 27'

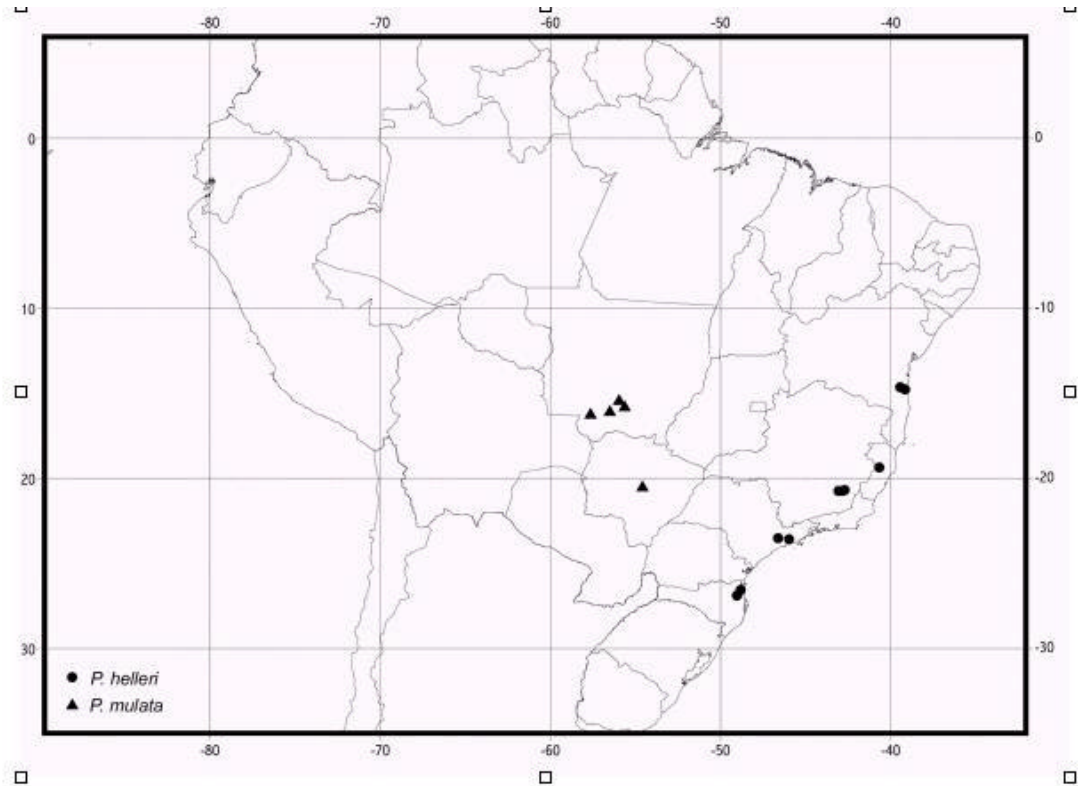


Figura 2. Mapa parcial da América do Sul apresentando os locais de coleta de *P. mulata* (▲) e *P. helleri* (●) em diferentes estados brasileiros.

3.2. DNAm^t

3.2.1. Extração de DNA

Para as análises do DNAm^t, o DNA total foi extraído do tórax de dez indivíduos de cada colônia de *P. mulata* e *P. helleri* pelo método TNE Corex (Sheppard e McPheron, 1991). O protocolo utilizado foi o seguinte:

- 1.** Macerar os tórax de dez indivíduos em 1 ml de tampão A (10 mM Tris pH 7,0; 60 mM NaCl; 5% sacarose; 10 mM EDTA) em tubo Corex;
- 2.** Adicionar 1 ml do tampão B (300 mM Tris pH 7,0; 1,24% SDS; 5% sacarose; 20 mM EDTA; 0,8% DEPC);
- 3.** Incubar os tubos por 15 minutos em gelo;
- 4.** Adicionar 1 volume de fenol equilibrado misturando gentilmente;
- 5.** Incubar os tubos por 3 minutos em gelo;
- 6.** Centrifugar a 7.000 rpm¹ por 5 minutos a 4 °C;
- 7.** Transferir o sobrenadante para um outro tubo corex limpo e adicionar 1 volume de fenol/clorofórmio (24:1 álcool isoamílico). Usar um vortex para misturar bem;
- 8.** Repetir o passo 6;
- 9.** Transferir o sobrenadante para um outro tubo Corex limpo e adicionar 1 volume de clorofórmio (24:1 álcool isoamílico). Usar um vortex para misturar bem;
- 10.** Repetir o passo 6;
- 11.** Transferir o sobrenadante para um tubo Corex limpo e siliconizado e adicionar 1 volume de TE 1X (10 mM Tris; 0,1 mM EDTA), 5% de volume de acetato de sódio 3 M pH 7,0 e 10 ml de etanol 100% a -20 °C. Incubar a -20 °C por 2 horas;
- 12.** Centrifugar a 12.000 rpm¹ por 30 minutos a 4 °C;

¹ – Centrifuga Jouan MR23i, rotor de ângulo fixo modelo AM.SOC.13.

13. Descartar o sobrenadante e dissolver o precipitado com 1 ml de TE 1X. Adicionar 50 μ l de acetato de sódio 3 M pH 7,0 e 10 ml de etanol 100% a -20 °C. Incubar novamente a -20 °C por 2 horas;
14. Repetir o passo 12;
15. Descartar o sobrenadante e lavar o precipitado com 3 ml de etanol 70% a -20 °C;
16. Centrifugar a 12.000 rpm¹ por 10 minutos a 4 °C;
17. Descartar cuidadosamente o etanol 70% e secar o precipitado em bomba de vácuo por 5 minutos;
18. Dissolver o precipitado em 100 μ l de TE 1X;
19. Armazenar o DNA a -20 °C.

3.2.2. PCR+RFLP do DNAm_t

Para amplificação do DNAm_t de *Partamona* foram usados *primers*: universais para insetos (Simon *et al.*, 1994); derivados de *Apis mellifera* (Hall e Smith, 1991; Arias *et al.*, 1998) e de *Melipona bicolor* (Francisco *et al.*, 2001; Silvestre, 2002) (Tabela 2).

As reações de PCR foram realizadas em volumes de 50 μ l finais contendo: 32,5 μ l de água deionizada; 5 μ l de tampão de PCR 10x; 5 μ l de dNTPs 2 mM cada; 1,5 μ l de MgCl₂ 50 mM; 1,5 μ l de cada *primer* 20 μ M; 0,5 μ l da extração de DNA e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As reações de PCR foram precedidas de um passo de desnaturação a 94 °C por 1 minuto seguindo-se 35 a 40 ciclos de: desnaturação 94 °C por 1 minuto, anelamento por 1 minuto e vinte segundos e elongação a 64 °C por 1 minuto. Ao final desses ciclos, um passo extra de elongação a 64 °C por 10 minutos foi efetuado. A temperatura de anelamento e o número de ciclos foram ajustados para aqueles pares que amplificaram bandas inespecíficas além da banda correta.

¹ – Centrifuga Jouan MR23i, rotor de ângulo fixo modelo AM.SOC.13.

Quatro regiões mitocondriais de *P. mulata* e *P. helleri* foram amplificadas COII; ATP8, ATP6; cytB, ND1; COIII, ND3, as quais foram submetidas a digestões simples e duplas com seis enzimas de restrição (tabela 2) para obtenção dos haplótipos mitocondriais. As digestões foram montadas com 5 U de enzima e 2 µl do respectivo tampão, e 3 ou 5 µl do produto da PCR, num volume final de 20 µl. Os tubos foram incubados pela noite a 37 °C. Digestões duplas foram executadas com objetivo de mapeamento dos sítios de restrição nos fragmentos. Estas foram realizadas como duas digestões simples intercaladas por uma precipitação como se segue:

1. Retirar a digestão do banho-maria 37 °C e adicionar 1,1 µl EDTA 0,2 M pH 8,0, 2 µl acetato de sódio 3M pH 7,0 e 100 µl etanol 100% a -20 °C;
2. Incubar o tubo a -20 °C por duas horas;
3. Centrifugar a 14.000 rpm² por 30 minutos a 4 °C;
4. Descartar o sobrenadante e adicionar 100 µl de etanol 70% a -20 °C;
5. Centrifugar a 14.000 rpm² por 10 minutos a 4 °C;
6. Descartar o sobrenadante e secar o precipitado em bomba de vácuo por 3 minutos;
7. Ressuspender o precipitado em 17,5 µl de água deionizada e acrescentar 5 U de enzima e 2 µl do tampão de atuação específico;
8. Incubar a digestão pela noite em temperatura adequada para atuação da enzima.

As bandas resultantes de digestões de fragmentos de PCR foram visualizadas em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, em transiluminador UV e fotografado com filme polaroide 667.

Tabela 2. Condições de PCR e pares de *primers* usados para amplificação do DNAm de *Partamona* para o PCR+RFLP. São mostrados: conteúdo gênico por região; (Cf) Comprimento do fragmento em pares de bases; (Ta) Temperatura de anelamento em °C e enzimas utilizadas para digestão dos fragmentos.

<i>Primers</i>	Genes principais	Cf (pb)	Ta (número de ciclos)		Enzimas de restrição	Referências dos <i>primers</i>
			<i>P. mulata</i>	<i>P. helleri</i>		
COI – IIF	COII	900	43 (40x)	43,5 (35x)	<i>Cla</i> I, <i>Dra</i> I,	b
mtD18					<i>Fba</i> I e <i>Hinf</i> I	a
mtD19	ATP8, ATP6	1100	42 (35x)	42 (35x)	<i>Dra</i> I e <i>Hinf</i> I	a
Seq11						c
mtD26	cytB, ND1	1700	42 (35x)	42 (35x)	<i>Dra</i> I, <i>Hae</i> III e	a
mtD30					<i>Hinf</i> I	a
5612R	COIII, ND3	1200	44 (35x)	43 (40x)	<i>Dra</i> I, <i>Hind</i> III e	d
tPheF					<i>Hinf</i> I	d

a – Simon *et al.* (1994); b – Hall and Smith (1991); c – Silvestre (2002); d – Francisco *et al.* (2001).

3.2.3. Análises estatísticas

Os diferentes perfis de digestão observados foram designados por letras. Haplótipos mitocondriais de *P. mulata* e *P. helleri* foram compostos por meio da justaposição destas letras.

Optou-se por trabalhar com padrões de bandas geradas por enzima/fragmento, pois não foi possível mapear sítios de restrição para as enzimas *Dra* I e *Hinf* I em alguns dos fragmentos analisados.

Utilizando o pacote de programas REAP (“Restriction Enzyme Analysis Package”) v4.0 (McElroy *et al.*, 1992) foram realizados diversos cálculos: com o programa D, a distância genética entre os haplótipos (d) (Nei e Tajima, 1981; Nei e Miller, 1990); com o DSE, o erro padrão dessas estimativas (Nei e Tajima, 1983; Nei, 1987); com o programa DA, o índice de diversidade haplotípica (h) (Nei, 1987), os valores de diversidade nucleotídica dentro de cada população (δ) e de divergência de sequência de nucleotídeos entre todos os pares de populações (δ) (Nei e Tajima 1981, Nei, 1987); com o programa MONTE, a heterogeneidade das frequências haplotípicas entre as amostras, testada através da simulação Monte Carlo (Roff e Bentzen, 1989).

O programa ARLEQUIN v2.000 (Schneider *et al.*, 2000) foi utilizado para realizar o teste exato, em conjunto com o método da cadeia de Markov (Raymond e Rousset, 1995a; Goudet *et al.*, 1996), com a finalidade de se verificar diferenças entre as populações baseando-se nas frequências haplotípicas. Com o mesmo programa, realizaram-se cálculos para análise da estrutura populacional das duas espécies empregando-se a análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) e também o índice F_{ST} entre pares de populações, o qual, pode ser usado como uma estimativa da distância genética entre elas. A significância de todos esses valores foi testada através de testes não paramétricos de permutação ($\alpha = 0,05$) (Excoffier *et al.*, 1992).

O programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) v2.1 (Kumar *et al.*, 2001) foi utilizado para inferir as relações entre os haplótipos do DNAm_t, através de um fenograma, segundo o método de Evolução Mínima (Rzhetsky e Nei, 1992), a partir da matriz dos valores de *d*. Fenogramas também foram construídos para inferir as relações entre as cinco populações estudadas com base nos valores de δ e de F_{ST} .

O programa NETWORK 4.1.0.6 (www.fluxus-engineering.com) foi utilizado para construir redes de inter-relação entre haplótipos atribuindo-se o mesmo peso para os caracteres.

3.3. Microssatélites

3.3.1. Extração de DNA

Para os testes das condições de PCR (temperatura de hibridação dos *primers* e número de ciclos), o DNA genômico de um indivíduo de cada espécie foi extraído seguindo o protocolo de Walsh *et al.* (1991) que consiste em:

1. Adicionar um tórax de abelha a 400 μ l de solução de resina chelex 10%;
2. Incubar o tubo a 56 °C por 30 minutos;
3. “Vortexar” por 10 segundos;
4. Incubar em água fervente por 5 minutos;
5. “Vortexar” por 10 segundos;
6. Centrifugar por 3 minutos a 14.000 rpm³ em temperatura ambiente;
7. Usar o sobrenadante para reações de PCR;
8. Estocar a -20 °C.

3.3.2. PCR de microssatélites

Foram testados *primers* derivados de *Apis mellifera* (Estoup *et al.*, 1993), *Bombus terrestris* (Estoup *et al.*, 1993), *M. bicolor* (Peters *et al.*, 1998) e *Scaptotrigona postica* (Paxton *et al.*, 1999a), sumarizados na tabela 3.

As reações de PCR foram realizadas em volumes de 10 µl finais contendo: 5,6 µl de água deionizada; 1 µl de tampão de PCR 10x; 0,5 µl de dNTPs 2 mM cada; 0,3 µl de MgCl₂ 50 mM; 0,2 µl de cada *primer* 20 µM; 2 µl da extração de DNA (de um total de 400 µl) e 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As reações foram submetidas a um passo de desnaturação a 93 °C por 4 minutos seguindo-se 35 a 45 ciclos de: desnaturação 93 °C por 40 segundos, hibridação dos *primers* por 50 segundos e extensão a 72 °C por quarenta segundos. Ao final desses ciclos, um passo extra de extensão a 72 °C por 5 minutos foi efetuado.

Tabela 3. Primers derivados de *Apis mellifera* (A), *Bombus terrestris* (B), *M. bicolor* (Mbi) e *Scaptotrigona postica* (T), testados para a amplificação de locos microssatélites em *P. mulata* e *P. helleri*, respectiva repetição e referência. Cf: comprimento do fragmento.

Primers	Cf (pb) esperado	Repetição	Referência
A14	215	(CT) ₁₃ ...(CGT) ₉	a
A 28	122-145	(CCT) ₃ GCT(CCT) ₆ (CT)5TT(CT) ₄	a
A 88	138-154	(CT) ₁₀ TC(CCTT) ₂ (CTTT) ₆ ...(GGA) ₇	a
B124	212-262	(CT) ₈ TCCTCTTC...(CT) ₁₄ CCTC	a
Mbi11	152	(GC) ₃ ...(GGCT) ₈ (ACC) ₈ ATC(GCC) ₅	b
Mbi28	108	(TCC) ₆ ACC(TCC) ₃	b
Mbi32	154	(GGA) ₄ (GGAGAA) ₅	b
Mbi33	140	TTC(TTC) ₂ TCTTCC(TCT) ₂ (TCC) ₃	b
Mbi88	94	(GAAA) ₂ GGAAG(AAAGA) ₄ (AAGGA) ₂ AAAGAAAC(GAG) ₂	b
Mbi201	152	(CTT) ₁₀ CTC(CTT) ₅ CCT ₉ (CTT) ₂	b
Mbi215	92	(TTC) ₆	b
Mbi218	131	(CTT) ₃ (TCT) ₇	b
Mbi232	128	(CTT) ₁₃	b
Mbi233	119	(GAA) ₁₅	b
Mbi254	213	(AAG) ₁₁	b
Mbi256	127	(AGA) ₉	b
Mbi259	183	(AGG)(AGA) ₅ (GGA) ₂ GAA(GGA) ₂	b
Mbi278	113	CTT(CTC) ₂ CTTCTCTGCTTCC	b
Mbi305	106	(TCT) ₉ CCTTCG(TCT) ₂ (CAT) ₃ (CAG)(CAT) ₂ (CCT) ₃	b
Mbi522	136	(TCT)(CTT) ₂ (CCT)(CTTC)(TGC) ₄ TGT(TGC) ₃	b
T1-35	120-132	(CT) ₁₅	c
T3-32	109-131	(CT) ₂₁	c
T4-171	100-132	(CT) ₁₉	c
T7-5	76-104	(CT) ₂₀	c
T8-40	124-138	(CT) ₁₈	c

a – Estoup *et al.* (1993); b – Peters *et al.* (1998); c – Paxton *et al.* (1999a).

3.3.3. Visualização dos fragmentos

Os microssatélites amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante, 16,5 cm x 14,5 cm. Para confecção dos géis 5,6% foram usados: 400 µl de persulfato de amônio 10%; 20 µl de TEMED (GIBCO) e 40 ml da solução estoque de poliacrilamida: 100 ml TBE 10X, 140 ml de acrylamide ReadySol DNA/PAGE 40% Plus One[®], 760 ml de água deionizada. Para confecção de

géis 9%, mudou-se apenas a solução estoque de poliacrilamida: 100 ml TBE 10X, 225 ml de acrylamide ReadySol DNA/PAGE 40% Plus One®, 760 ml de água deionizada. Usou-se marcador de peso molecular 10 pb *ladder* para estimativa do tamanho dos fragmentos. Para os locos mais polimórficos, PCRs dos diferentes alelos observados também eram aplicados no gel, para maior precisão na genotipagem dos indivíduos. A revelação dos géis foi realizada como se segue:

1. Colocar o gel em 200 ml de solução fixadora (20 ml de etanol 100%; 1 ml de Ácido Acético Glacial e 179 ml de água destilada) por 20 minutos;
2. Colocar o gel em solução de AgNO_3 (0,3 g de AgNO_3 ; 50 ml de solução fixadora e 100 ml de água destilada) por 10 minutos;
3. Lavar o gel em 200 ml de água destilada por 2 minutos;
4. Colocar o gel em 200 ml da solução reveladora (6 g de NaOH; 600 ml de formaldeído 37% e 200 ml de água destilada) por aproximadamente 10 minutos;
5. Lavar o gel em água destilada por 10 minutos;
6. Colocar o gel novamente na solução fixadora por no mínimo 10 minutos.

3.3.4. Análise estatística

Para a composição dos dados de microssatélites, um indivíduo por ninho de *P. mulata* e *P. helleri* foi genotipado para os diferentes locos microssatélites. Os alelos de microssatélite verificados foram representados por letras ou números na construção das matrizes de genótipos, necessárias para cálculos empregando-se programas estatísticos.

O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, exato de Fisher, teste U (para verificar excesso ou deficiências de heterozigotos), diversidade gênica, desequilíbrio de ligação, taxas de heterozigose (H), frequência alélica e diferenciação populacional (alélica e

genotípica), F_{ST} (correlação entre dois alelos retirados ao acaso de sub-populações com relação a alelos amostrados ao acaso da população total), foram calculados usando-se o programa GENEPOP v3.3 (Raymond e Rousset, 1995b).

Os programas BIOSYS – 2 (Swofford e Selander, 1997) e MEGA 2.1 (Kumar *et al.*, 2001) foram utilizados para, respectivamente, cálculo da estimativa da distância genética entre populações e construção de fenograma pelo método de Evolução Mínima (Rzhetsky e Nei, 1992).

O teste de Mantel para verificação da correlação das distâncias genéticas *versus* a distância geográfica foi realizado usando o programa MANTEL FOR WINDOWS (Cavalcanti, 1988).

3.3.5. Estudo de parentesco

Para a realização de estudos sobre o parentesco, escolhemos duas colônias de cada população de ambas espécies. Foram amostrados 10 indivíduos de cada colônia. Foram analisados três locos microssatélites, Mbi278, T3-32 e T4-171 para *P. mulata* e Mbi215, Mbi278, e T4-171 para *P. helleri*.

A visualização dos fragmentos foi realizada, tal como descrito no item 3.3.3., em géis de poliacrilamida 9%.

A análise do número de possíveis acasalamentos das rainhas de *Partamona* foi realizada com o programa MATESOFT (www.zi.ku.dk/popecol/personal/JRPederson/MateSoft.htm). O grau de parentesco (p) foi calculado segundo a fórmula [$p = 0,5(1/pe)$] de Hamilton (1964), onde pe é o número de patrilíneas efetivas o qual foi estimado pelo software MATESOFT, com base na identidade dos alelos e suas frequências observadas para toda a população.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Amplificação de Microssatélites de *P. mulata* E *P. helleri*

Dos 25 pares de *primers* testados, 9 apresentaram resultados satisfatórios para *Partamona mulata*: sete deles com *primers* derivados de *M. bicolor* (Mbi28, Mbi32, Mbi201, Mbi215, Mbi218, Mbi278, Mbi522) dois derivados de *Scaptotrigona postica* (T3-32 e T4-171) (Figura 3). Para *P. helleri* foram amplificados 10 locos: nove com *primers* derivados de *M. bicolor* (Mbi11, Mbi28, Mbi32, Mbi33, Mbi201, Mbi215, Mbi218, Mbi278 e Mbi522) e um de *Scaptotrigona postica* (T4-171) (Figura 4). Os comprimentos dos fragmentos obtidos e as adaptações das condições de PCR realizadas, como temperaturas de hibridação dos *primers* e número de ciclos utilizados, estão sumarizados na tabela 4.

Os resultados de microssatélites apontam maior similaridade entre os genomas de ambas espécies de *Partamona* com *M. bicolor*, visto que o maior número de locos, foram amplificados com *primers* derivados desta espécie. O mesmo já foi evidenciado para *Plebeia remota* por Francisco (2002), em que *primers* derivados de *Apis mellifera* e *Bombus terrestris* (tabela 3) não amplificaram bandas satisfatórias para estudo populacional.

Tabela 4. Locos de microssatélites amplificados nas espécies *P. mulata* e *P. helleri* **Ta:** Temperatura de hibridação dos *primers* (com número de ciclos entre parêntesis); **Cfe:** Comprimento esperado do fragmento (pares de bases) de acordo com a literatura; **Cfo:** comprimento do fragmento (pares de bases) observado por sequenciamento. **Pm:** *P. mulata*; **Ph:** *P. helleri*. (-): Não houve amplificação.

<i>Loco</i>	Ta °C (ciclos) <i>Pm</i>	Ta °C (ciclos) <i>Ph</i>	Cfe (pb)	Cfo (pb) <i>Pm</i>	Cfo (pb) <i>Ph</i>
Mbi11	55 (30x)	55 (30x)	152	137	137
Mbi28	60 (30x)	60 (30x)	108	105	105
Mbi32	65 (30x)	65 (30x)	145	140	140
Mbi33	65 (30x)	65 (30x)	140	141	141
Mbi201	65 (40x)	65 (30x)	152	126	126
Mbi215	65 (30x)	65 (30x)	92	95	88/95
Mbi218	65 (30x)	65 (30x)	131	121	121
Mbi278	65 (30x)	65 (30x)	113	104	106
Mbi522	65 (35x)	64 (45x)	136	135	135
T3-32	65 (30x)	-	109-131	93	-
T4-171	55 (40x)	55 (40x)	100-132	104	104

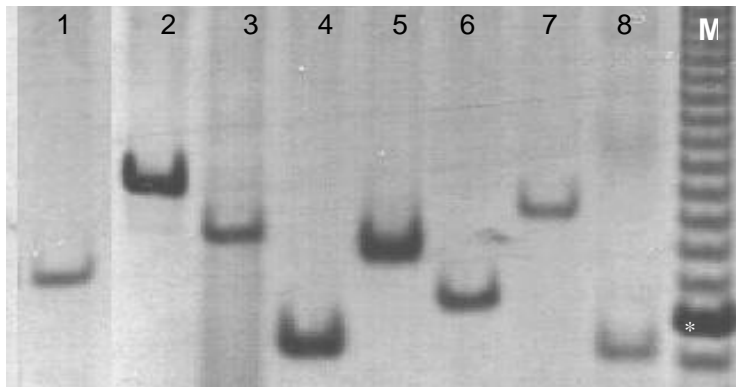


Figura 3. Fracionamento em gel de poliacrilamida 5,6% dos fragmentos amplificados em *Partamona mulata*. 1: **Mbi28**. 2: **Mbi32**. 3: **Mbi201**. 4: **Mbi215**. 5: **Mbi218**. 6: **Mbi278**. 7: **Mbi522**. 8: **T3-32**. **M**: Marcador molecular 10pb *ladder* (*100pb).

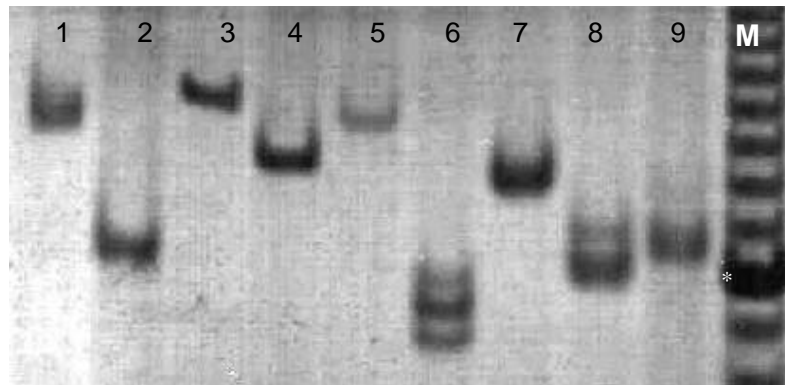


Figura 4. Fracionamento em gel de poliacrilamida 5,6% dos fragmentos amplificados em *Partamona helleri*. 1: **Mbi11** 2: **Mbi28**. 3: **Mbi32**. 4: **Mbi201**. 5: **Mbi33**. 6: **Mbi215**. 7: **Mbi218**. 8: **Mbi278**. 9: **T4-171**. **M**: Marcador molecular 10pb *ladder* (*100pb).

4.2. Análises populacionais

4.2.1. *Partamona mulata*

4.2.1.1. PCR+RFLP do DNAm

Descrição e frequências de haplótipos mitocondriais

Foram analisadas cinco populações de *P. mulata* coletadas em Mato Grosso e Mato Grosso do Sul totalizando 58 colônias: **Cac** (14), **Poc** (13), **Cba** (12), **Sal** (6) e **Cgd** (13) (Tabela 1). Foram utilizados os pares de *primers* COI-III/mtD18; mtD19/Seq11; mtD26/mtD30 e 5612R/tPheF para amplificação de regiões do DNAm resultando em fragmentos de 900; 1.100; 1.800 e 1.200 pb, respectivamente. Não foram observadas diferenças nos tamanhos dos fragmentos amplificados entre as diferentes colônias.

No total foram analisados 27 sítios de restrição. Os sítios de restrição de *Dra* I dos fragmentos mtD26/mtD30, mtD19/Seq11 e 5612R/tPheF, não puderam ser mapeados. Portanto, a análise do DNAm foi realizada com base no padrão de bandas gerado, e não por análise de mapas de restrição. O perfil de digestão de cada fragmento obtido por enzima utilizada foi designado por uma letra (Figura 5). Os tamanhos das bandas geradas podem ser vistos na tabela 5. No caso do fragmento COI-III/mtD18, os tamanhos das bandas obtidas após a digestão foram estimados por sequenciamento (Anexo 1). Haplótipos compostos foram elaborados a partir da justaposição dessas letras para ambas espécies. Foram obtidos apenas dois haplótipos (H01 e H02) distintos para *P. mulata* (Tabela 6).

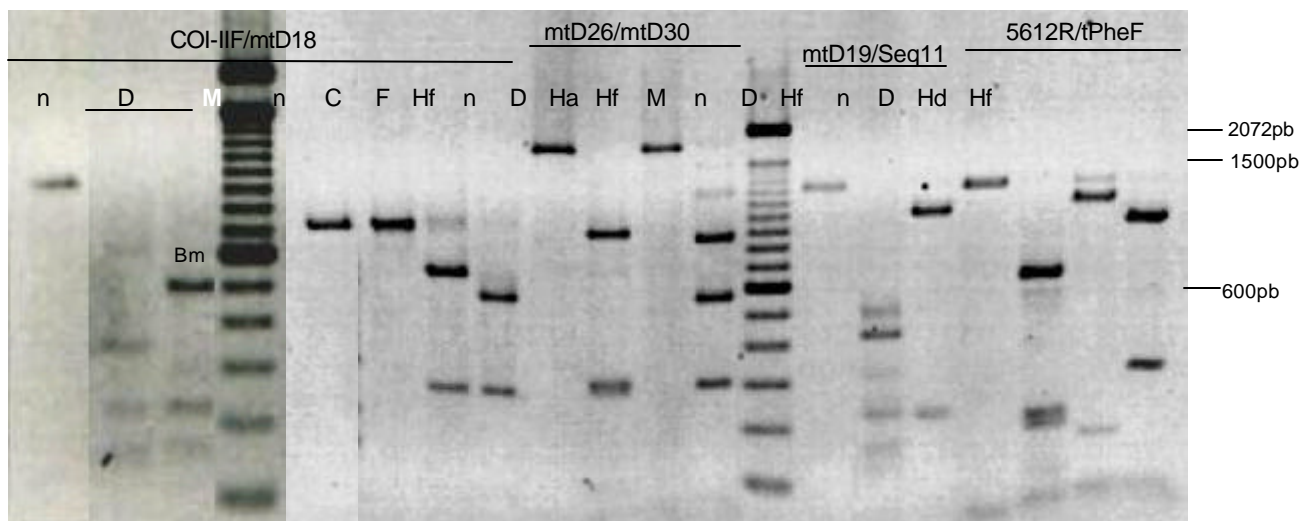


Figura 5. Fracionamento em gel de agarose 2% contendo os perfis de digestão de fragmentos de DNAm de *P. mulata*. As enzimas usadas para digestão dos fragmentos estão discriminadas por raia: D: *Dra* I; C: *Cla* I; F: *Fba* I; Ha: *Hae* III; Hd: *Hind* III; Hf: *Hinf* I. Excetuando o perfil da raia 3 (Bm), todos os perfis observados foram designados como Am (Tabela 5). **n**: Fragmento não digerido. **M**: marcador de peso molecular 100 pb *ladder*. Os tamanhos das bandas marcadoras mais fortes estão descritos à direita do gel.

Tabela 5. Fragmentos obtidos, em pares de bases, por meio de PCR+RFLP de regiões mitocondriais amplificadas de *P. mulata*, codificados como presença (1) ou ausência (0). Enzimas usadas: **I** – *Dra* I; **II** – *Hinf* I; **III** – *Cla* I; *Fba* I; *Hae* III; *Hind* III. (Frag.: Fragmentos).

I

COI-IIIF/ mtD18 <i>Dra</i> I			mtD26/mtD30 <i>Dra</i> I		mtD19/Seq11 <i>Dra</i> I		5612R/tPheF <i>Dra</i> I	
Frag.*	Am	Bm	Frag.	Am	Frag.	Am	Frag.	Am
560	0	1					650	1
336	1	0	900	1	400	1	200	1
224	1	0	310	1	200	1	175	1
178	1	1	300	1	150	1	100	1
137	1	1	50	1	100	1	50	1
56	1	1						

* Tamanhos observados pelo seqüenciamento.

II

COI-IIIF/ mtD18 <i>Hinf</i> I		mtD26/mtD30 <i>Hinf</i> I		mtD19/Seq11 <i>Hinf</i> I		5612R/tPheF <i>Hinf</i> I	
Frag.*	Am	Frag.	Am	Frag.	Am	Frag.	Am
567	1	900	1				
270	1	520	1	1000	1	900	1
64	1	300	1	200	1	300	1
30	1						

* Tamanhos observados pelo seqüenciamento.

III

COI-IIIF/ mtD18 <i>Cla</i> I		COI-IIIF/ mtD18 <i>Fba</i> I		mtD26/mtD30 <i>Hae</i> III		5612R/tPheF <i>Hind</i> III	
Frag.	Am	Frag.	Am	Frag.	Am	Frag.	Am
900	1	600	1	1800	1	1000	1
		300	1			150	1

Tabela 6. Haplótipos mitocondriais de *P. mulata* obtidos pela composição de perfis de digestão de fragmentos amplificados.

Haplótipo	COI-IIIF / mtD18				mtD26 / mtD30			mtD19 / Seq 11		5612R / tPheF		
	<i>Dra</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Fba</i> I	<i>Cla</i> I	<i>Dra</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Dra</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Dra</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Hind</i> III
H 01	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
H 02	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Divergência de seqüência, diversidade haplotípica e nucleotídica

Uma matriz binária para presença (1) ou ausência (0) de bandas foi gerada a partir dos dados da tabela 5. A partir desta matriz foi possível calcular a estimativa de divergência de seqüência (d) para os dois haplótipos de *P. mulata*. O valor (d) foi de 0,27% e o erro padrão de 0,43%, ou seja, bem maior que a distância calculada. Portanto pode-se concluir que as colônias amostradas de *P. mulata* são praticamente idênticas com relação às regiões do DNAm analisadas.

A diferença entre os dois haplótipos é a presença/ausência de um sítio de restrição *Dra* I, no fragmento COI-IIIF/mtD18. Devido a essa pequena diferença, os índices de diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) foram iguais a 0 para todas populações com exceção de **Cgd**, que apresentou 0,1594 (erro padrão 0,09448) e 0,000447, respectivamente. Esses valores reafirmam a baixa variabilidade intra-específica com relação às regiões mitocondriais analisadas.

Estruturação populacional

Apesar da notória não subdivisão das populações, os índices de divergências de seqüência (δ) e F_{ST} foram calculados (Tabela 7). Os valores de F_{ST} , igual a 0 para todos os pares de populações de *P. mulata* analisadas, confirmam que não há estruturação entre estas. Devido a esses resultados, não foi possível, nem necessário, obter fenograma a partir das distâncias genéticas entre haplótipos de *P. mulata*.

A Análise da Variância Molecular (AMOVA) mostrou, como esperado, maior valor intrapopulações do que interpopulações, já que quatro das cinco populações apresentaram apenas um haplótipo (Tabela 8).

Tabela 7. Valores de divergência de sequência de nucleotídeos (δ) (abaixo da diagonal) e estimativa de F_{ST} (acima da diagonal), entre pares de populações estudadas de *P. mulata*.

	Cac	Poc	Cba	Sal	Cgd
Cac		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Poc	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000
Cba	0,0000	0,0000		0,0000	0,0000
Sal	0,0000	0,0000	0,0000		0,0000
Cgd	0,0000	0,0059	-0,0064	-0,0551	

Tabela 8. Resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) em *P. mulata*. *P*: probabilidade de se obter um valor de ϕ maior do que o observado.

Componente da variância	Variância	% do total	P	f
Interpopulacional	-0,0005	-1,06	-	-
Intrapopulacional	0,0513	101,06	0,7683 (0,0123)	-0,0106

Número de Permutações: 1023; $\alpha = 0,05$. (entre parêntesis: erro padrão)

4.2.1.2. Microsatélites

Dados populacionais para abelhas da tribo Meliponini são escassos. Há apenas um trabalho com *Plebeia remota*, realizado por Francisco (2002). Além da análise populacional, o autor também comparou os resultados obtidos quando a amostragem era realizada com um, ou cinco indivíduos por colônia. Francisco (2002) concluiu que a utilização de indivíduos aparentados para compor o conjunto de dados de uma população influenciava o resultado das análises estatísticas, sugerindo que a utilização de apenas um indivíduo por colônia fornecia resultados mais confiáveis. Desta forma diminuem-se também os gastos com material, o tempo para obtenção dos resultados e principalmente, a quantidade de material biológico necessária. Outros autores também têm utilizado essa estratégia em estudos de espécies sociais, usando apenas um indivíduo por ninho, como: em abelhas do gênero *Apis* (Estoup *et al.*, 1995 e 1996; Franck *et al.*, 2000 e 2001; Sittipraneed *et al.*, 2001), em cupins (Vargo *et al.*, 2003) e

em formigas (Ross *et al.*, 1997; Goropashnaya *et al.*, 2004; Viginier *et al.*, 2004). Assim, seguindo a sugestão de Francisco (2002), utilizamos um indivíduo por colônia para a obtenção de dados de microssatélite de *P. mulata*.

Foram estudados nove locos para a análise das cinco populações de *P. mulata*, totalizando 58 indivíduos: **Cac** (13), **Poc** (14), **Cba** (12), **Sal** (6) e **Cgd** (13).

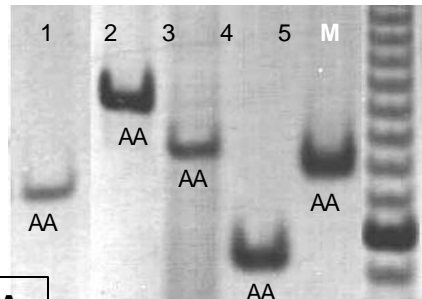
Distribuição alélica e genotípica

Dos nove locos estudados, quatro locos apresentaram um único alelo (Mbi28, Mbi32, Mbi215 e Mbi218), três locos apresentaram um segundo alelo (Mbi201, Mbi278 e Mbi522) e apenas dois locos apresentaram mais que dois alelos, T3-32 com quatro e T4-171 com seis. As figuras 7 a 9 apresentam os alelos observados em *P. mulata*. A figura 10 apresenta a proporção dos alelos por população em cada loco. Alelos exclusivos foram observados para o loco Mbi278, alelo B (Figura 7D), o qual foi observado apenas na população de Cáceres, e para o loco T4-171, alelo E, em Cuiabá (Figura 8). As frequências alélicas podem ser vistas na tabela 9.

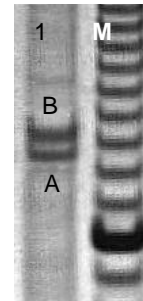
As populações que apresentaram os maiores números de genótipos diferentes foram as de Poconé (Poc) e Cáceres (Cac) com 22 cada. A primeira apresentou oito genótipos heterozigotos enquanto que a segunda apresentou nove. As populações de Campo Grande (Cgd) e Cuiabá (Cba) apresentaram 21 genótipos distintos, dentre os quais nove eram heterozigotos para a primeira e oito para a segunda. Por fim, a população de Santo Antônio de Leverger (Sal) apresentou 14 genótipos com cinco em heterozigose (Tabela 10). Taxas de heterozigose [H_o = observada, H_e = esperada de acordo com equilíbrio de Hardy-Weinberg, e H_n = não tendenciosa (Nei, 1978)] podem ser observadas na tabela 9.

Figura 7.

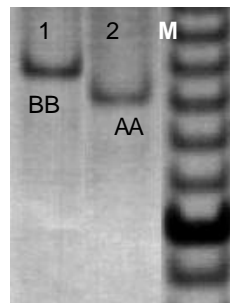
Genótipos de locos microssatélite observados em *P. mulata*. Géis de poliacrilamida 5,6% contendo fragmentos amplificados de locos microssatélite. A) 1 - Mbi 28; 2 - Mbi 32; 3 - Mbi 201; 4 - Mbi 215; 5 - Mbi 218. B) 1 - Mbi 201. C) 1 e 2 - Mbi 522. D) 1 e 2 - Mbi 278. **M**: marcador de pesc molecular 10 pb, sendo a banda mais forte a de 100 pb.



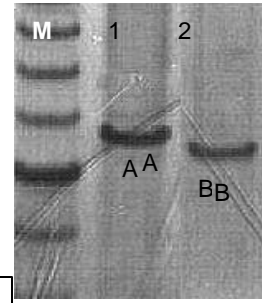
A



B



C



D

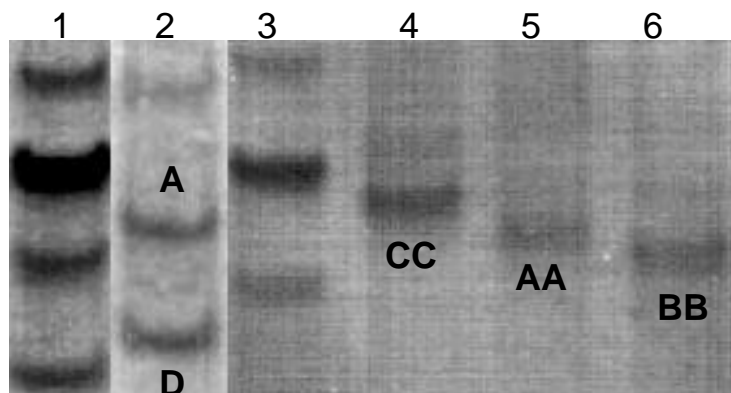


Figura 8. Fracionamento em gel de poliacrilamida 9% de fragmentos amplificados do loco microssaltélite T3-32 de *P. mulata*. A, B, C e D: alelos observados na composição dos genótipos. 1 e 3: Marcador de peso molecular 10pb *ladder*, sendo a banda mais forte a de 100 pb.

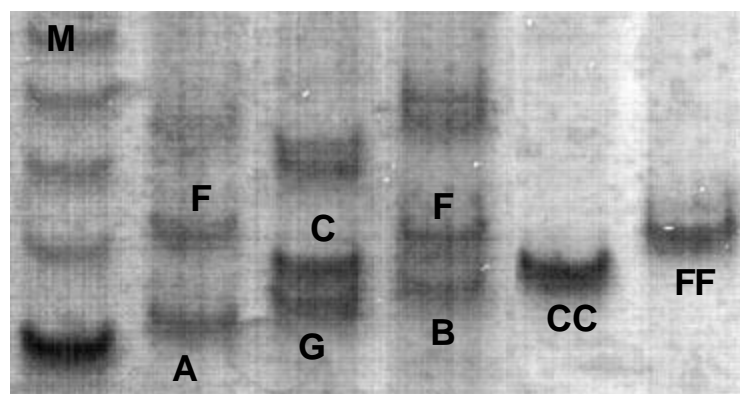


Figura 9. Fracionamento em gel de poliacrilamida 9% de fragmentos amplificados do loco microssaltélite T4-171 de *P. mulata*. A, B, C, F e G: alelos observados na composição dos genótipos. M: marcador de peso molecular 10 pb *ladder*, sendo a banda mais forte a de 100 pb.

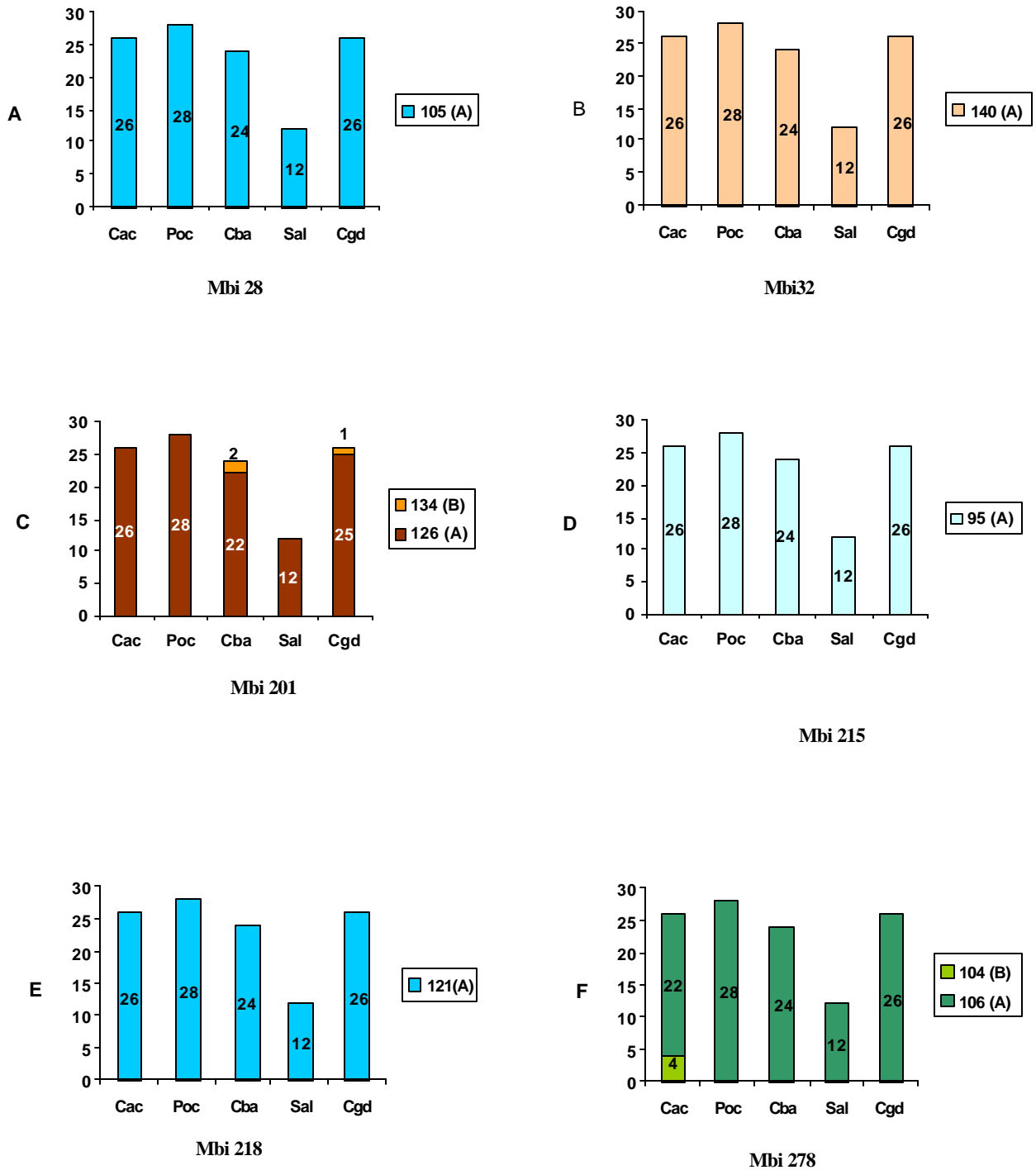


Figura 10. Proporção entre alelos microsatélites encontrados em *P. mulata* nos diferentes locos estudados. Eixo X: locais de coleta (ver Tabela 1). Eixo Y: quantidade de alelos. Locos: A) Mbi 28; B) Mbi 32; C) Mbi 201; D) Mbi 215; E) Mbi 218; F) Mbi 278; G) Mbi 522; H) T3-32; I) T4-171.

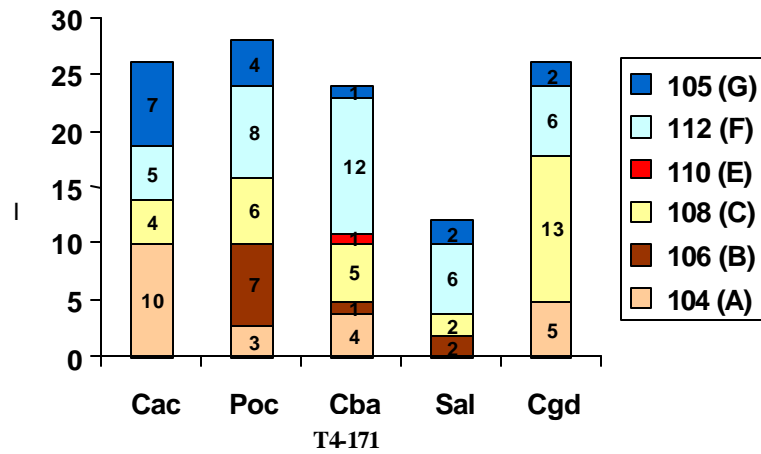
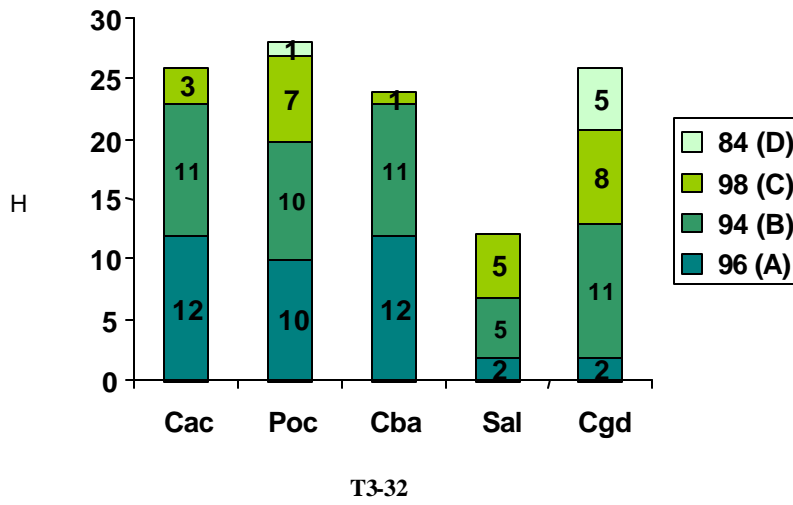
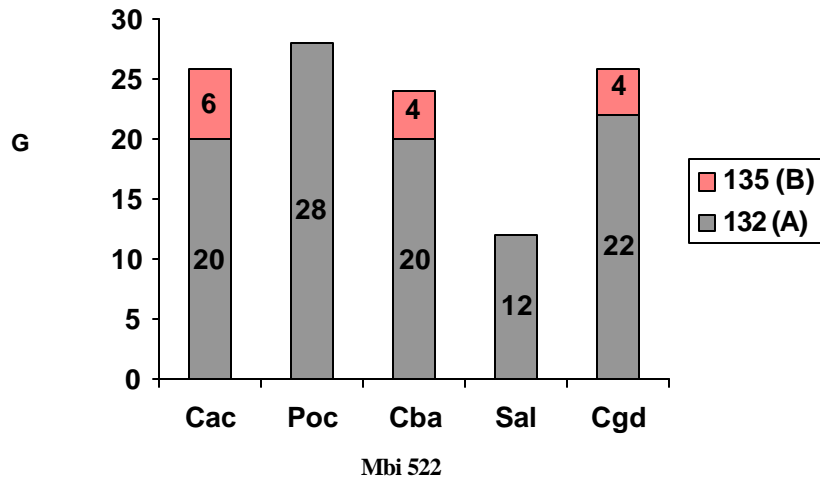


Figura 10. Continuação.

Tabela 9. Frequências alélicas e taxas de heterozigose observada (*Ho*), esperada sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg (*He*) e não tendenciosa (*Hn*) por loco e por par de populações de *Partamona mulata*. (n): número de alelos amostrados por loco e por população.

Locos	Alelos (pb)	Cac	Poc	Cba	Sal	Cgd
		n=26	n=28	n=24	n=12	n=26
Mbi201	A (126)	1,0000	1,0000	0,9170	1,0000	0,9615
	B (134)			0,0830		0,0385
<i>Ho</i>		0,0000	0,0000	0,1530	0,0000	0,0000
<i>He</i>		0,0000	0,0000	0,1590	0,0000	0,0000
<i>Hn</i>		0,0000	0,0000	0,1670	0,0000	0,0000
Mbi278	A (106)	0,8460	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	B (104)	0,1540	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Ho</i>		0,3080	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>He</i>		0,2600	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Hn</i>		0,2710	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Mbi522	A (132)	0,7690	1,0000	0,8460	1,0000	0,8460
	B (134)	0,2310	0,0000	0,1540	0,0000	0,1540
<i>Ho</i>		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>He</i>		0,3550	0,0000	0,2780	0,0000	0,2600
<i>Hn</i>		0,3690	0,0000	0,2900	0,0000	0,2710
T3-32	A (96)	0,4620	0,2860	0,5000	0,1670	0,0770
	B (94)	0,4230	0,3570	0,4620	0,4170	0,4230
	C (98)	0,1150	0,3210	0,0380	0,4170	0,3080
	D (84)	0,0000	0,0360	0,0000	0,0000	0,1920
<i>Ho</i>		0,5380	0,5710	0,2500	0,5000	0,9230
<i>He</i>		0,5950	0,6810	0,5380	0,6250	0,6830
<i>Hn</i>		0,6180	0,7060	0,5620	0,6820	0,7110
T4-171	A (104)	0,3850	0,1070	0,1670	0,1920	0,0000
	B (106)	0,0000	0,2140	0,0420	0,0000	0,1670
	C (108)	0,1540	0,2500	0,2080	0,5000	0,1670
	E (110)	0,0000	0,0000	0,0420	0,0000	0,0000
	F (112)	0,1920	0,2860	0,5000	0,2310	0,5000
	G (105)	0,2690	0,1430	0,0420	0,0770	0,1670
<i>Ho</i>		0,6150	0,6430	0,5000	1,0000	0,4620
<i>He</i>		0,7190	0,7780	0,6740	0,6670	0,6540
<i>Hn</i>		0,7480	0,8070	0,7030	0,7270	0,6800

Tabela 10. Genótipos encontrados por loco analisado de *P. mulata*. N = número total de indivíduos analisados por localidade.

Loco	Genótipo	Localidades				
		Cac (N=13)	Poc (N=14)	Cba (N=12)	Sal (N=6)	Cgd (N=13)
Mbi28	AA	13	14	12	6	13
Mbi32	AA	13	14	12	6	13
Mbi215	AA	13	14	12	6	13
Mbi218	AA	13	14	12	6	13
Mbi201	AA	13	14	10	6	12
	AB			2		1
Mbi278	AA	9	14	12	6	13
	AB	4				
Mbi522	AA	10	14	10	6	11
	BB	3		2		2
T3-32	AA	3	2	5		
	AB	4	4	2	2	1
	AC	2	1			1
	AD		1			
	BB	3	2	4	1	
	BC	1	2	1	1	5
	BD					5
	CC		2		2	1
T4-171	AA	3	1	1		1
	AC	1	1			2
	AF	1		1		1
	AG	2		1		
	BB		1			
	BC			1		
	BF		5		2	
	CC	1	2	1		5
	CF	1	1	2	2	1
	EF			1		
	FF			4		1
	FG	3	2		2	2
	GG	1	1			

Diversidade gênica

Cada uma das cinco populações estudadas apresentou valor de *A* (número de alelos médio por loco) em torno de 2,0. Apesar desta homogeneidade no valor de *A*, observou-se diferença entre as porcentagens de locos polimórficos (*PLP*) por população tendo sido a maior em **Cac** (50,0), e as menores **Poc** e **Sal** (25,0). Nenhuma população apresentou diferença em *PLP* dependendo do critério utilizado, 95 ou 99% (Tabela 11).

A maior taxa de heterozigose (*He*) foi observada em **Cac** e a menor em **Sal**, o que pode ser atribuído ao baixo número amostral da última. A taxa de heterozigose observada (*Ho*) foi a menor entre as três calculadas, excetuando **Sal**. A taxa de heterozigose não tendenciosa (*Hn*) de Nei (1978) se aproximou dos valores da taxa de heterozigose esperada (*He*) de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Verificamos também que o erro padrão das taxas de heterozigose é alto, em torno de 50% do valor estimado, o que pode estar relacionado com baixa porcentagem de locos polimórficos estudados.

Tabela 11. Resumo da variação genética para cada população de *P. mulata*. **N**: número amostral médio, **A**: número médio de alelos por locos. **PLP**: porcentagem de locos polimórficos (número entre parêntesis: erro padrão).

	Cac	Poc	Cba	Sal	Cgd
N	13 (0,0)	14 (0,0)	12 (0,0)	6 (0,0)	13 (0,0)
A	1,9 (0,4)	1,9 (0,6)	2,1 (0,6)	1,6 (0,4)	1,9 (0,5)
PLP (95%)	50,00	25,00	50,00	25,00	37,50
PLP (99%)	50,00	25,00	50,00	25,00	37,50
Ho média	0,183 (0,094)	0,152 (0,100)	0,115 (0,065)	0,188 (0,132)	0,173 (0,121)
He média	0,241 (0,103)	0,182 (0,120)	0,205 (0,095)	0,161 (0,106)	0,200 (0,107)
Hn média	0,251 (0,108)	0,189 (0,124)	0,214 (0,099)	0,176 (0,115)	0,208 (0,111)

Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Quando todas as populações foram consideradas como uma única, o valor de χ^2 foi de 68,9, com 26 graus de liberdade, o que forneceu um $P = 0,0000$. Portanto, as cinco populações não se comportam como uma única população panmítica, não estando em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Estudando as populações separadamente, apenas **Sal** apresentou $P > 0,05$ (Tabela 12).

Para verificar se o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg das populações de *P. mulata* está relacionado com excesso ou deficiência de heterozigotos, foi realizado o teste “U” (Rousset e Raymond, 1995), em que a hipótese alternativa (H1) é: déficit de heterozigotos para $P < 0,05$. Observamos deficiência de heterozigotos na população **Poc** para os locos T3-32 e T4-171 e ainda, para todas as populações, para as quais foi possível calcular o valor de P , em relação ao loco Mbi522 (Tabela 13).

Tabela 12. Teste de probabilidade para a verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos locos e populações. G.l.: Graus de liberdade. (Erro padrão entre parêntesis).

Loco	Cac	Poc	Cba	Sal	Cgd	χ^2	g.l.	P
Mbi201	-	-	1,0000 (0,0000)	-	-			
Mbi278	1,0000 (0,0000)	-	-	-	-			
Mbi522	0,0012* (0,0000)	-	0,0052* (0,0000)	-	0,0052* (0,0000)	34,4	6	0,0000*
T3-32	0,6851 (0,0000)	0,2875 (0,0000)	0,8930 (0,0000)	0,3074 (0,0000)	0,0734 (0,0000)	15,7	10	0,1096
T4-171	0,3378 (0,0000)	0,1650 (0,0020)	0,3389 (0,0015)	0,5844 (0,0000)	0,0723 (0,0000)	18,9	10	0,0419*
χ^2	16,3	10,7	17,5	3,4	21,0			
g.l.	8	4	8	4	6			
P	0,0382*	0,0301*	0,0252*	0,4880	0,0018*			

* $P < 0,05$

Tabela 13. Teste para verificação de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg por deficiência de heterozigotos (Rousset e Raymond, 1995). (Erro padrão entre parêntesis).

Loco	Cac	Poc	Cba	Sal	Cgd
Mbi201	-	-	1,0000 (0,0000)	-	-
Mbi278	1,0000 (0,0000)	-	-	-	-
Mbi522	0,0012* (0,0000)	-	0,0052* (0,0000)	-	0,0052* (0,0000)
T3-32	0,3709 (0,0000)	0,0418* (0,0000)	0,0577 (0,0000)	0,2958 (0,0000)	0,9469 (0,0000)
T4-171	0,1452 (0,0000)	0,0182* (0,0002)	0,0852 (0,0008)	1,0000 (0,0000)	0,0917 (0,0000)

* $P < 0,05$

Desequilíbrio de Ligação

Testes exatos de desequilíbrio de ligação foram realizados para os pares de locos de todas populações. Verificou-se que todos os pares de locos em todas populações apresentaram $P > 0,05$, o que significa que todos estes são herdados de modo independente em cada população (Tabela 14). O teste exato (Método de Fisher) foi realizado para os pares de locos para todas as populações com se fossem uma única. Verificamos que esses são herdados de modo independente visto que os valores de P foram maiores que 0,05 para todos pares de locos (Tabela 15).

Tabela 14. Valores de P para verificação de desequilíbrio de ligação entre pares de locos em cada população. Valores entre parêntesis: erro padrão.

Pares de locos	Cac	Poc	Cba	Sal	Cgd
Mbi201 / Mbi278	-	-	0,1536 (0,0002)	-	-
Mbi201 / Mbi522	-	-	0,2948 (0,0002)	-	1,0000 (0,0000)
Mbi278 / Mbi522	0,4965 (0,0002)	-	1,0000 (0,0000)	-	-
Mbi201 / T3-32	-	-	1,0000 (0,0000)	-	1,0000 (0,0000)
Mbi278 / T3-32	0,4378 (0,0004)	-	1,0000 (0,0000)	-	-
Mbi522 / T3-32	0,3076 (0,0004)	-	1,0000 (0,0000)	-	0,6807 (0,0005)
Mbi201 / T4-171	-	-	1,0000 (0,0000)	-	0,3077 (0,0006)
Mbi278 / T4-171	0,5468 (0,0007)	-	0,5391 (0,0009)	-	-
Mbi522 / T4-171	0,4650 (0,0006)	-	1,0000 (0,0000)	-	1,0000 (0,0000)
T3-32 / T4-171	0,3109 (0,0014)	0,6482 (0,0020)	0,4758 (0,0015)	1,0000 (0,0000)	0,6151 (0,0016)

(-) Locos com apenas um alelo.

Tabela 15. Valores de P para cada par de locos para todas populações para teste de verificação de desequilíbrio de ligação (Método de Fisher). G.l.: graus de liberdade.

Pares de locos	χ^2	g.l.	P
Mbi201 / Mbi278	3,747	2	0,15359
Mbi201 / Mbi522	2,443	4	0,65487
Mbi278 / Mbi522	1,400	4	0,84416
Mbi201 / T3-32	0,000	4	1,00000
Mbi278 / T3-32	1,652	4	0,79942
Mbi522 / T3-32	3,127	6	0,79277
Mbi201 / T4-171	3,902	4	0,41940
Mbi278 / T4-171	2,443	4	0,65487
Mbi522 / T4-171	1,531	6	0,95739
T3-32 / T4-171	5,661	10	0,84293

Diferenciação populacional

Os valores da estimativa de diferenciação populacional F_{ST} foram diferentes de zero, o que indica que há estruturação entre as populações (Tabela 16). Porém os valores foram baixos, de 0,0188 a 0,0851, mostrando que a baixa variabilidade encontrada nos locos estudados incorre em estruturação apenas discreta, pois a probabilidade de que dois alelos retirados ao acaso de sub-populações sejam idênticos é alta.

Tabela 16. Estimativa de F_{ST} , entre pares de populações estudadas de *P. mulata*.

	Cac	Poc	Cba	Sal	Cgd
Cac					
Poc	0,0592				
Cba	0,0188	0,0349			
Sal	0,0851	0,0392	0,0309		
Cgd	0,0738	0,0294	0,0779	0,0413	

Foram realizados testes para verificação de diferenciação populacional já que esta não se comporta como uma população panmítica. A hipótese nula foi: “a distribuição alélica é idêntica entre as populações”.

Quando o teste foi realizado com todas as populações como uma única, obtivemos χ^2 de 43,02684 com 10 graus de liberdade, o que forneceu $P = 0,0000$. Assim, a hipótese nula foi rejeitada apesar do loco Mbi201 ter apresentado $P > 0,05$ (Tabela 17).

Alguns pares de populações diferiram quanto à distribuição dos alelos dos locos Mbi278, Mbi522, T3-32 e T4-171, pois apresentaram valores de $P < 0,05$ (Tabela 18). Entretanto, quando os pares de populações foram testados com todos os locos

analisados em conjunto, os pares que apresentaram valores de $P < 0,05$, ou seja, que diferiram quanto à distribuição alélica foram: **Cba/Poc; Cac/Poc; Sal/Cac; Cgd/Poc; Cgd/Cba e Cgd/Cac** (Tabela 19).

Tabela 17. Valores de P resultantes de teste de diferenciação alélica para cada loco. Valores entre parêntesis: erro padrão.

Loco	P
Mbi201	0,4082 (0,0037)
Mbi278	0,0307* (0,0016)
Mbi522	0,0341* (0,0018)
T3-32	0,0012* (0,0006)
T4-171	0,0009* (0,0004)

* $P < 0,05$.

Tabela 18. Valores de *P* resultantes do teste de diferenciação alélica por loco para cada par de populações de *P. mulata*. Valores entre parêntesis: erro padrão.

<i>Locos</i>	Cba/Poc	Cac/Poc	Cac/Cba	Sal/Poc	Sal/Cba	Sal/Cac	Sal/Cgd	Cgd/Poc	Cgd/Cba	<i>Cgd/Cac</i>
Mbi201	0,22491 (0,00198)	-	0,48987 (0,00155)	-	1,00000 (0,00000)	-	1,00000 (0,00000)	0,47919 (0,00183)	1,00000 (0,00000)	1,00000 (0,00000)
Mbi278	0,48640 (0,00179)	0,04803* (0,00119)	0,35143 (0,00197)	-	1,00000 (0,00000)	0,28789 (0,00218)	-	-	1,00000 (0,00000)	0,11241 (0,00178)
Mbi522	0,04738* (0,00116)	0,00943* (0,00062)	0,72954 (0,00197)	-	0,28501 (0,00229)	0,15050 (0,00190)	0,28857 (0,00201)	0,04789* (0,00125)	1,00000 (0,00000)	0,72332 (0,00167)
T3-32	0,02168* (0,00195)	0,15750 (0,00467)	0,70448 (0,00272)	0,82130 (0,00314)	0,00783* (0,00062)	0,06194 (0,00202)	0,39640 (0,00443)	0,10164 (0,00304)	0,00013* (0,00008)	0,00245* (0,00050)
T4-171	0,26865 (0,00596)	0,01524* (0,00133)	0,01195* (0,00135)	0,76022 (0,00359)	0,52426 (0,00565)	0,00937* (0,00095)	0,01550* (0,00113)	0,05173 (0,00244)	0,05159 (0,00314)	0,02722* (0,00162)

• **P < 0,05**

•

• .

Tabela 19. Teste de diferenciação alélica para cada par de populações envolvendo todos os locos. (g.l.): graus de liberdade.

Par de populações	χ^2	g.l.	<i>P</i>
Cba/Poc	20,816	10	0,0224*
Cac/Poc	27,464	8	0,0006*
Cac/Cba	13,704	10	0,1869
Sal/Poc	0,942	4	0,9184
Sal/Cba	13,502	10	0,1969
Sal/Cac	21,182	8	0,0067*
Sal/Cgd	12,670	8	0,1237
Cgd/Poc	18,045	8	0,0209*
Cgd/Cba	23,825	10	0,0081*
Cgd/Cac	24,250	10	0,0069*

* $P < 0,05$

Ainda com objetivo de verificar o nível de diferenciação populacional, foram realizados testes de diferenciação genotípica em que a hipótese nula era: “a distribuição genotípica é idêntica entre as populações”.

Observando a tabela 20 verificamos que genótipos dos locos Mbi201 e Mbi522 estão distribuídos de forma idêntica entre as populações visto que apresentaram valores de $P > 0,05$. Ainda foram realizados cálculos considerando pares de populações por loco estudado. Observamos diferenciação genotípica entre alguns pares de populações para os locos Mbi278, T3-32 e T4-171 visto que apresentaram $P < 0,05$ (Tabela 21).

Quando consideramos todos os locos juntos, os pares de populações que se mostraram distintas quanto à distribuição dos genótipos foram **Cac/Poc; Sal/Cba; Sal/Cac; Cgd/Cba** (Tabela 22).

Tabela 20. Teste de diferenciação genotípica para cada loco estudado de *P. mulata*.

Locos	<i>P</i>
Mbi201	0,3098 (0,0004)
Mbi278	0,0253* (0,0002)
Mbi522	0,2596 (0,0004)
T3-32	0,0032* (0,0001)
T4-171	0,0110 * (0,0002)

* $P < 0,05$.

Tabela 21. Valores de *P* resultantes do teste de diferenciação genotípica por loco para cada par de populações de *P. mulata*. Valores entre parêntesis: erro padrão.

<i>Locos</i>	Cba/Poc	Cac/Poc	Cac/Cba	Sal/Poc	Sal/Cba	Sal/Cac	Sal/Cgd	Cgd/Poc	Cgd/Cba	Cgd/Cac
Mbi201	0,22221 (0,00020)	-	0,48012 (0,00017)	-	0,54375 (0,00014)	-	1,00000 (0,00000)	0,48161 (0,00016)	1,00000 (0,00000)	1,00000 (0,00000)
Mbi278	0,48131 (0,00016)	0,04077* (0,00011)	0,32222 (0,00023)	-	1,00000 (0,00000)	0,25533 (0,00020)	-	-	1,00000 (0,00000)	0,09574 (0,00016)
Mbi522	0,22202 (0,00020)	0,09788 (0,00016)	1,00000 (0,00000)	-	0,54400 (0,00014)	0,31596 (0,00021)	0,54387 (0,00014)	0,22202 (0,00021)	1,00000 (0,00000)	1,00000 (0,00000)
T3-32	0,06002 (0,00025)	0,24267 (0,00048)	0,72845 (0,00031)	0,86441 (0,00027)	0,04122* (0,00016)	0,14257 (0,00030)	0,24559 (0,00042)	0,11260 (0,00032)	0,00058* (0,00002)	0,00112* (0,00003)
T4-171	0,43417 (0,00065)	0,03293* (0,00020)	0,02723* (0,00019)	0,71719 (0,00043)	0,51432 (0,00053)	0,01353* (0,00011)	0,02772* (0,00018)	0,09756 (0,00037)	0,13501 (0,00041)	0,05589 (0,00027)

* $P < 0,05$.

Tabela 22. Teste de diferenciação genotípica para cada par de populações envolvendo todos os locos. (g.l.): Graus de Liberdade.

Par de populações	χ^2	g.l.	P
Cba/Poc	14,776	10	0,1404
Cac/Poc	20,706	8	0,0080*
Cac/Cba	11,573	10	0,3146
Sal/Poc	13,494	8	0,0959
Sal/Cba	18,910	10	0,0414*
Sal/Cac	24,050	10	0,0074*
Sal/Cgd	0,956	4	0,9163
Cgd/Poc	10,144	10	0,4280
Cgd/Cba	17,536	8	0,0250*
Cgd/Cac	11,197	8	0,1907

* $P < 0,05$.

Distância genética entre populações

Para melhor avaliar a diferenciação entre as populações, a distância genética “Chord” de Cavalli-Sforza e Edwards (1967) foi calculada para cada par destas (Tabela 23). Os valores da distância “Chord” (Tabela 23) foram utilizados para a construção de fenograma baseado no método de Evolução Mínima (Figura 11).

Tabela 23. Valores de distância genética entre os pares de populações de *P. mulata* de acordo com Cavalli-Sforza e Edwards (1967).

População	Cac	Poc	Cba	Sal	Cgd
Cac	-				
Poc	0,2070	-			
Cba	0,1580	0,1610	-		
Sal	0,2470	0,1110	0,1950	-	
Cgd	0,1970	0,1840	0,1890	0,2130	-

O fenograma obtido pela distância “Chord” apresenta uma maior proximidade entre as populações **Sal/Poc**, **Cba/Cac**. A população **Cgd** aparece isolada num outro ramo, porém mais próxima do segundo par de populações citado. O teste de Mantel mostrou que não há relação entre as distâncias genéticas, tanto “Chord” ($P= 0,8086$) quanto F_{ST} ($P = 0,8903$), e as distâncias geográficas entre as populações.

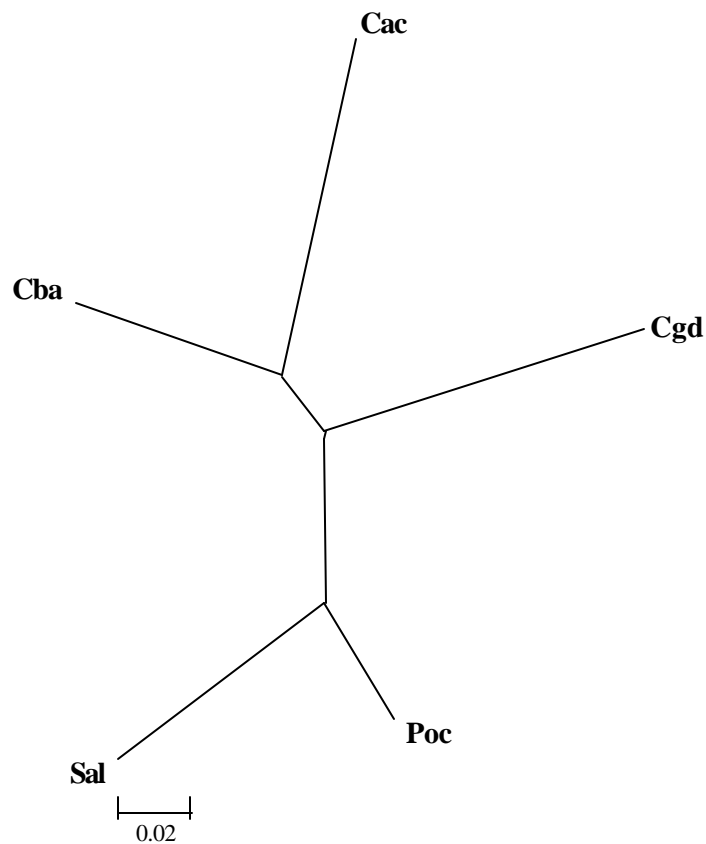


Figura 11. Fenograma obtido pelo método de Evolução Mínima a partir dos valores de distância genética obtidos de acordo com Cavalli-Sforza e Edwards (1967) relacionando as cinco populações de *P. mulata*: **Poc**, **Cba**, **Cac**, **Sal** e **Cgd**.

4.2.2. *Partamona helleri*

4.2.2.1. PCR+RFLP do DNAm

Descrição e frequências de haplótipos mitocondriais

Para *P. helleri*, foram amostrados ninhos de cinco populações: **SC** (N=10); **SP** (N=13); **MG** (N=12); **ES** (N=9); **BA** (N=3). Os mesmos fragmentos de DNAm estudados para *P. mulata* foram analisados: COI-IIF/mtD18; mtD19/Seq11; mtD26/mtD30 e 5612R/tPheF, cujos tamanhos foram 900; 1.100; 1.800 e 1.200 pb, respectivamente para todas as colônias. Tais fragmentos foram digeridos com enzimas de restrição tal como descrito na tabela 2.

No total foram amostrados 28 sítios de restrição. Tal como em *P. mulata*, os sítios de restrição *Dra* I só puderam ser mapeados para o fragmento COI-IIF/mtD18, por seqüenciamento. Analisamos os perfis de digestão, designados por letras, e codificamos as bandas observadas (Figuras 12 e 13). Os tamanhos dos fragmentos gerados podem ser vistos na tabela 24. Haplótipos compostos foram elaborados a partir da justaposição dessas letras (Tabela 25).

Foram obtidos dez haplótipos distintos para *P. helleri* (Tabela 25 e Figura 14). A população **SP** foi a que apresentou maior número de haplótipos distintos, cinco, enquanto que **MG** apresentou três e as outras apenas dois cada uma. O haplótipo mais freqüente em *P. helleri* foi H06 o qual ocorreu em 23% das colônias estudadas. Os menos freqüentes foram H04 e H10, ocorrendo em apenas uma colônia cada. Haplótipos exclusivos foram observados nesta espécie: três em SP (H01, H08, H10); um em MG (H09); um em SC (H05) e dois em BA (H03 e H04). A população SP foi aquela que

apresentou o maior número de haplótipos distintos tendo compartilhado dois com ES (H02 e H07) e com MG (H02). A população BA foi a única que não compartilhou haplótipos (Figura 14).

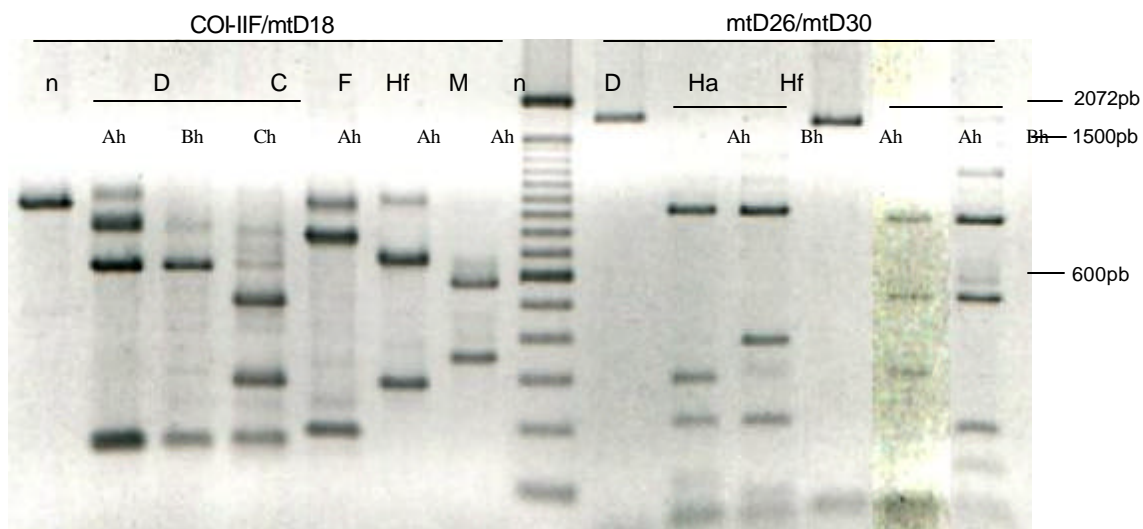


Figura 12. Fracionamento em gel de agarose 2% contendo os perfis de digestão dos fragmentos COI-IIF/mtD18 e mtD26/mtD30 de *P. helleri*. As enzimas usadas para digestão dos fragmentos estão discriminadas por raia: D: *Dra* I; C: *Cla* I; F: *Fba* I; Ha: *Hae* III; Hf: *Hinf* I. Os perfis de digestão observados foram denominados por letras (Ah, Bh ou Ch). n: Fragmento não digerido. M: marcador de peso molecular 100 pb *ladder*. Os tamanhos das bandas marcadoras mais fortes estão descritos à direita do gel.

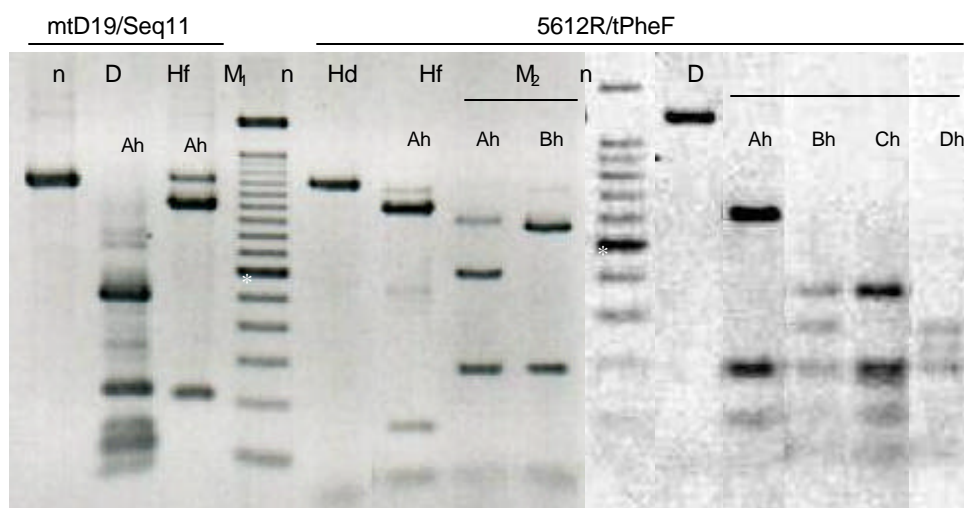


Figura 13. Fracionamento em gel de agarose 2% contendo os perfis de digestão dos fragmentos mtD19/Seq11 e 5612R/tPheF de *P. helleri*. As enzimas usadas para digestão dos fragmentos estão discriminadas por raia: D: *Dra* I; Hd: *Hind* III; Hf: *Hinf* I. Os perfis de digestão observados foram denominados por letras (Ah, Bh, Ch, Dh). n: Fragmento não digerido. M: marcador de peso molecular 100 pb *ladder*. Tamanho das bandas marcadas com asterisco em pares de bases: M₁: 600 e M₂: 500.

Tabela 24. Fragmentos obtidos, em pares de bases, por meio de PCR+RFLP de fragmentos mitocondriais de *P. helleri*, codificados como presença (1) ou ausência (0) entre diferentes padrões. Enzimas usadas: **I** - *Dra* I; **II** - *Hinf* I; **III** - *Cla* I; *Fba* I; *Hae* III; *Hind* III. (Frag.: Fragmentos).

COHIF/mtD18 <i>Dra</i> I				mtD26/mtD30 <i>Dra</i> I			mtD19/Seq11 <i>Dra</i> I		5612R/tPheF <i>Dra</i> I				
Frag.*	Ah	Bh	Ch	Frag.	Ah	Bh	Frag.	Ah	Frag.	Ah	Bh	Ch	Dh
753	1	0	0						650	1	0	0	0
616	1	1	0	900	1	1	500	1	380	0	1	0	1
336	0	0	1	400	0	1	200	1	280	0	1	1	0
224	0	0	1	300	1	0	150	1	250	0	0	1	0
178	1	1	1	200	1	1	100	1	200	1	1	1	1
137	0	0	1	100	1	1			100	1	1	1	1
56	0	0	1						50	1	1	1	1

* Tamanhos observados pelo seqüenciamento.

II

COHIF/mtD18 <i>Hinf</i> I		mtD26/mtD30 <i>Hinf</i> I			mtD19/Seq11 <i>Hinf</i> I		5612R/tPheF <i>Hinf</i> I		
Frag.*	Ah	Frag.	Ah	Bh	Frag.	Ah	Frag.	Ah	Bh
566	1	900	1	1			900	0	1
331	1	520	1	1	1000	1	650	1	0
31	1	300	1	0	200	1	300	1	1
		180	0	1					

* Tamanhos observados pelo seqüenciamento.

III

COHIF/mtD18 <i>Cla</i> I		COHIF/mtD18 <i>Fba</i> I		mtD26/mtD30 <i>Hae</i> III		5612R/tPheF <i>Hind</i> III	
Frag.*	Ah	Frag.	Ah	Frag.	Ah	Frag.	Ah
745	1	650	1	1800	1	1050	1
182	1	280	1			150	1

* Tamanhos observados pelo seqüenciamento.

Tabela 25. Haplótipos mitocondriais de *P. helleri* obtidos pela composição de perfis de digestão de fragmentos amplificados.

Haplótipo	COI-IIIF / mtD18				mtD26 / mtD30			mtD19 / Seq 11		5612R / tPheF		
	<i>Dra</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Fba</i> I	<i>Cla</i> I	<i>Dra</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Dra</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Dra</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Hind</i> III
H 01	B	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A
H 02	C	A	A	A	A	A	A	A	A	C	A	A
H 03	C	A	A	A	B	A	A	A	A	B	B	A
H 04	C	A	A	A	B	B	A	A	A	B	B	A
H 05	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A
H 06	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
H 07	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A
H 08	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	A	A
H 09	A	A	A	A	A	A	A	A	A	D	A	A
H 10	B	A	A	A	A	A	A	A	A	C	A	A

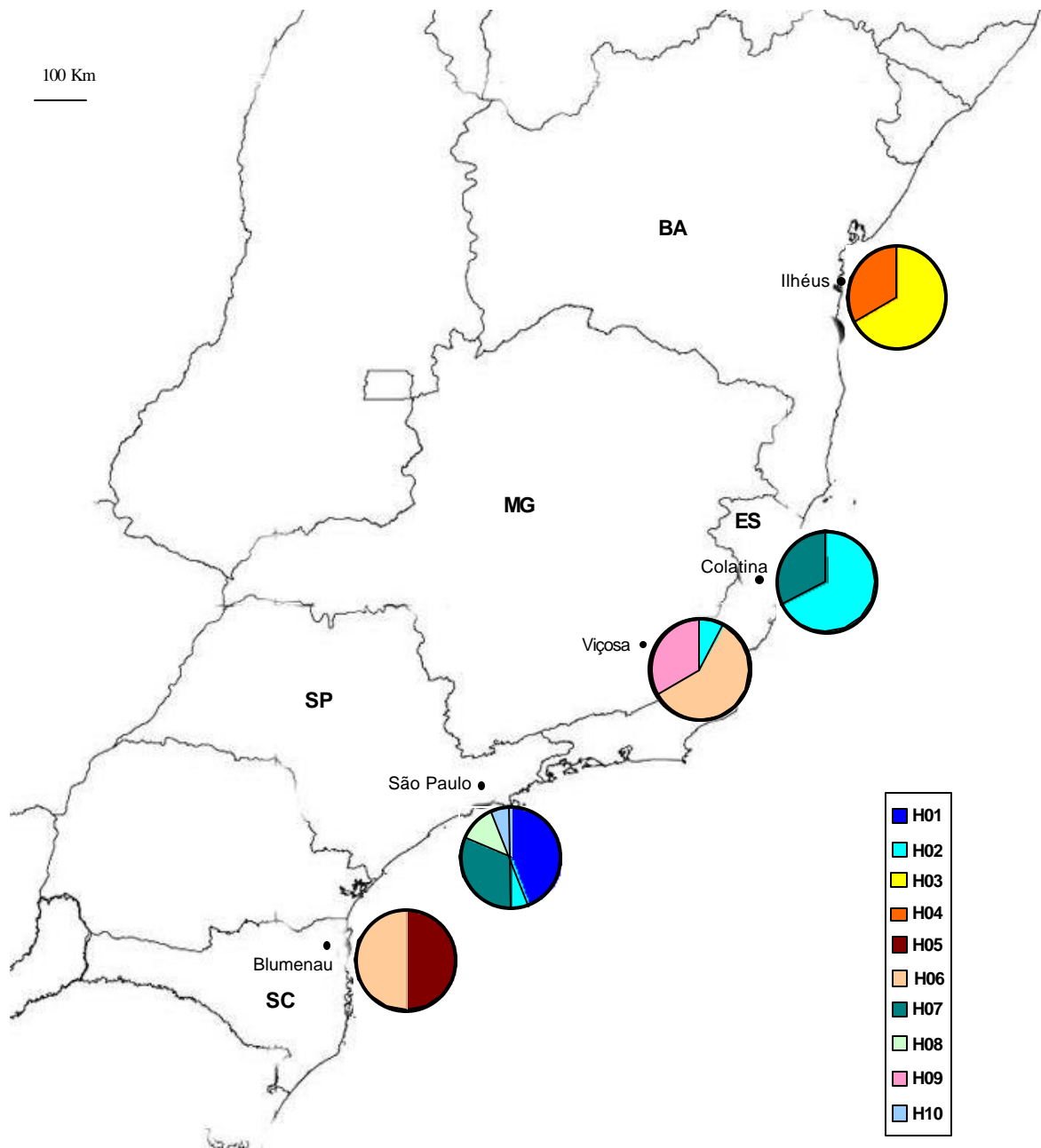


Figura 14. Mapa parcial da costa do Brasil apresentando a distribuição dos haplótipos mitocondriais de *P. helleri*, em proporção, em seus locais de coleta. Na legenda cada cor representa um dos haplótipos referidos na tabela 25.

Divergência de seqüência, diversidade haplotípica e nucleotídica

Os haplótipos encontrados em *P. helleri* diferem entre si pela presença ou ausência de uma a cinco bandas nos padrões de restrição, de modo que os valores de divergência de seqüência de nucleotídeos entre pares de haplótipos (d), estimados com base na análise intra-específica de presença/ausência de bandas, variaram de 0,19 a 1,54% (Tabela 26). Entre haplótipos de populações diferentes a estimativa d variou de 0,10 a 1,20%.

Tabela 26. Porcentagem de divergência de seqüência de nucleotídeos entre pares de haplótipos de *P. helleri* (d) (abaixo da diagonal) e erro padrão (acima da diagonal).

	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10
H01		0,56	0,88	1,09	0,93	0,60	0,38	0,53	0,47	0,38
H02	0,47		0,66	0,92	0,99	0,71	0,56	0,66	0,62	0,66
H03	0,88	0,35		0,67	1,18	0,99	0,88	0,94	0,92	0,94
H04	1,18	0,65	0,27		0,96	1,18	1,09	1,14	1,13	1,14
H05	0,80	1,08	1,54	1,19		0,71	0,85	0,85	0,81	0,93
H06	0,51	0,80	1,23	1,54	0,31		0,47	0,47	0,39	0,60
H07	0,19	0,47	0,87	1,18	0,59	0,29		0,38	0,27	0,53
H08	0,39	0,68	1,09	1,40	0,59	0,29	0,19		0,47	0,38
H09	0,29	0,58	1,00	1,31	0,50	0,20	0,09	0,29		0,60
H10	0,19	0,68	1,09	1,40	0,80	0,51	0,39	0,19	0,51	

Os índices de diversidade haplotípica (h) calculados para cada população, indicam haver variabilidade genética intrapopulacional com média de 0,55. A média do índice de diversidade nucleotídica (0,0021) indica que os diferentes haplótipos são pouco divergentes entre si (Tabela 27). A inter-relação entre os haplótipos pode ser vista no fenograma obtido pelo método de “Evolução Mínima” utilizando-se os valores de (d), o qual ilustra as possíveis distâncias genéticas entre os haplótipos de *P. helleri* (Figura 15). Uma rede de inter-relações entre haplótipos foi também obtida pelo método de “Reduced Media” (Bandelt *et al.*, 1999) combinado com “Media Joining” (Forster *et al.*, 2001) (Figura 16).

Tabela 27. Número de haplótipos encontrados e valores de diversidade haplotípica (h) *non-selfing* e nucleotídica (π) para cada uma das populações de *P. helleri*.

População	Nº de haplótipos	h	p
SC	2	0,5263 (0,0363)	0,0017
SP	5	0,6769 (0,0835)	0,0023
MG	3	0,5652 (0,0711)	0,0025
ES	2	0,4706 (0,0823)	0,0023
BA	2	0,5333 (0,1721)	0,0018
Média	2,8	0,5545 (0,0012)	0,0021 (0,0000)

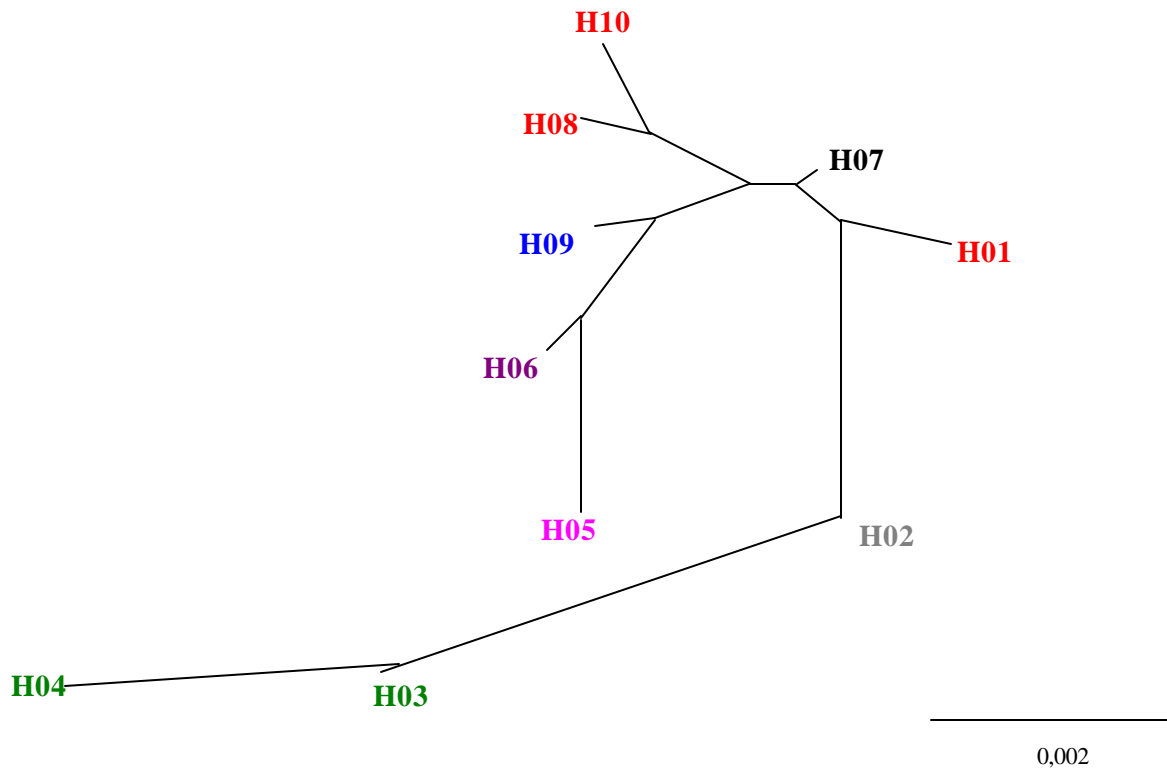


Figura 15. Fenograma obtido pelo método de Evolução Mínima a partir de d , relacionando todos os haplótipos obtidos nas cinco populações de *Partamona helleri*. Haplótipos na cor **rosa**: Santa Catarina; **vermelho**: São Paulo; **azul**: Minas Gerais; **verde**: Bahia. **Cinza**: MG, ES, SP; **violeta**: MG e SC; **preto**: SP, ES.

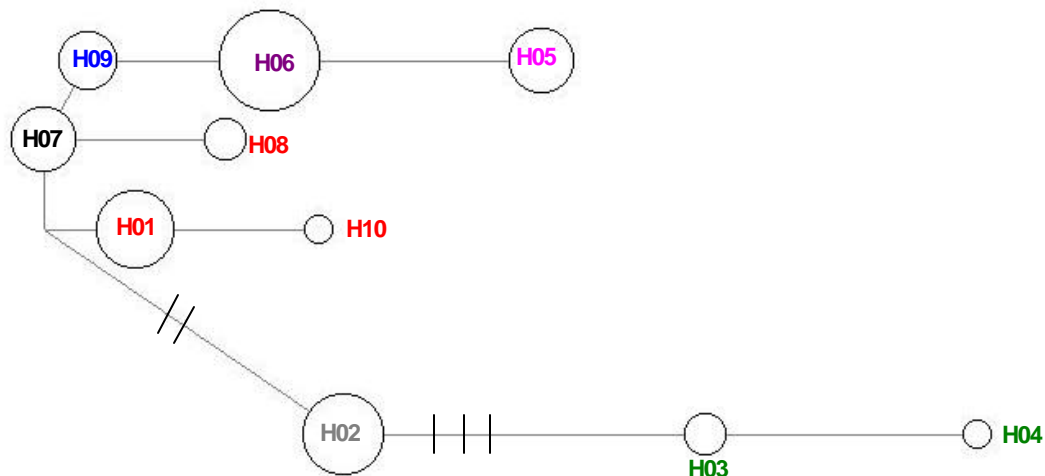


Figura 16. Rede de inter-relações entre haplótipos de *P. helleri*. Ramos lisos indicam um sítio diferente entre haplótipos. Barras indicam número de diferenças entre os padrões de bandas observados. Haplótipos na cor **rosa**: SC; **vermelho**: SP; **azul**: MG; **verde**: BA; **cinza**: MG, ES e SP; **violeta**: MG e SC; **preto**: SP e ES.

Estruturação populacional

Os valores obtidos para o índice de divergência de seqüência de nucleotídeos (δ) mostram que as populações mais próximas são MG/SC, enquanto que as mais distantes são BA/SC. O mesmo pode ser verificado quando se analisa as distâncias genéticas comparando esses dados com base em (δ) (Tabela 28) e no F_{ST} (Tabela 29) o que podemos observar nos fenogramas de mesma topologia pelo método de “Evolução Mínima” (Figura 17). Os valores de F_{ST} foram significativos para todos os pares de populações, pois o valor de P foi $< 0,05$ para as comparações realizadas. Isso significa que há estruturação entre as populações, porém esta seria muito discreta devido aos baixos valores estimados variando de 0,3173 a 0,8714 (Tabela 29).

Tabela 28. Valores de divergência de seqüência de nucleotídeos (δ) entre pares de populações estudadas de *P. helleri*.

	SC	SP	MG	ES	BA
SC					
SP	0,0041				
MG	0,0010	0,0017			
ES	0,0057	0,0015	0,0031		
BA	0,0120	0,0078	0,0099	0,0042	

Tabela 29. Valores de estimativa de F_{ST} (abaixo da diagonal) e de P (acima da diagonal) com erro padrão entre parêntesis, entre pares de populações estudadas de *P. helleri*.

	SC	SP	MG	ES	BA
SC	-	0,0000* (0,0000)	0,0000* (0,0000)	0,0000* (0,0000)	0,0000* (0,0000)
SP	0,6464	-	0,0000* (0,0000)	0,0000* (0,0000)	0,0090* (0,0091)
MG	0,3173	0,4483	-	0,0000* (0,0000)	0,0180* (0,0121)
ES	0,7365	0,4037	0,5730	-	0,0000* (0,0000)
BA	0,8714	0,7665	0,8220	0,6447	-

* $P < 0,05$

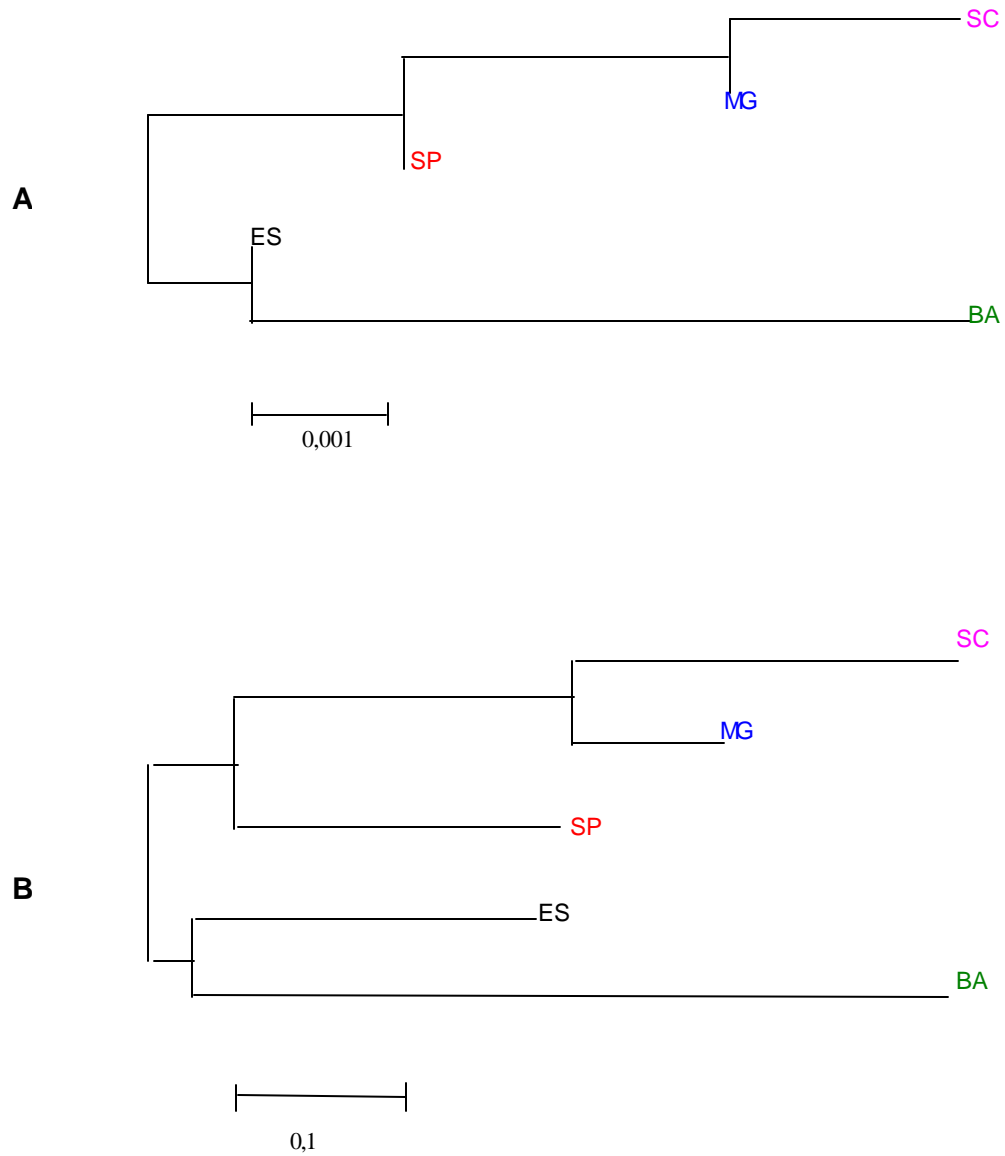


Figura 17. Fenogramas obtidos pelo método de Evolução Mínima relacionando as cinco populações de *P. helleri*, SC, SP, MG, ES, BA. **A:** Fenograma a partir dos valores de δ . **B:** Fenograma a partir dos valores de F_{ST} .

Outro cálculo de diferenciação populacional realizado foi o teste exato baseado nas frequências haplotípicas. Todos os pares se mostraram diferenciados visto que apresentaram valores de $P < 0,05$ (Tabela 30). Essa diferenciação também foi confirmada pela distribuição de Monte Carlo que indicou heterogeneidade significativa das frequências haplotípicas entre os pares de populações ($P = 0,0000$).

Segundo os resultados obtidos pela análise de variância molecular (Tabela 31), 62,30% da variabilidade total do DNAm de *P. helleri* está distribuída entre as populações estudadas. Isto significa que a probabilidade de que dois indivíduos retirados ao acaso da população total sejam correlacionados, não é maior que 62,30%. Isso indica estruturação entre as populações estudadas, o que já poderia ser admitido apenas observando o grande número de haplótipos exclusivos encontrados, sete dos 10 encontrados.

Tabela 30. Valores de P de acordo com o teste exato de diferenciação entre os pares de população de *P. helleri*. (Entre parêntesis: erro padrão).

	SC	SP	MG	ES	BA
SC					
SP	0,0000* (0,0000)				
MG	0,0166* (0,0033)	0,0000* (0,0000)			
ES	0,0000* (0,0000)	0,0012* (0,0010)	0,0000* (0,0001)		
BA	0,0035* (0,0010)	0,0089* (0,0016)	0,0076* (0,0020)	0,0091* (0,0018)	

* $P < 0,05$

Tabela 31. Resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) em *Partamona helleri*. P : probabilidade de se obter um valor de ϕ maior do que o observado.

Componente da variância	Variância	% do total	P	f
Interpopulacional	1,8144	62,30		
Intrapopulacional	1,0980	37,70	0,0000	0,62230

Número de Permutações: 1023; $\alpha = 0,05$

4.2.2.2. MICROSSATÉLITES

Tal como realizado para *P. mulata*, a obtenção de dados de microssatélites para estudo populacional de *P. helleri* se deu com a utilização de um indivíduo por colônia. Foram estudados nove locos para a análise das cinco populações de *P. helleri*, totalizando 47 indivíduos: **SC** (N=10); **SP** (N=13); **MG** (N=12); **ES** (N=9); **BA** (N=3).

Distribuição alélica e genotípica

Quatro locos apresentaram apenas um alelo (Mbi28, Mbi33, Mbi201 e Mbi522), quatro locos apresentaram um segundo alelo (Mbi32, Mbi215, Mbi218 e Mbi278) e apenas um loco apresentou mais alelos, T4-171 com quatro. As figuras 18 a 20 e a tabela 32 apresentam os alelos observados em *P. helleri*. Alelos exclusivos foram observados para o loco Mbi32 (B) e Mbi218 (B) em (MG); T4-171, (D) em SP e alelo E encontrado apenas na população da Bahia (**BA**) (Figuras 18 a 20 e Tabela 32).

As populações que apresentaram os maiores números de genótipos foram as de (**SP**) e (**MG**) com 15 e 14, respectivamente. Ambas apresentaram quatro genótipos heterozigotos. As populações de (**ES**) e (**BA**) apresentaram 12 genótipos cada, com três genótipos heterozigotos. Por fim, a população de (**SC**) que apresentou 12 genótipos com dois em heterozigoze (Tabela 33).

As frequências alélicas e taxas de heterozigoze (H_o = observada, H_e = esperada de acordo com equilíbrio de Hardy-Weinberg, e H_n = não tendenciosa (Nei, 1978) podem ser observadas na tabela 32.

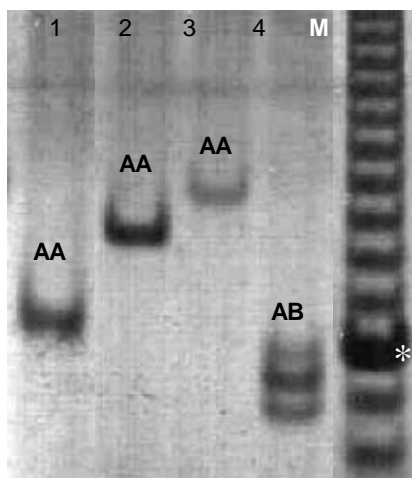
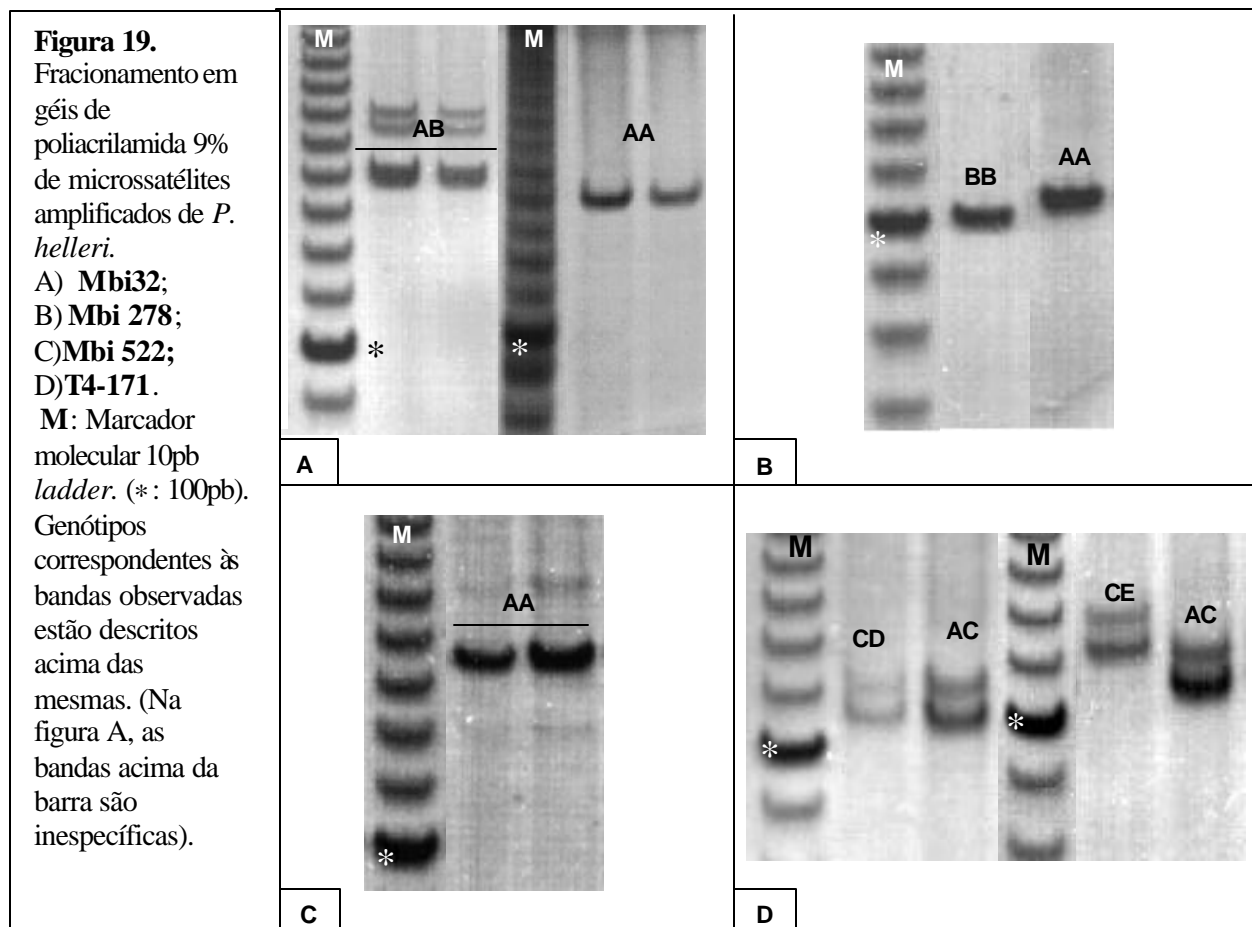


Figura 18. Fracionamento em gel de poliacrilamida 5,6% de microssatélites amplificados de *P. helleri* correspondentes aos locos 1: **Mbi28**, 2: **Mbi201**, 3: **Mbi33**, 4: **Mbi215**. M: Marcador molecular 10pb *ladder* (*100pb). Os genótipos correspondentes às bandas observadas estão descritos acima das mesmas.



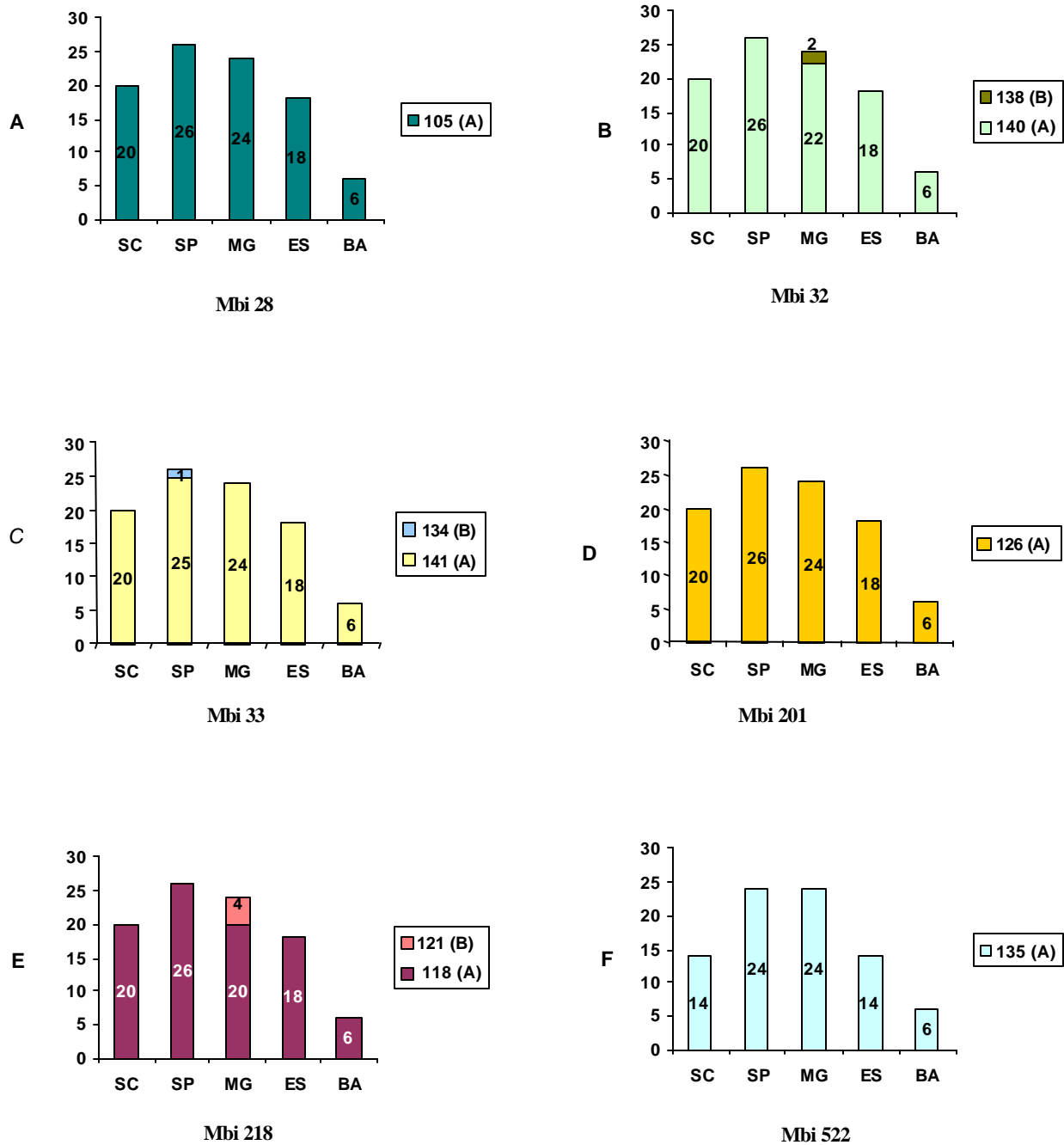
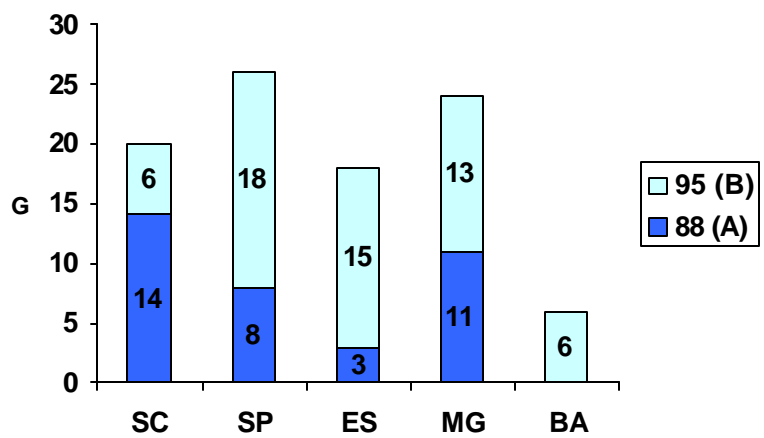
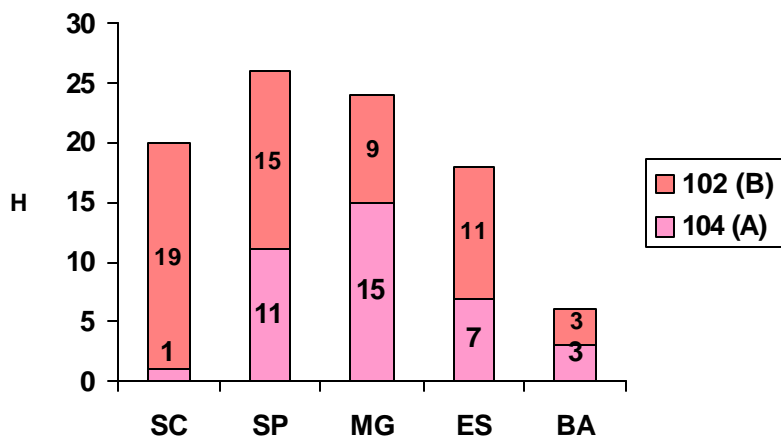


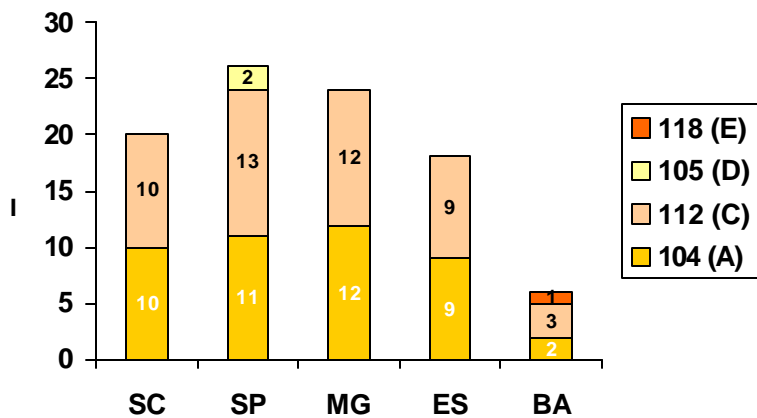
Figura 20. Proporção entre alelos microssatélites encontrados em *P. helleri* nos diferentes locos estudados. Eixo X: locais de coleta (ver Tabela 1). Eixo Y: quantidade de alelos. Locos: A) Mbi 28; B) Mbi 32; C) Mbi 33; D) Mbi 201 E) Mbi 218; F) Mbi 522; G) Mbi 215; H) Mbi 278; I) T4-171.



Mbi 215



Mbi 278



T4 - 171

Figura 20. Continuação.

Tabela 32. Freqüências alélicas e taxas de heterozigose observada (H_o), esperada sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e) e não tendenciosa (H_n) por loco e por par de populações de *Partamona helleri*. (n): número de alelos amostrados por loco e por população.

Locos	Alelos (pb)	SC n=20	SP n=26	MG n=24	ES n=18	BA n=6
Mbi32	A (140)	1,0000	1,0000	0,9167	1,0000	1,0000
	B (138)	0,0000	0,0000	0,0833	0,0000	0,0000
	<i>He</i>	0,0000	0,0000	0,1530	0,0000	0,0000
	<i>Hn</i>	0,0000	0,0000	0,1590	0,0000	0,0000
	<i>Ho</i>	0,0000	0,0000	0,1670	0,0000	0,0000
Mbi33	A (141)	1,0000	0,9615	1,0000	1,0000	1,0000
	B (134)	0,0000	0,0384	0,0000	0,0000	0,0000
	<i>He</i>	0,0000	0,0740	0,0000	0,0000	0,0000
	<i>Hn</i>	0,0000	0,0770	0,0000	0,0000	0,0000
	<i>Ho</i>	0,0000	0,0770	0,0000	0,0000	0,0000
Mbi215	A (95)	0,7000	0,3846	0,4583	0,1667	1,0000
	B (88)	0,3000	0,6154	0,5417	0,8333	0,0000
	<i>He</i>	0,4200	0,4260	0,4970	0,2780	0,0000
	<i>Hn</i>	0,4420	0,4430	0,5180	0,2940	0,0000
	<i>Ho</i>	0,0000	0,4620	0,5830	0,3330	0,0000
Mbi218	A (118)	1,0000	1,0000	0,8333	1,0000	1,0000
	B (121)	0,0000	0,0000	0,1667	0,0000	0,0000
	<i>He</i>	0,0000	0,0000	0,2780	0,0000	0,0000
	<i>Hn</i>	0,0000	0,0000	0,2900	0,0000	0,0000
	<i>Ho</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Mbi278	A (104)	0,0500	0,4231	0,6250	0,3889	0,5000
	B (102)	0,9500	0,5769	0,3750	0,6111	0,5000
	<i>He</i>	0,0950	0,4480	0,4690	0,4750	0,5000
	<i>Hn</i>	0,1000	0,5080	0,4890	0,5030	0,6000
	<i>Ho</i>	0,1000	0,3850	0,7500	0,7780	0,3330
T4-171	A (104)	0,5000	0,4231	0,5000	0,5000	0,3333
	C (112)	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
	D (105)	0,0000	0,0769	0,0000	0,0000	0,0000
	E (118)	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1667
	<i>He</i>	0,4250	0,5650	0,4970	0,4940	0,6110
	<i>Hn</i>	0,5210	0,5880	0,5180	0,5230	0,7330
	<i>Ho</i>	0,9000	1,0000	0,9170	0,8890	1,0000

Tabela 33. Tipos de genótipos encontrados por loco analisado e suas ocorrências entre as populações estudadas. N = número total de indivíduos analisados por localidade.

Loco	Genótipo	Localidades				
		SC (N=10)	SP (N=13)	MG (N=12)	ES (N=9)	BA (N=3)
Mbi28	AA	10	13	12	9	3
Mbi32	AA	10	13	10	9	3
	AB			2		
Mbi33	AA	10	12	12	9	3
	AB		1			
Mbi201	AA	10	13	12	9	3
Mbi215	AA	7	1	2		
	AB		6	7	3	
	BB	3	6	3	6	3
Mbi218	AA	10	13	10	9	3
	BB			2		
Mbi278	AA		3	3		1
	AB	1	5	9	7	1
	BB	9	5		2	1
Mbi522	AA	7	12	12	7	3
	??*	3	1		2	
T4-171	AC	10	11	12	9	2
	CE					1
	CD		2			
Total de genótipos		12	16	14	12	12

* ??: não foi possível genotipar

Diversidade gênica

Cada uma das cinco populações estudadas apresentou valor de *A* (número de alelos médio por loco) em torno de 1,4. Apesar desta homogeneidade no valor de *A*, observou-se diferença entre as porcentagens de locos polimórficos (*PLP*) por população. A maior porcentagem foi observada em **MG** (55,56) e a menor em **BA** (22,22). A baixa porcentagem de locos polimórficos observada na população **BA** pode ser reflexo do baixo número de colônias amostradas (N=3). Apenas a população **SP** apresentou diferença em *PLP* dependendo do critério utilizado, 95 ou 99% (Tabela 34).

A maior taxa de heterozigose (*H*) foi observada em **MG** e a menor em **SC**. A taxa de heterozigose observada (*Ho*) foi a maior entre as três calculadas, exceto para a população **SC**. A taxa de heterozigose não tendenciosa (*Hn*) de Nei (1978) se aproximou dos valores da taxa de heterozigose esperada (*He*) de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 34).

Tabela 34. Resumo da variação genética para cada população de *P. helleri*. **N**: número amostral médio. **A**: número médio de alelos por locos. **PLP**: porcentagem de locos polimórficos. (número entre parêntesis: erro padrão).

	SC	SP	MG	ES	BA
N	9,7 (0,3)	12,9 (0,1)	12,0 (0,0)	8,8 (0,2)	3,0 (0,0)
A	1,33 (0,17)	1,56 (0,24)	1,56 (0,18)	1,33 (0,17)	1,33 (0,24)
PLP (95%)	33,33	33,33	55,56	33,33	22,22
PLP (99%)	33,33	44,44	55,56	33,33	22,22
He média	0,112 (0,066)	0,173 (0,081)	0,210 (0,076)	0,139 (0,072)	0,123 (0,082)
Hn média	0,118 (0,070)	0,179 (0,085)	0,219 (0,079)	0,147 (0,076)	0,148 (0,099)
Ho média	0,111 (0,099)	0,214 (0,115)	0,269 (0,125)	0,222 (0,121)	0,148 (0,113)

Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Quando todas as populações foram consideradas como uma única, o χ^2 (75,4), com 18 graus de liberdade, forneceu um $P = 0,0000$. Assim, concluímos que as cinco populações não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, pois não se comportam como uma única população panmítica. Tal resultado já era esperado visto a grande distância geográfica que separa as populações.

Estudando-se as populações separadamente, apenas **ES** e **BA** apresentaram $P > 0,05$ o que sugere que ambas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 35). No caso da amostra coletada na Bahia, o baixo número de colônias analisadas ($N=3$) não nos permite concluir que esta seja a realidade da população da região. O aumento da amostragem na região é necessário e pode modificar este resultado.

Para verificar se o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg das populações de *P. helleri* está relacionado com excesso ou ausência de heterozigotos, foi realizado o teste “U” (Rousset e Raymond, 1995), em que a hipótese alternativa (H_1) é: déficit de heterozigotos para $P < 0,05$. Observamos deficiência de heterozigotos na população **SC** para o loco Mbi215 e ainda, em **MG** para o loco Mbi218 (Tabela 36).

Tabela 35. Teste de probabilidade para a verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos locos e populações. G.l.: Graus de liberdade.

Loco	SC	SP	MG	ES	BA	χ^2	g.l.	P
Mbi32	-	-	1,0000 (0,0000)	-	-			-
Mbi215	0,0031* (0,0000)	1,0000 (0,0000)	1,0000 (0,0000)	1,0000 (0,0000)	-	11,6	8	0,1722
Mbi218	-	-	0,0062* (0,0000)	-	-			-
Mbi278	-	0,5736 (0,0000)	0,0922 (0,0000)	0,1765 (0,0000)	1,0000 (0,0000)	9,3	8	0,3138
T4-171	0,0069* (0,0020)	0,0017* (0,0015)	0,0019* (0,0000)	0,0105* (0,0000)	1,0000 (0,0000)	44,4	10	0,0000*
χ^2	21,5	13,8	27,5	12,6	0,0	75,4		
g.l.	4	6	10	6	4		18	
P	0,0003*	0,03140*	0,0022*	0,0503	1,0000			0,0000*

* $P < 0,05$

Tabela 36. Teste para verificação de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg por deficiência de heterozigotos (Rousset e Raymond, 1995).

Loco	SC	SP	MG	ES	BA
Mbi32	-	-	1,0000 (0,0000)	-	-
Mbi215	0,0031* (0,0000)	0,6347 (0,0000)	0,8548 (0,0000)	1,0000 (0,0000)	-
Mbi218	-	-	0,0062* (0,0000)	-	-
Mbi278	-	0,3634 (0,0000)	1,0000 (0,0000)	1,0000 (0,0000)	0,6000 (0,0000)
T4-171	1,0000 (0,0000)	1,0000 (0,0000)	1,0000 (0,0000)	1,0000 (0,0000)	1,0000 (0,0000)

* $P < 0,05$

Desequilíbrio de ligação

Testes exatos de desequilíbrio de ligação foram realizados para os pares de locos de todas populações. Verificou-se que os pares de locos nas populações apresentaram $P > 0,05$, exceto os pares Mbi215/Mbi278 na população **SP** e Mbi215/Mbi218 na população **MG** (Tabela 37). O teste exato (Método de Fisher) foi realizado para os pares de locos para todas as populações com se fossem uma única. Verificamos que esses são herdados de modo independente visto que os valores de P foram maiores que 0,05 para quase todos pares de locos, excetuando o par Mbi215/Mbi218 (Tabela 38).

Tabela 37. Valores de P para verificação de desequilíbrio de ligação entre pares de locos em cada população.

Pares de locos	SC	SP	MG	ES	BA
Mbi32/ Mbi215	-	-	0,8489	-	-
Mbi32/ Mbi218	-	-	0,3081	-	-
Mbi32/ Mbi278	-	-	0,5563	-	-
Mbi32/ T4-171	-	-	0,8489	-	-
Mbi33/ Mbi215	-	0,5150	-	-	-
Mbi33/ Mbi278	-	0,8078	-	-	-
Mbi215 / Mbi218	-	-	0,0479*	-	-
Mbi215 / Mbi278	0,2912	0,0053*	0,6244	0,4914	-
Mbi215 / T4-171	0,6438	-	0,4920	0,7357	-
Mbi218 / Mbi278	-	-	0,3828	-	-
Mbi218 / T4-171	-	-	0,1576	-	-
Mbi278 / T4-171	0,1448	-	0,8704	0,5472	-

(-) Locos com apenas um alelo. * $P < 0,05$.

Tabela 38. Valores de P para cada par de locos para todas populações para teste de verificação de desequilíbrio de ligação (Método de Fisher). (g.l.): graus de liberdade.

Pares de locos	χ^2	g.l.	P
Mbi32 / Mbi33	0,05	1	0,8304
Mbi32 / Mbi215	0,25	1	0,6190
Mbi32 / Mbi218	0,19	1	0,6632
Mbi32 / Mbi278	2,27	1	0,1319
Mbi32 / T4-171	0,14	3	0,9865
Mbi33 / Mbi215	0,12	1	0,7266
Mbi33 / Mbi218	0,09	1	0,7594
Mbi33 / Mbi278	0,10	1	0,7518
Mbi33 / T4-171	0,07	3	0,9952
Mbi215 / Mbi218	4,97	1	0,0258*
Mbi215 / Mbi278	0,04	1	0,8360
Mbi215 / T4-171	1,58	3	0,6646
Mbi218 / Mbi278	0,41	1	0,5201
Mbi218 / T4-171	2,64	3	0,4504
Mbi278 / T4-171	2,64	3	0,4511

* $P < 0,05$

Diferenciação populacional

Os valores da estimativa de diferenciação populacional F_{ST} foram diferentes de zero, o que indica que há estruturação entre as populações, exceto para o par **BA/ES**, que apresentou valor negativo (Tabela 39). Os valores encontrados foram baixos, de -0,0010 a 0,3496, o que indica estruturação discreta entre as populações, provavelmente devido à baixa variabilidade observada nos locos estudados.

Tabela 39. Estimativa de F_{ST} entre pares de populações estudadas de *P. helleri*.

	SC	SP	MG	ES	BA
SC					
SP	0,1912				
MG	0,1184	0,0174			
ES	0,2354	0,0706	0,0052		
BA	0,3496	0,0722	0,0179	-0,0010	

Foram realizados testes para verificação de diferenciação populacional já que estas não se comportam como uma população panmítica. O primeiro teste realizado foi o de diferenciação alélica em que a hipótese nula era: “a distribuição alélica é idêntica entre as populações”. Quando o teste foi realizado com todas as populações como uma única, obtivemos χ^2 de 35,9631 com 12 graus de liberdade, o que forneceu $P = 0,0003$. Desta forma, a hipótese nula foi rejeitada apesar das colônias terem sido consideradas indistinguíveis analisando-se a distribuição alélica dos locos Mbi32, Mbi33 e T4-171 ($P > 0,05$) (Tabela 40).

Alguns pares de populações diferiram quanto à distribuição dos alelos dos locos Mbi215, Mbi218, e Mbi278, pois apresentaram valores de $P < 0,05$ (Tabela 41).

Ainda, quando os pares de populações foram testados com todos os locos analisados em conjunto, três pares de populações diferiram quanto à distribuição alélica, pois apresentaram valores de $P < 0,05$: **SC/MG**, **ES/SC** e **BA/SC** (Tabela 42).

Tabela 40. Valores de P resultantes de teste de diferenciação alélica para cada loco. Valores entre parêntesis: erro padrão.

Loco	P
Mbi32	0,2661 (0,0004)
Mbi33	1,0000 (0,0000)
Mbi215	0,0028* (0,0006)
Mbi218	0,0029* (0,0002)
Mbi278	0,0015* (0,0003)
T4-171	0,6241 (0,0015)

* $P < 0,05$.

Tabela 41. Valores de *P* resultantes do teste de diferenciação alélica por loco para cada par de populações de *P. helleri*. Valores entre parêntesis: erro padrão.

<i>Locos</i>	MG/SP	MG/SC	MG/ES	MG/BA	SP/SC	SP/ES	SP/BA	SC/ES	SC/BA	ES/BA
MBI03	0,22513	0,49251	0,49825	1,00000	-	-	-	-	-	-
2	(0,00020)	(0,00016)	(0,00015)	(0,00000)						
Mbi033	1,00000	-	-	-	1,00000	1,00000	1,00000	-	-	-
	0,00000				(0,00000)	(0,00000)	(0,00000)			
Mbi215	0,77503	0,13483	0,05742	0,06103	0,04237*	0,18159	0,14237	0,00131*	0,00401*	0,54658
	(0,00019)	(0,00027)	(0,00018)	(0,00014)	(0,00016)	(0,00028)	(0,00019)	(0,00002)	(0,00004)	(0,00015)
Mbi218	0,04608*	0,11383	0,12224	0,55688	-	-	-	-	-	-
	(0,00012)	(0,00017)	(0,00017)	(0,00014)						
Mbi278	0,17104	0,00010*	0,21183	0,65971	0,00581*	1,00000	1,00000	0,01646*	0,02771*	0,66540
	(0,00032)	(0,00001)	(0,00029)	(0,00018)	(0,00005)	(0,00000)	(0,00000)	(0,00008)	(0,00009)	(0,00018)
T4-171	0,56592	1,00000	1,00000	0,26383	0,67887	0,67681	0,28447	1,00000	0,35389	0,36709
	(0,00031)	(0,00000)	(0,00000)	(0,00033)	(0,00032)	(0,00031)	(0,00046)	(0,00000)	(0,00037)	(0,00034)

* $P < 0,05$.

Tabela 42. Teste de diferenciação alélica para cada par de populações envolvendo todos os locos. (g.l.): graus de liberdade.

Par de Populações	c²	g.l.	P
SP/MG	11,807	12	0,46127
SC/MG	27,734	8	0,00053*
SC/SP	14,248	8	0,07552
ES/MG	14,315	8	0,07391
ES/SP	4,675	8	0,79165
ES/SC	18,935	4	0,00081*
BA/MG	9,923	10	0,44723
BA/SP	7,515	8	0,48226
BA/SC	13,472	6	0,03612*
BA/ES	4,120	6	0,66039

* $P < 0,05$

Também foi realizado o teste de diferenciação genotípica entre populações em que a hipótese nula foi: “a distribuição genotípica é idêntica entre as populações” a qual deve ser aceita caso $P > 0,05$.

Observando a tabela 43 verificamos que os locos Mbi32, Mbi33 e Mbi218 estão distribuídos de forma idêntica entre as populações visto que apresentaram valores de $P > 0,05$. Ainda, foram realizados cálculos considerando pares de populações por loco estudado. Observamos diferenciação genotípica entre alguns pares de populações para os locos Mbi215 e Mbi278, pois apresentaram $P < 0,05$ (Tabela 44).

Quando consideramos todos os locos juntos, a maioria dos pares de populações se mostrou idêntica quanto à distribuição dos genótipos. Dos dez pares de populações

analisadas, apenas três se mostraram distintos genotipicamente: **SC/MG**, **ES/SC** e **BA/SC** (Tabela 45).

Tabela 43. Teste de diferenciação genotípica para cada loco estudado de *P. helleri*.

Locos	P
Mbi32	0,2248 (0,0004)
Mbi33	1,0000 (0,0000)
Mbi215	0,0076* (0,0001)
Mbi218	0,2248 (0,0004)
Mbi278	0,0006* (0,0000)
T4-171	0,0219* (0,0002)

* $P < 0,05$

Tabela 44. Valores de *P* resultantes do teste de diferenciação genotípica por loco para cada par de populações. Valores entre parêntesis: erro padrão.

<i>Locos</i>	MG/SP	MG/SC	MG/ES	MG/BA	SP/SC	SP/ES	SP/BA	SC/ES	SC/BA	<i>ES/BA</i>
MBI03	0,22009	0,48034	0,48554	1,00000	-	-	-	-	-	-
2	(0,00021)	(0,00016)	(0,00016)	(0,00000)	-	-	-	-	-	-
Mbi033	1,00000	-	-	-	1,00000	1,00000	1,00000	-	-	-
	(0,00000)	-	-	-	(0,00000)	(0,00000)	(0,00000)	-	-	-
Mbi215	0,77315	0,20583	0,04997*	0,05928	0,09835	0,19566	0,11066	0,01419*	0,06994	0,50934
	(0,00019)	(0,00029)	(0,00016)	(0,00017)	(0,00024)	(0,00027)	(0,00022)	(0,00009)	(0,00014)	(0,00015)
Mbi218	0,22009	0,48033	0,48563	1,00000	-	-	-	-	-	-
	(0,00020)	(0,00017)	(0,00016)	(0,00000)	-	-	-	-	-	-
Mbi278	0,15191	0,00002*	0,06610	0,59107	0,01685*	1,00000	1,00000	0,00545*	0,07358	1,00000
	(0,00025)	(0,00000)	(0,00013)	(0,00029)	(0,00009)	(0,00000)	(0,00000)	(0,00005)	(0,00018)	(0,00000)
T4-171	0,47975	-	-	0,19980	0,48598	0,49347	0,21098	-	0,23073	0,25019
	(0,00016)	-	-	(0,00019)	(0,00017)	(0,00016)	(0,00031)	-	(0,00019)	(0,00019)

* $P < 0,05$.

Tabela 45. Teste de diferenciação genotípica para cada par de populações envolvendo todos os locos. (g.l.): Graus de Liberdade.

Par de populações	χ^2	g.l.	P
SP/MG	11,807	12	0,4613
SC/MG	27,734	8	0,0005*
SC/SP	14,248	8	0,0755
ES/MG	14,315	8	0,0739
ES/SP	4,675	8	0,7916
ES/SC	18,935	4	0,0008*
BA/MG	9,923	10	0,4472
BA/SP	7,515	8	0,4822
BA/SC	13,472	6	0,0361*
BA/ES	4,120	6	0,6604

* $P < 0,05$.

Distância genética entre populações

Para melhor avaliação da diferenciação entre as populações, a distância genética “Chord” de Cavalli-Sforza e Edwards (1967) foi calculada para cada par destas (Tabela 46). Os valores de distância “Chord” foram utilizados para a construção do fenograma baseado no método de Evolução Mínima (Figura 21). O teste de Mantel mostrou que não há relação entre as distâncias genéticas, tanto “Chord” ($r = 0,664$; $P = 0,9606$) quanto F_{ST} ($r = 0,720$; $P = 0,9742$), e as distâncias geográficas entre as populações.

Tabela 46. Valores de distância genética entre os pares de populações de *P. helleri* de acordo com Cavalli-Sforza e Edwards (1967).

POPULAÇÃO	SC	SP	MG	ES	BA
SC	-				
SP	0,151	-			
MG	0,188	0,142	-		
ES	0,154	0,084	0,137	-	
BA	0,250	0,168	0,212	0,131	-

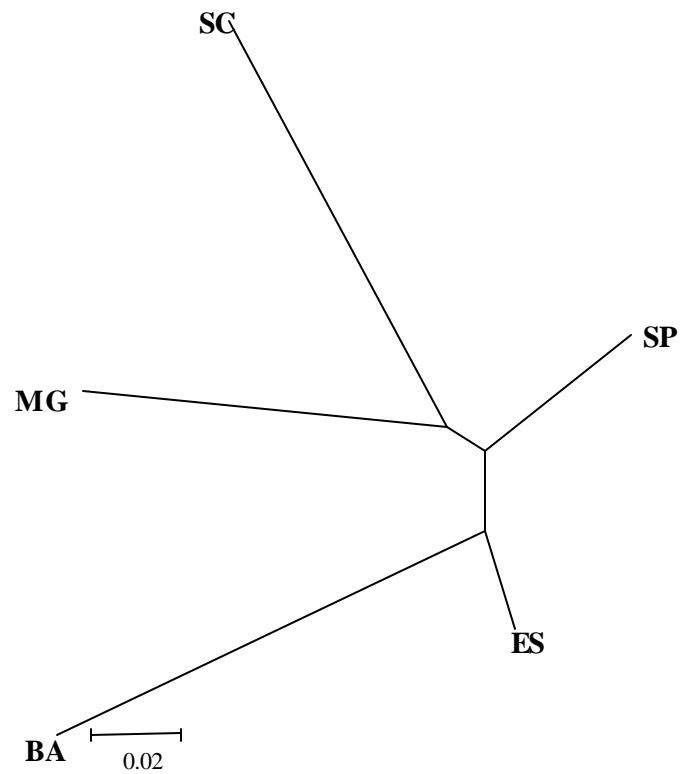


Figura 21. Fenograma obtido pelo método de Evolução Mínima, a partir dos valores de distância genética obtidos de acordo com Cavalli-Sforza e Edwards (1967), relacionando as cinco populações de *P. helleri*: SC, SP, MG, ES e BA.

4.2.3. ANÁLISE GERAL DOS DADOS POPULACIONAIS

4.2.3.1. *Partamona mulata*

4.2.3.1.1. DNAMt

As enzimas que reconhecem seqüências de seis pares de bases foram empregadas nos diferentes fragmentos amplificados de *P. mulata* seguindo o mapa de restrição obtido na caracterização do DNAMt (Anexo 1). As enzimas *Fba* I, *Cla* I, *Hae* III e *Hind* III não evidenciaram polimorfismos de tamanhos de fragmentos nas regiões COI-COII (COI-III/mtD18), ATP6-ATP8 (mtD19/Seq11), CytB-ND1 (5612R/tPhef), COIII-ND3 (mtD26/mtD30).

As enzimas de corte freqüente, *Dra* I e *Hinf* I, também não evidenciaram polimorfismo de haplótipos entre colônias de *P. mulata*, com uma única exceção na colônia denominada M47, em que o fragmento COI-III/mtD18 apresentou padrão alternativo com a enzima *Dra* I (Figura 5). Tal diferença entre padrões de bandas ocorreu pela perda de um sítio de restrição em relação ao haplótipo predominante, o que foi verificado pela análise da seqüência do fragmento. Assim, apenas dois haplótipos foram observados para a espécie, H01 em 57 colônias, e H02, observado apenas em uma colônia de Campo Grande – MS.

Em conseqüência dessa ausência de polimorfismo haplotípico tanto intra quanto inter populações, um panorama muito claro do *status* da variabilidade genética de *P. mulata* nas áreas amostradas pode ser observado na figura 6. As análises estatísticas confirmaram a evidente homogeneidade das populações estudadas. A diversidade haplotípica (h) apresentou valores muito baixos (0 a 0,1594), visto que apenas dois haplótipos foram detectados. A divergência haplotípica entre pares de populações (δ) também foi muito baixa, inclusive com valores negativos, pois apenas uma colônia de

Campo Grande apresentou o haplótipo alternativo. Em *Apis cerana* também foi observado valor de diversidade haplotípica $h=0$ em uma população da ilha Phuket (Sihanuntavong *et al.*, 1999). Os autores postularam que a baixa variabilidade haplotípica tenha ocorrido por efeito fundador, em que a ilha teria sido colonizada por populações com baixíssima diversidade haplotípica.

P. mulata ocorre em áreas de cerrado e pantanal, as quais têm sido sistematicamente modificadas pelo desmatamento para a abertura de áreas de plantio ou de pasto para criação de gado. Nesses casos, quando o solo não é adequadamente tratado, os termiteiros afloram nas áreas de pasto, o que incorre em ambiente propício para enxameagem e instalação de abelhas termitófilas como *P. mulata*. Áreas como estas foram amostradas durante as coletas, em que ninhos foram encontrados muito próximos uns dos outros. Seria esperado que não observássemos diferenças no DNAm de nestes ninhos pois a matrilinea provavelmente seria a mesma. Entretanto, populações distantes 100, 300 e até 600 km apresentaram o mesmo haplótipo.

Esse resultado inclui *P. mulata* na categoria V proposta por Avise (1994), em que linhagens freqüentes e amplamente distribuídas ocorrem juntamente com haplótipos exclusivos. Este padrão filogeográfico pode ser reflexo de duas opções na história evolutiva dessas populações:

- A espécie teria passado por um afinamento populacional, o que teria diminuído muito o tamanho efetivo das populações, e a recolonização das áreas teria sido iniciada por uma população com baixa variabilidade haplotípica ou;
- Divergência recente de uma espécie ancestral, não tendo havido tempo suficiente para acúmulo de mutações entre populações isoladas.

Resultado semelhante ao obtido para *P. mulata* foi observado para a espécie de formiga *Diacamma indicum* por Viginier *et al.* (2004). Os autores sequenciaram 675 pares de bases de indivíduos provenientes de sete populações do sul da Índia e uma do Sri Lanka. Apenas um único haplótipo foi observado entre as populações analisadas. Apesar de não haver evidências históricas, os autores acreditam que tal ausência de polimorfismo entre as populações de *D. indicum* se deva à ocorrência de afunilamentos populacionais com extinção de populações e recolonização das áreas.

As mudanças climáticas ocorridas na América do Sul durante os ciclos de glaciações do Pleistoceno podem ter contribuído para a diminuição da variabilidade genética das populações de *P. mulata*. Segundo Ab'Saber (1979), em função da extensão em sentido sul-norte da corrente Falklands-Malvinas, houve condições para filtragem da umidade procedente do Atlântico. Isso criou uma faixa semi-árida desde o Uruguai e Rio Grande do Sul até o sul ou centro da Bahia. Isso teria propiciado a expansão de vegetação típica de caatinga, restringindo a cobertura vegetal do tipo cerrado e floresta a ilhas de vegetação. Essa contração das áreas de cerrado pode ter contribuído para extinção de populações de *P. mulata* e confinamento de outras a essas ilhas de vegetação. Durante o fim do Terciário inferior, um conjunto de mudanças integradas na porção central do Brasil como o nível tectônico do território, a instalação de climas tropicais e subtropicais úmidos ou subúmidos e a instalação de sistemas hidrográficos contribuíram para circunscrição de uma aplainação chamada de pediplanicie cuiabana ou pediplano cuiabano (Ab'Saber, 1988). A recolonização da área de distribuição ocupada atualmente por *P. mulata* pode ter ocorrido ao final do último período glacial datado de 13 a 20.000 anos, quando a umidade e temperatura permitiram a expansão das coberturas vegetais adaptadas a essas condições. É possível

que populações com variabilidade haplotípica reduzida pela fragmentação das áreas de cerrado tenham se dispersado a partir do pediplano cuiabano, e colonizado áreas em torno do Pantanal cuja formação geológica é mais recente, datada do Holoceno.

Diminuição de variabilidade genética atribuída à deriva genética posterior a afunilamentos populacionais têm sido relatados em populações naturais como em populações insulares de *Bombus terrestris* (Estoup *et al.*, 1996), em lambaris da espécie *Astyanax scabripinis* (Moysés e Almeida-Toledo, 2002), em anfíbios da espécie *Litoria aurea* (Burns *et al.*, 2004), entre outros.

4.2.3.1.2. MICROSSATÉLITES

Variabilidade genética

A análise dos locos microssatélites mostrou haver baixo polimorfismo em *P. mulata*. Quatro locos apresentaram um único alelo (Mbi28, Mbi32, Mbi215, Mbi218), três locos apresentaram um segundo alelo (Mbi201, Mbi278, Mbi522) e em apenas dois locos foram encontrados mais de dois alelos (T3-32 e T4-171) (Figura 10).

O loco T3-32 apresentou quatro alelos, o que é interessante visto que apenas para *Scaptotrigona postica*, espécie a partir da qual os *primers* foram desenhados, foram observados mais que dois alelos, totalizando cinco (Paxton *et al.*, 1999a). Para *Plebeia remota*, *Lestrimelitta limao*, *S. pectoralis*, *S. tubida*, foram observados dois alelos, e para *Nanotrigona* sp. e *Trigona nigra* apenas um (Paxton *et al.*, 1999a; Francisco, 2002).

Outro loco já estudado em outros Meliponini é Mbi215, que para *P. mulata* apresentou apenas um alelo tal como para *Melipona quadrifasciata*, *Tetragona clavipes* e *Scaptotrigona postica*. Por outro lado, o loco Mbi278 apresentou um segundo alelo tal como em *Tetragona clavipes* e *Scaptotrigona postica*, sendo menos polimórfico em

Partamona do que na espécie para qual foi descrito, *Melipona bicolor* com cinco alelos (Peters *et al.*, 1998) e para *Plebeia remota* com seis alelos (Francisco, 2002).

O baixo polimorfismo foi evidenciado pelo número médio de alelos (*A*) e porcentagem de locos polimórficos (*PLP*) nas populações, os quais apresentaram baixos valores (Tabela 11). As taxas de heterozigose (Tabela 11) foram menores do que as observadas por Francisco (2002) para *P. remota*, provavelmente porque, apesar do autor também ter usado *primers* heteroespecíficos, este obteve *PLPs* bem maiores (42% e 71%) do que os de *P. mulata*.

Esse resultado pode ser devido a três fatores:

- 1 – **O número amostral não foi o suficiente para detecção de maior número de alelos;**
- 2 – **Homoplasias de tamanho de fragmentos ou a ocorrência de alelos nulos (pelo uso de *primers* heteroespecíficos), nos teria levado a subestimar a variabilidade genética de *P. mulata*.** Esta possibilidade é real visto que qualquer mutação que ocorra na sequência de DNA complementar aos *primers* pode inibir ou impedir completamente a sua ligação, resultando tanto em redução como em completa perda do produto de PCR (Callen *et al.*, 1993). Sittipraneed *et al.* (2001) abordam o assunto comparando o número de alelos por loco microsatélite amplificados com *primers* de *A. mellifera* em *A. mellifera* e *A. cerana*, o qual foi maior na primeira. No caso das homoplasias, mutações de ponto na sequência do microsatélites que não incorram em diferença no tamanho dos fragmentos não teriam sido detectadas. Tais problemas podem ser contornados no futuro pela construção de uma biblioteca genômica de *Partamona*, ou sequenciamento de todos os alelos observados;

3- *P. mulata* de fato apresenta baixa variabilidade genética nos locos **microsatélites estudados**. Essa suposição só poderá ser testada com o uso de *primers* homoespecíficos nas mesmas populações e comparação dos dados com os obtidos no presente trabalho.

Estruturação populacional

Foi observado que populações de *P. mulata* compartilham alelos nos locos polimórficos, tendo sido observado apenas dois exclusivos, no loco Mbi278 em Cáceres (106 - A), e no loco T4-171 em Cuiabá (110 - E) (Figura 10). Esta pode ser a razão da discreta estruturação encontrada entre as populações, visto os baixos valores de F_{ST} (Tabela 17), o que poderia ser indício de que haja fluxo gênico entre as populações.

Pelos dados obtidos com o DNAmT e microsatélites, não é possível afirmar se há fluxo gênico entre populações de *P. mulata* por meio de apenas um dos sexos, ou via machos ou via fêmeas, pois há compartilhamento de haplótipos e alelos microsatélites entre estas. Porém, sabe-se que em Meliponini, as rainhas virgens deixam seus ninhos de origem acompanhadas de algumas operárias para ocupar um novo ninho já iniciado por outras operárias. Essa comunicação entre ninho antigo e novo pode durar um longo período, até seis meses em *Partamona orizabensis* (Wille e Orozco, 1975), o que impede a dispersão de fêmeas a longas distâncias em relação ao ninho original. Por outro lado, acredita-se que dispersão dos machos seja ampla, os quais voam e formam agregados na frente de ninhos novos, com rainhas virgens, até o momento do vôo nupcial. Paxton (2000) observaram para *Scaptotrigona postica* que os machos de um agregado analisado eram provenientes de colônias diferentes visto que o grau de parentesco entre estes era muito baixo ($g=0,009$).

Apesar do compartilhamento de alelos observado, as análises estatísticas mostraram que as populações de *P. mulata* não se comportam como uma única, panmítica. Quando analisamos as populações separadamente, apenas uma se encontrava em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 12). Tal desvio se deve a deficiências de heterozigotos em alguns dos locos estudados. A estruturação entre as populações, mesmo que discreta, foi evidenciada pela diferenciação nas distribuições dos alelos e genótipos entre alguns pares de populações (Tabelas 17 a 22). Dentre as populações com distribuição alélica idêntica, o par **Sal/Cba** apresentou, em contraste, diferenciação genotípica. No entanto, observando a tabela 10, vemos que em relação aos locos T3-32 e T4-171 há sim diferença na distribuição de genótipos entre **Sal/Cba**. A tabela 22 mostra, por sua vez, que a probabilidade de se retirar ao acaso dois genótipos dessas duas populações e estes não serem idênticos é 4,1%, bastante alta apesar do nível de significância estabelecido em 5%. Possivelmente este desvio possa estar relacionado com o baixo número amostral da população **Sal** (N=6).

A estimativa de distância genética “Chord” de *P. mulata* variou de 0,111 a 0,247. O fenograma obtido a partir desses valores apontou uma maior proximidade genética entre populações de **Poc/Sal**, **Cba/Cac**, e **Cgd** isolada destes pares (Figura 11). No caso da população **Cgd**, a maior distância genética em relação às outras populações era esperada visto que esta era a mais distante geograficamente. Entretanto, o teste de Mantel apontou não correlação entre distâncias genéticas e geográficas, pois as populações (**Cac**) e (**Sal**) estão mais próximas geograficamente (30 km) do que **Cac** e **Cba** (300 km) ou **Sal** e **Poc** (130 km) (Figuras 6 e 11).

A baixa estruturação observada entre as populações de *P. mulata* não está necessariamente relacionada com fluxo gênico entre estas. Segundo Slatkin (1987),

extinções frequentes e recolonizações podem explicar baixa diferenciação entre populações se a média de tempo que uma população persiste em uma área for menor que o tempo necessário para que haja oscilação randômica das frequências gênicas entre as gerações até a fixação de alelos. Kawata (1997) simulou a fragmentação de uma área hipotética em 16 menores com corredores de intercomunicação entre estes e observou perda na variabilidade genética da população virtual logo nas primeiras gerações. Eventos de fragmentação de populações e recolonizações são amplamente descritos na literatura. Na formiga *D. indicum*, índices de baixa variabilidade genética foram observados após a análise de 11 locos microssatélites como, por exemplo, média de alelos por loco (A) de 1,5, porcentagem de locos polimórficos de 36%, heterozigose média observada (H_o) igual a 0,25 (Virginier *et al.*, 2004). Entretanto, o F_{ST} apontou alta estruturação entre as populações (0,45), justificada pelos autores como sendo resultado de diferenciação genética entre populações promovida pela fragmentação de habitats. Nesta situação, populações com números efetivos pequenos estariam mais sujeitas aos efeitos da deriva genética. A baixa variabilidade genética e estruturação entre as populações de *P. mulata* observadas por meio da análise dos locos microssatélites, são mais um indício de que a espécie pode ter passado por isolamento de populações devido à fragmentação das áreas em que estas estão distribuídas pela contração e expansão de áreas secas e áridas durante os ciclos de glaciações do Pleistoceno.

4.2.3.2. *Partamona helleri*

4.2.3.2.1. DNAMt

Em oposição ao que foi observado para *P. mulata*, as enzimas de corte frequente, *Dra* I e *Hinf* I, foram eficazes em evidenciar polimorfismo de haplótipos entre colônias de *P. helleri*. Para o fragmento COI-IIIF/mtD18 foram observados três padrões com *Dra* I; para mtD26/mtD30 e mtD19/Seq11, dois padrões em cada fragmento tanto para *Dra* I quanto para *Hinf* I e no fragmento 5612R/tPheF, quatro padrões com *Dra* I e dois com *Hinf* I (Figuras 12 a 13 e Tabela 24). A combinação destes padrões, denominados por letras, resultou na composição de dez haplótipos distintos (Tabela 25).

A distribuição dos haplótipos entre as populações mostrou que a única população diferenciada é a **BA**, pois foi a única que não compartilhou haplótipos (Figura 14). Entretanto, é possível que isso se deva ao baixo número de colônias amostradas (N=3). Nas outras populações também foram observados haplótipos exclusivos além dos compartilhados. A única exceção foi **ES** que apresentou apenas dois haplótipos, também observados em **SP** (Figura 14).

Os valores de divergência de sequência de nucleotídeos (*d*) foram usados para a construção do fenograma da figura 15. Observamos um ramo compreendendo os haplótipos da região sudeste-sul H05, H06, H08, H09, H10, um outro ramo compreendendo H03 e H04, do norte da distribuição, e haplótipos intermediários a estes dois ramos, H01, H02 e H07. Na rede de inter-relação entre haplótipos (Figura 16) observamos que a maior proximidade genética entre os haplótipos H02, H03, H04, (**ES/BA**) e H05, H06 e H09 (**MG/SC**) são concordantes com o fenograma da figura 15. A diferença está nas inter-relações entre os haplótipos H01, H07, H08 e H10, todos

observados na população de São Paulo, os quais foram agrupados em dois outros ramos. Segundo Dowling *et al.* (1996), o haplótipo que contém o maior número de sítios de restrição (neste caso o maior número de bandas) seria o mais primitivo, pois acredita-se que a probabilidade de se perder um sítio de restrição por mutação é maior do que a de ganhar. No caso de *P. helleri*, o haplótipo que apresentou maior número de bandas foi H04. Entretanto este foi observado apenas na população BA, a qual se mostrou mais distante geneticamente das demais (Figura 15). É possível que o haplótipo ancestral daqueles observados para *P. helleri* não tenha sido amostrado ou ainda, que este tenha se extinguido.

A diversidade haplotípica (h) média (0,5545) (Tabela 27) é comparável com a observada em *P. remota* por Francisco (2002), que analisando todo o genoma mitocondrial desta espécie com 14 enzimas de restrição, obteve 15 haplótipos e diversidade haplotípica média $h = 0,5476$. Já o valor de diversidade nucleotídica (0,0021) foi bem menor do que de *Plebeia* (0,0082), provavelmente pelo número diferente de enzimas utilizadas para as análises.

A variância populacional obtida pela análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que esta é maior dentro das populações. Os dados da população de São Paulo provavelmente são os principais responsáveis visto que esta compreendia metade dos haplótipos observados. Entretanto, o valor ϕ_{ST} (0,6230) indicou que apesar de haver muitos haplótipos compartilhados, há de fato estruturação entre as populações. O “Teste Exato” e “Monte”, mostraram também que estatisticamente as populações são diferenciadas.

A exclusividade de metade dos haplótipos observados já era indício de que as populações estão parcialmente diferenciadas. Os valores de divergência haplotípica

interpopulacional (δ) foram baixos (Tabela 28). No entanto, os valores de F_{ST} indicaram estruturação pronunciada (Tabela 29). Apesar de apresentarem escalas diferentes, fenogramas obtidos com base nos valores de δ e F_{ST} apresentaram a mesma topologia (Figura 18).

Sabendo-se que as fêmeas de *Partamona* são filopátricas, e que não se afastam mais do que alguns metros do ninho mãe quando ocorre enxameagem, a hipótese de que o compartilhamento de haplótipos por atual fluxo gênico via fêmea é bastante improvável. O mesmo tipo de dado foi obtido para *P. remota* (Francisco, 2002) em que populações de São Paulo e Paraná compartilharam haplótipos. Este autor refutou a hipótese de migração de rainhas entre populações e propôs que o transporte de colônias por meio da ação humana estivesse interferindo na estrutura genética das populações.

No caso de *Partamona*, tal proposição se mostra pouco provável, pois estas abelhas não são criadas por meliponicultores. Isto é devido à sua alta agressividade e à qualidade duvidosa do mel, uma vez que estas abelhas são freqüentemente observadas coletando fezes de animais. Portanto, a estrutura haplotípica das populações de *P. helleri* estudadas indica que estas estiveram interligadas no passado. A fragmentação da Mata Atlântica em períodos de constrição de vegetação durante as glaciações do Pleistoceno pode ter isolado as populações de *P. helleri* em refúgios de mata. Acredita-se que à medida que os climas secos litorâneos do sul do Brasil atingiram o sudeste, as florestas Atlânticas da Serra do Mar teriam perdido sua continuidade no sentido base topo reduzindo-se a refúgios na testada superior das escarpas e em alguns esporões e maciços costeiros, mais úmidos pela eventual ação de chuvas orográficas (Ab'Saber, 1979). O acúmulo de mutações no DNA mitocondrial nessas populações isoladas teria dado origem aos novos haplótipos exclusivos.

Caso a re-tropicalização na América do Sul tenha ocorrido no sentido contrário da desertificação, ou seja, no sentido norte/sul, é possível que tenha ocorrido movimentação de populações de *P. helleri* no mesmo sentido. Isto porque observamos que o haplótipo H02, o mais próximo geneticamente dos haplótipos do sul da Bahia (Figuras 15 e 16) e o mais freqüente da população **ES**, também foi encontrado nas populações de **MG** e **SP**. Ainda, o haplótipo H06, o mais freqüente de **MG**, foi encontrado no extremo sul da distribuição de *P. helleri* em **SC**.

Este tipo de argumentação tem sido usado para explicar a proximidade genética entre haplótipos geograficamente distantes em várias espécies, principalmente pela possível expansão de populações a partir de refúgios pleistocênicos. Um exemplo seria o do gafanhoto *Chortippus parallelus* na Europa, em que populações do norte da França se mostraram geneticamente mais próximas a populações dos Balcãs do que àquelas da Espanha ou Itália (Lunt *et al.*, 1998).

Para a distribuição de haplótipos observada em *P. helleri* não é possível incluir a espécie em uma única categoria filogeográfica de Avise (1994). Isto porque tal como na categoria III, a maioria dos haplótipos é estreitamente relacionada (visto os baixos valores de *d* na tabela 26), e 50% destes são exclusivos. Entretanto, outros 50% dos haplótipos são estreitamente relacionados e partilhados entre algumas populações, como na categoria IV. Avise (2000) considera que uma distribuição de haplótipos que combine as categorias III e IV pode ser considerada como pertencente à categoria V. No caso de *P. helleri* não há um haplótipo que esteja distribuído em todas regiões amostradas, portanto não é possível classificá-la na categoria V.

É possível então que tenha havido no passado fluxo gênico limitado entre populações, com a possível migração de algumas populações no sentido norte/sul,

porém o tempo em que estas estiveram isoladas teria sido o suficiente para a evolução de haplótipos exclusivos localmente.

4.2.3.2.2. MICROSSATÉLITES

Variabilidade Genética

A análise da estrutura populacional de *P. helleri* com base nos microssatélites evidenciou baixo polimorfismo tal como observado para *P. mulata*. Quatro locos apresentaram apenas um alelo (Mbi28, Mbi201 e Mbi522), cinco apresentaram um segundo alelo (Mbi32, Mbi33, Mbi215, Mbi218 e Mbi278) e apenas um loco apresentou mais de dois alelos, T4-171 (Tabela 32).

Alelos exclusivos foram observados para o loco Mbi32 (B) e Mbi218 (B) em **MG**. Também foram observados para o loco T4-171, (D) em **SP** e (E) em **BA** (Figura 20 e Tabela 32). Exclusividade de alelos é uma evidência de baixo fluxo gênico entre populações. Portanto, apenas pela observação da distribuição dos alelos podemos verificar a existência de estruturação entre as populações.

Comparando os dados de *P. helleri* com os de outros Meliponini, observamos que para alguns locos estudados com *primers* desenhados para *Melipona bicolor*, como Mbi33 e Mbi522, o baixo polimorfismo encontrado seria esperado, visto que não mais que dois alelos foram encontrados em *M. quadrifasciata*, *M. bicolor*, *Plebeia remota*, *S. postica* e *Tetragona clavipes* (Peters *et al.*, 1988; Paxton *et al.*, 1999a; Francisco, 2002). No entanto, analisando o loco estudado com *primers* de *Scaptotrigona postica* (T4-171), *P. helleri* apresentou o maior número de alelos (quatro), pois outras abelhas sem ferrão como *S. tubida*, *Lestrimelitta limao*, *Melipona beechei*, *Nanotrigona* sp., *Trigona nigra* apresentaram até dois alelos para este loco (Peters *et al.*, 1988; Paxton *et al.*, 1999a).

A média de alelos por loco (A) de *P. helleri* variou de 1,33 a 1,56. Esta média de menos de dois alelos por loco se deve ao grande número de locos com apenas um alelo. Conseqüentemente, a porcentagem de locos polimórficos por população também apresentou valores baixos (22,22 a 55,56%). Comparando tais dados com os de *Plebeia remota* (Francisco, 2002), em que a *PLP* das populações variou de 42 a 71%, observamos que a variabilidade genética de *P. helleri* é menor. Uma outra possibilidade é a de que os *primers* heteroespecíficos usados tinham menor homologia de seqüência com o genoma de *Partamona*, e nossos dados foram resultantes de alelos nulos. As taxas de heterozigose média (Hn) de *P. helleri* (Tabela 34) foram menores do que as observadas para *P. remota*, o que certamente foi influenciado pelo baixo número de locos polimórficos. As hipóteses levantadas para o baixo polimorfismo de locos microssatélites de *P. mulata* também se adequam para *P. helleri*:

1- **baixo número amostral**;

2 - **alelos nulos**: a hipótese de alelos nulos só poderá ser testada através o desenho de *primers* específicos de *Partamona*, como já ressaltado para *P. mulata*;

3 - **baixa variabilidade genética**: é possível também que a variabilidade genética nos locos analisados seja de fato limitada.

Baixa variabilidade genética de locos microssatélites já foi observada em populações da península Ibérica em *Apis mellifera* (Franck *et al.*, 1998). Os autores acreditam que esse resultado se deva pela recente colonização da área a partir de populações que tenham se expandido a partir de refúgios pleistocênicos. Esta hipótese foi reforçada apela comparação com populações africanas que apresentaram maior variabilidade genética. O continente africano segundo os autores, teria passado por alterações climáticas bem menos rigorosas do que a Europa durante os ciclos de

glaciação do Quaternário. Desta forma, as populações estariam estabelecidas lá há mais tempo do que as populações européias, tendo havido maior acúmulo de mutações e surgimento de novos alelos.

Foi detectado desequilíbrio de ligação entre os locos Mbi215 e Mbi218 tanto na análise em conjunto quanto nas populações separadamente. Já o par de locos Mbi215 e Mbi278, em desequilíbrio na análise em conjunto, não aparecem ligados na análise por população. Segundo Jones *et al.* (2003), esse tipo de resultado pode estar relacionado com baixo número de indivíduos amostrados de uma população. Para testar tal hipótese é então necessário coletar mais colônias e repetir o teste.

Estruturação populacional

As populações de *P. helleri* não podem ser consideradas com uma única de cruzamentos ao acaso, visto que estas não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg quando analisadas em conjunto (Tabela 35). Este é mais um indício de estruturação entre as populações. Quando analisadas separadamente, apenas as populações de ES e BA estão em equilíbrio. O desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg se deve a déficit de heterozigotos, para alguns dos locos estudados, nas populações (Tabela 36).

As análises de estruturação populacional confirmaram que as populações estão diferenciadas pois os valores de F_{ST} , apesar de muito inferiores àqueles obtidos para o DNAm (Tabela 29), foram diferentes de zero e os valores de P foram significativos para todos os pares de populações. Quando a análise de diferenciação populacional foi realizada pela comparação da distribuição alélica entre os pares de populações, verificamos diferenças entre os pares **SC/MG**, **SC/ES** e **SC/BA**. Os mesmos pares de

populações se mostraram diferenciados quando a análise foi realizada a respeito da distribuição dos genótipos (Tabelas 42 a 45).

Os valores da distância “Chord” foram baixos tendo sido o maior observado entre **SC** e **BA**, o que está de acordo com a distribuição geográfica das mesmas (Tabela 46). Porém a menor distância observada, entre as populações **SP/ES** (0,084), indica impossibilidade de estruturação das populações em concordância com as distâncias geográficas entre estas, o que foi confirmado pelo teste de Mantel ($P=0,9606$).

Os valores da distância “Chord” entre pares de populações foram utilizados para a construção de um fenograma (Figura 21). Observamos que a topologia deste é idêntica às observadas nos fenogramas obtidos com os valores de δ e F_{ST} do DNAmT de *P. helleri* (Figura 17). **BA** e **ES** compartilhando um ramo, **SC** e **MG** compartilhando outro ramo e **SP** em ramo isolado. Esse resultado mostra que apesar do baixo polimorfismo encontrado nos locos microssatélites, estes são consistentes com outro marcador molecular.

É interessante notar que apesar da baixa diversidade genética e a fraca estruturação entre as populações de *P. helleri*, a população **BA** apresentou-se diferenciada das demais tanto com relação ao DNAmT quanto aos locos microssatélites, apesar do pequeno número amostral ($N=3$). Esta apresentou haplótipos exclusivos e um alelo no loco T4-171 não observado em nenhuma outra população. É possível que esta população esteja mesmo isolada das demais há mais tempo. Segundo Amorim e Pires (1996), eventos de vicariância teriam levado a divergência de espécies na América do Sul não só por eventos principais como a separação da região amazônica do restante do Brasil pela presença de mares epicontinentais, mas também, eventos paleoclimáticos mais recentes datados do final do período Cenozóico, teriam separado regiões de

endemismos de espécies. Um desses eventos, que o autor supõe ter ocorrido entre o Eoceno e o Oligoceno, teria promovido o isolamento entre áreas de endemismos do sudeste brasileiro de outra área compreendendo o Espírito Santo e o sul da Bahia. Essa hipótese poderia explicar a maior diferenciação da população da **BA** em relação às demais estudadas. Dados semelhantes foram observados em populações da espécie de formiga *Formica pratensis* na Eurásia (Goropashnaya *et al.*, 2004). Esta espécie apresentou 26 haplótipos os quais foram agrupados em dois clados pela divergência nucleotídica, em concordância com a distribuição geográfica destes, (A) haplótipos do oeste e (B) haplótipos do leste. Os autores postularam que tal distribuição filogeográfica seja indício de que a recolonização da Eurásia, após as últimas glaciações do Pleistoceno, tenha ocorrido a partir de dois refúgios distintos.

De acordo com Simonsen *et al.* (1998), baixa diferenciação genética entre populações pode ser explicada por dois mecanismos: 1) inicialmente haveria uma grande população ocupando a área de distribuição geográfica, panmítica com fluxo gênico entre populações de localidades diferentes e a fragmentação dos habitats isolaria a população em pequenas sub-populações impedindo o fluxo gênico entre estas. Portanto, a diferenciação das populações observada nos dias atuais seria causada pelo efeito fundador e deriva genética nestas sub-populações resultantes da fragmentação da população inicial; 2) a distribuição da variação genética poderia refletir uma alta taxa de migração entre populações, mas não tão alta a ponto de resultar em total homogeneidade genética das populações, uma possibilidade embasada pela correlação entre distâncias genéticas e geográficas.

Simonsen *et al.* (1998) estudaram populações de búfalos africanos, e verificaram dados semelhantes aos de *P. helleri*, baixa variabilidade genética, fraca estruturação

interpopulacional e não correlação entre distâncias genéticas e distâncias geográficas. O autor acredita que a primeira hipótese acima descrita seria a melhor explicação para os resultados obtidos para a espécie (*Syncerus caffer*). Isto porque esta espécie teria passado por um afinamento populacional recente tanto pela ação humana por meio da fragmentação de seus habitats, quanto por uma epidemia que dizimou 10.000 animais para cada sobrevivente.

A exemplo do búfalo africano, fatores não evolutivos podem estar influenciando a estrutura genética das populações de *P. helleri*. O desmatamento da Mata Atlântica no último século reduziu a cobertura vegetal a cerca de 7% do que havia na época do descobrimento do Brasil, o que vem promovendo a fragmentação de áreas e conseqüentemente o isolamento entre populações.

4.2.3.3. COMPARAÇÃO INTERESPECÍFICA

4.2.3.3.1. DNAm t

A combinação da PCR com RFLP foi primeiro realizada por Saiki *et al.* (1985). O uso de *primers* para regiões específicas do genoma faz com que os fragmentos analisados não sejam anônimos. Desta forma, a comparação das bandas entre indivíduos de uma população torna-se mais precisa aumentando a probabilidade de que bandas de mesmo tamanho sejam homólogas. Apesar do nível de polimorfismo ser menor em relação ao RFLP, pela redução da análise à parte do genoma, esta metodologia tem sido empregada com sucesso em estudos populacionais (Lovette *et al.*, 1999; Mamuris *et al.*, 2001; Perwitasari-Farjallah, 2001; Ittig *et al.*, 2002; Papasotiropoulos *et al.*, 2002; entre outros).

A análise do DNA mitocondrial de *P. mulata* e *P. helleri* foi realizada com base nos padrões de bandas PCR+RFLP e não por sítios de restrição, pelo fato de que os sítios de *Dra* I e *Hinf* I não puderam ser mapeados em todos fragmentos estudados. A co-migração de bandas de tamanho pequeno (100 a 50 pb) em fragmentos como 5612R/tPheF (Figuras 5 e 13) não permitiu a visualização de todas bandas geradas e conseqüentemente, a realização de duplas digestões não produziram resultados que nos permitissem inferir corretamente a posição dos sítios. A utilização de géis de poliacrilamida poderia ser uma alternativa para a visualização de fragmentos de tamanho pequeno. Entretanto, a utilização de *primers* heteroespecíficos incorreu na amplificação de bandas inespecíficas, não observáveis em géis de agarose, porém muito bem resolvidas no gel de poliacrilamida, as quais se confundiam com as bandas esperadas, dificultando a análise dos resultados. Desta forma, as bandas consideradas nas análises estatísticas foram apenas aquelas visíveis em géis de agarose 2%, mesmo que tal procedimento incorresse em subestimação da variabilidade genética.

O PCR+RFLP de quatro fragmentos do DNAm_t das espécies estudadas evidenciou características interessantes dos genomas mitocondriais de ambas como, a presença de sítio *Cla* I no fragmento COI-III/mtD18 de *P. helleri* e ausência deste em *P. mulata*. Ainda, sítios de restrição se mostraram característicos para Meliponini como *Bcl* I, *Cla* I, *Hae* III e *Hind* III, pois se apresentaram monomórficos em ambas espécies. Mostrou-se também que o sítio *Cla* I, do fragmento mtD7/COI-IIR, é realmente diagnóstico do gênero em relação a outros Meliponini como *Plebeia* (Francisco *et al.*, 2001) e *Melipona* (Weinlich *et al.*, 2004), os quais já tiveram os sítios de restrição mapeados, tal como discutido na publicação (Anexo 1, item 2).

A variabilidade haplotípica foi discrepante visto que *P. mulata* apresentou apenas dois haplótipos enquanto que *P. helleri* apresentou dez, mesmo tendo sido estudado um menor número de colônias. Outro aspecto é que os haplótipos de ambas espécies são espécie-específicos, com divergência de seqüência de nucleotídeos entre pares de haplótipos (*d*) variando entre 1,44% a 2,19% interespecies. A figura 22 ilustra a distância genética observada entre os haplótipos de *P. mulata* e *P. helleri*.

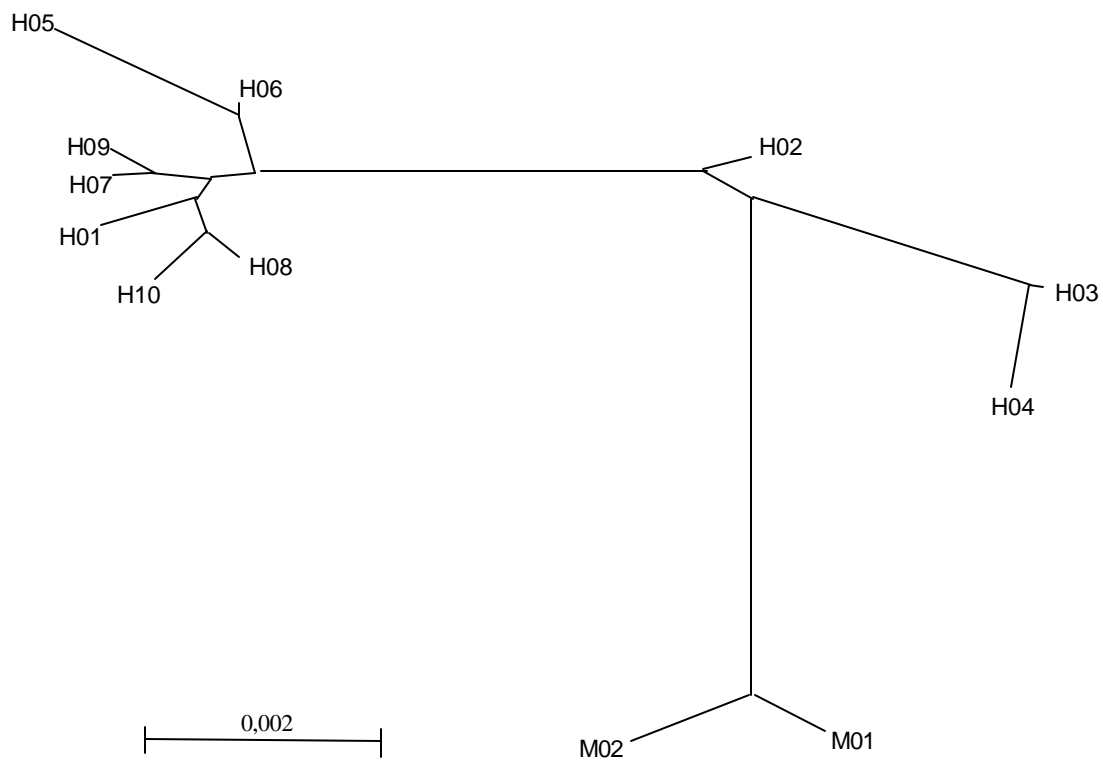


Figura 22. Fenograma obtido pelo método de Evolução Mínima a partir de valores de *d*, relacionando todos os haplótipos obtidos nas 10 populações de *Partamona*. H: haplótipos de *P. helleri*; M: haplótipos de *P. mulata*.

O estudo evolutivo do gênero *Partamona* realizado por Pedro e Camargo (2003) apontou que eventos de vicariância na região neotropical, datadas do período Cretáceo, podem explicar a divergência de algumas espécies. Como por exemplo, a separação das espécies dos grupos *bilineata/epiphytophyla* distribuídas nas regiões da América Central, na região dos Andes e sudoeste da Amazônia (**Chocó-CA** e **SWAm**) das demais regiões da América do Sul (Figura 23-1). Nesta área, um evento de disjunção trans-/cisandina teria separado posteriormente as terras do oeste do Equador até o México, isolando as espécies do grupo *bilineata* no componente **Chocó-CA** (Figura 23-2). Uma outra disjunção bastante evidente teria separado a porção atlântica (**Atl**) das demais regiões (**NAm** e **SEAm**), a qual teria ocorrido por conexões aquáticas entre as bacias do Parnaíba e Paraná no Cretáceo médio segundo Amorim e Pires (1996) (Figura 23-3). Desta forma, a separação de *P. helleri*, distribuída na porção atlântica, em relação às espécies distribuídas na porção denominada como **SEAm** (sudeste da Amazônia) por Camargo e Pedro (2003), seria antiga. Com relação às áreas **NAm** e **SEAm** (onde *P. mulata* está distribuída), Camargo e Pedro (2003) afirmam que não há dados suficientes que possam esclarecer os endemismos aí observados. A discrepante diferença entre as variabilidades haplotípicas observadas entre *P. mulata* e *P. helleri* corroboram que a primeira é uma espécie bem mais recente que a segunda.

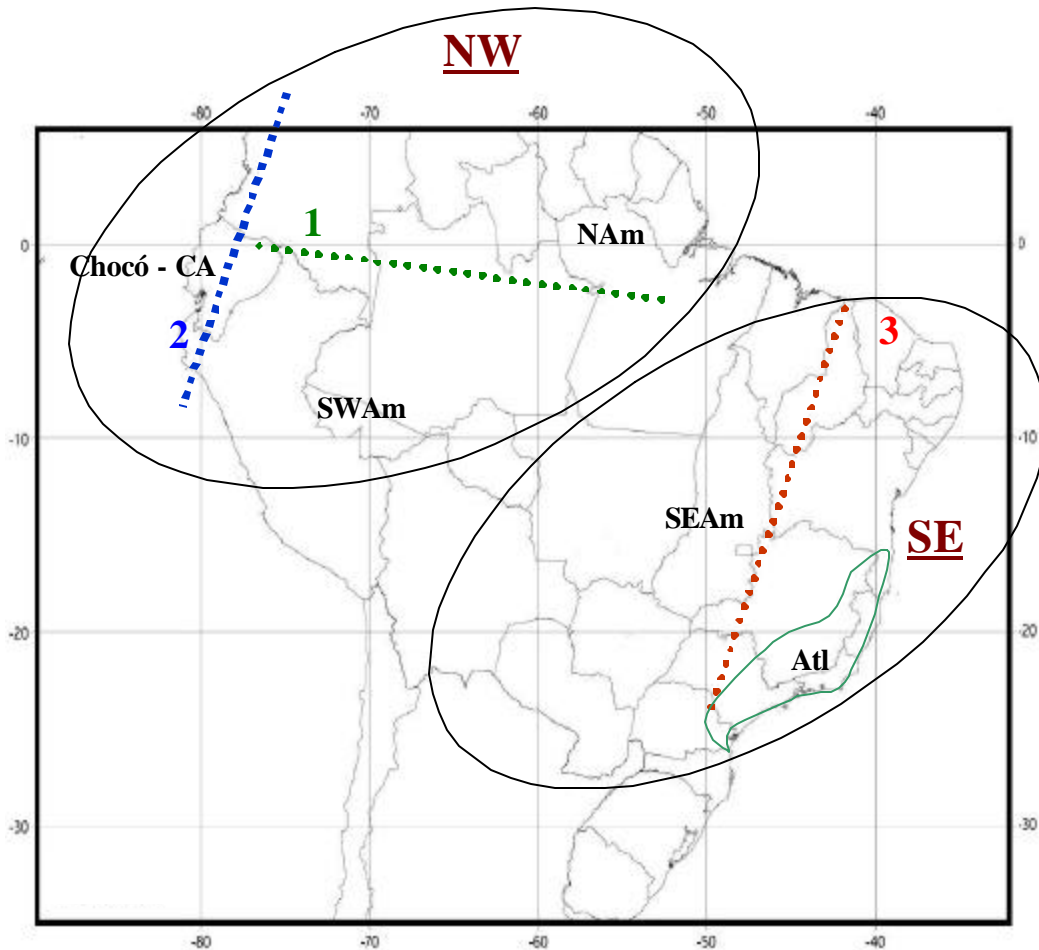


Figura 23. Mapa parcial da América do Sul apresentando parte dos componentes biogeográficos que integram a região Neotropical (Revisado por Camargo e Pedro, 2003). **NW**: noroeste da América do Sul; **SE**: Sudeste da América do Sul. **SWAm**: sudoeste da Amazônia; **Chocó-CA**: noroeste dos Andes até o Panamá; **NAm**: norte dos rios Negro e Amazonas – cráton Brasil/Guianas; **SEAm**: região ao sul dos rios Madeira/Amazonas, incluindo todo o Brasil central e nordeste, até o noroeste da Argentina; **Atl**: região atlântica, Bahia ao Paraná. Linhas pontilhadas apresentam principais eventos de vicariância postulados como possíveis responsáveis pelas disjunções observadas entre os grupos de *Partamona*, em ordem crescente do mais antigo para o mais recente segundo Camargo e Pedro (2003). **Elipses**: Traçados biogeográficos principais da América do Sul. **NW**: traçado noroeste; **SE**: traçado sudeste.

Segundo Pedro e Camargo (2003) um dos maiores problemas para uma análise filogenética consistente do gênero *Partamona* reside na falta de caracteres morfológicos informativos. Tal dificuldade é refletida no cladograma obtido para as 33 espécies do gênero pelos autores, em que os dados permitiram apenas a identificação de cinco clados monofiléticos principais: *testacea*, *bilineata/epiphytophyla*, *musarum*, *nigrior* e *cupira*. Neste último estão incluídas as espécies estudadas no presente trabalho. Posteriormente, estes autores obtiveram um cladograma com relações interespecíficas melhor resolvidas utilizando dados de arquitetura de ninhos (Camargo e Pedro, 2003). Um desses caracteres foi o substrato de nidificação: associação ou não de ninhos com termiteiros. Esse tratamento resultou na hipótese de monofilia para as espécies termitófilas (como *P. mulata*). Excetuando as espécies distribuídas a oeste dos Andes e na região sudoeste da Amazônia (SWAm), as demais espécies de *Partamona* são termitófilas. A única exceção é *P. helleri*, endêmica da região sudeste brasileira, que nidifica em uma ampla variedade de substratos, desde frestas de paredes até ninhos livres construídos de barro. Tal observação resultou na hipótese de que *P. helleri* constituiu-se em um ramo basal, irmão de todas as espécies termitófilas (Camargo e Pedro, 2003). Os dados de DNAm evidenciaram a distância filogenética entre *P. helleri* e *P. mulata*, visto os valores de *d*. Além disso, os dados se mostraram informativos para futuras análises filogenéticas entre as outras espécies de *Partamona*, o que pode definir melhor as relações inter-específicas observadas nos cladogramas obtidos por meio das análises morfológicas e comportamentais.

Os índices de diversidade haplotípica e nucleotídica (pág. 46 e Tabela 27) mostraram estatisticamente que a variabilidade genética das duas espécies difere, sendo menor em *P. mulata* do que em *P. helleri*. Tal diferença pode estar relacionada com a

distribuição geográfica das espécies, bem mais ampla em *P. helleri* do que em *P. mulata*. No entanto, os dados de paleobiogeografia e as diferenças comportamentais entre as espécies indicam que a divergência de *P. helleri* das demais espécies termitófilas é antiga, o que torna a conclusão a respeito desta questão não resolvida.

4.2.3.3.2. MICROSSATÉLITES

A diferença interespecífica refletida no DNAm_t também foi observada nos locos microssatélites. Alelos espécie-específicos foram observados para *P. mulata* nos locos Mbi201 (134), Mbi278 (106), Mbi522 (132) e T4-171(106, 108, 110) e para *P. helleri*, Mbi32 (138), Mbi215 (88), Mbi218 (118), Mbi278 (102) e T4-171 (118).

Uma comparação entre os índices estatísticos obtidos para as duas espécies, bem como para *Plebeia remota* (Francisco, 2002) e *Apis cerana* (Sittipraneed *et al.*, 2001) podem ser observados na tabela 47.

Tabela 47. Comparação entre resultados de análises estatísticas populacionais entre *Apis cerana* (Sittipraneed *et al.*, 2001), *Plebeia remota* (Francisco, 2002), *P. mulata* e *P. helleri*. * Média.

	<i>A. cerana</i>	<i>Plebeia remota</i>	<i>P. mulata</i>	<i>P. helleri</i>
N° amostral	257	71	58	47
N.º de locos estudados	12	7	9	9
A*	5 a 9,3	1,9 a 2,6	2,0	1,33 a 1,56
PLP*	-	42,86 a 71,43%	25 a 50%	22,22 a 55,56%
Ho*	0,18 a 0,41	0,153 a 0,302	0,176 a 0,251	0,118 a 0,219
EHW	Não pan-mixia	Não pan-mixia	Não pan-mixia	Não pan-mixia
F_{ST}	Altamente estruturadas	-	Estruturação discreta	Estruturação discreta
(Chord)	-0,020 a 0,094	0,119 a 0,242	0,111 a 0,247	0,084 a 0,350

Podemos verificar que os índices de variabilidade genética como número médio de alelos por loco (A), porcentagem de locos polimórficos (PLP), heterozigose média (H_o) não diferem de forma significativa entre as duas espécies de *Partamona*. Porém comparando esses dados com os de *P. remota*, único meliponínio estudado em nível populacional até o presente, a variabilidade de ambas espécies é menor. E em comparação com *A. cerana*, a variabilidade é de fato baixa. Essa diferença pode estar relacionada com o maior número amostral das outras espécies em comparação com as *Partamona*. Nos três estudos foram usados *primers* heteroespecíficos, porém para *A. cerana*, os *primers* eram de uma outra espécie do mesmo gênero (*A. mellifera*). Isto pode ter contribuído para a alta variabilidade genética encontrada em vista da menor probabilidade de obtenção de alelos nulos.

Não foi possível relacionar a variabilidade genética de locos microssatélites observada em *P. mulata* e *P. helleri* com a área de distribuição geográfica das espécies. Apesar de *P. mulata* apresentar-se distribuída em uma área menor do que *P. helleri*, a variabilidade genética de ambas foi similar. A baixa variabilidade encontrada em ambas espécies pode estar relacionada com a intensa degradação de seus habitats, do cerrado para a abertura de áreas de produção agrícola ou de pastagens, e da Mata Atlântica para exploração de madeira e pelo crescimento de áreas urbanas. É necessário investigar, porém, se a baixa diversidade genética observada se deve a homoplasias de tamanho de alelos ou alelos nulos, o que só poderá ser esclarecido com a obtenção de *primers* específicos para *Partamona*. Apesar de discreta, detectou-se estruturação entre as populações de ambas espécies inclusive com a presença de alelos exclusivos em algumas populações. Isto sugere que as extinções locais de populações ameaçam o patrimônio genético de *P. mulata* e *P. helleri*.

4.3. RELAÇÃO DE PARENTESCO

Segundo Wilson (1971), para uma espécie ser considerada social esta deve apresentar as seguintes características: cooperação e cuidado com os jovens; divisão de trabalho, com operárias estéreis trabalhando em benefício dos reprodutivos; sobreposição de gerações. O altruísmo reprodutivo teria sido facilitado pela alterada e assimétrica relação genética entre parentais e a prole, e entre os irmãos. Isso se deve ao sistema haplo-diplóide de determinação do sexo dos Hymenoptera, em que operárias filhas de acasalamento monogâmico da rainha, partilham $\frac{3}{4}$ de seus alelos. Portanto, operárias partilham mais genes com as irmãs do que com possíveis filhos o que aumenta o *inclusive fitness* das mesmas.

Entretanto esta hipótese se torna pouco sustentada quando se considera que fêmeas reprodutivas possam ser multi-fertilizadas (poliandria) e/ou quando múltiplas rainhas põem ovos num mesmo ninho (poliginia). Nesses casos, a média genética de parentesco entre operárias de uma colônia é dramaticamente diminuída (Avisé, 1994). No caso de espécies que apresentam poliandria como *Apis mellifera*, uma série de conflitos intracolônia é observada como por exemplo o *worker policing* (policimento de postura de ovos de operárias por outras operárias). Acredita-se que em abelhas sem ferrão a rainha seja fertilizada por apenas um macho, uma vez que estas abelhas não apresentam tais conflitos intracolônia. Em vista dessa peculiaridade, pesquisadores têm se interessado em identificar geneticamente a relação de parentesco entre abelhas de uma mesma colônia de Meliponini (Peters *et al.*, 1999; Paxton *et al.*, 1999b; Francisco, 2002).

O coeficiente de parentesco é a correlação entre o valor genético de dois indivíduos quaisquer e foi inicialmente definido por Wright (1922). O estudo da relação de parentesco foi realizado para *P. mulata* e *P. helleri*, por meio da genotipagem de dez indivíduos de dez colônias distintas de cada espécie. Foram analisados os locos Mbi278, T3-32 e T4-171 de *P. mulata*, duas colônias por população (**Cac; Poc; Cba; Sal; Cgd**) e em *P. helleri*, foram estudados os locos Mbi215, Mbi278 e T4-171, também duas colônias por população (**SC, SP, MG, ES e BA**). Os genótipos obtidos podem ser vistos nas tabelas 48 e 49. Em *P. mulata*, todos os alelos encontrados já haviam sido detectados na análise populacional (Tabelas 9 e 48). Para *P. helleri*, no entanto, foi detectado um alelo do loco T4-171 (B) que não havia sido observado na população (Figura 24, Tabelas 32 e 49).

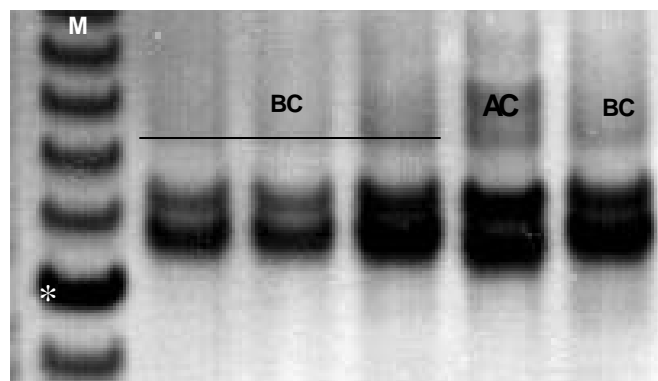


Figura 24. Fracionamento em gel de poliacrilamida 9% de fragmentos amplificados do loco **T4-171** de *P. helleri*, colônia Ph01. **M**: marcador de peso molecular 10 pb *ladder*. (*: 100pb). Os genótipos correspondentes às bandas observadas estão descritos acima das mesmas.

Tabela 48. Genótipos observados para os locos Mbi278, T3-32 e T4-171; número de patrilíneas estimadas e grau de parentesco observado entre indivíduos de uma mesma colônia de *P. mulata*.

Colônia	Indivíduo	Mbi278	T3-32	T4-171	Patrilíneas	Parentesco
M04	1	AA	CC	GF	1	0,75
	2	AA	CC	GF		
	3	AA	BC	GF		
	4	AA	BC	GF		
	5	AA	BC	GF		
	6	AA	BC	GF		
	7	AA	BC	GF		
	8	AA	BC	GF		
	9	AA	BC	GF		
	10	AA	CC	GF		
M08	1	AA	AB	GG	1	0,75
	2	AA	AB	GG		
	3	AA	AB	GF		
	4	AA	AB	GF		
	5	AA	AB	GF		
	6	AA	AB	GF		
	7	AA	AB	GF		
	8	AA	AB	GG		
	9	AA	AB	GG		
	10	AA	AB	GG		
M34	1	AB	AB	AG	1	0,75
	2	AB	AB	AH		
	3	AB	AB	AH		
	4	AB	AB	AH		
	5	AB	AB	AH		
	6	AB	AB	AG		
	7	AB	AB	AH		
	8	AB	AB	AH		
	9	AA	AB	AH		
	10	AA	AB	AH		
M49	1	AB	BB	GF	1	0,75
	2	AB	BC	GF		
	3	AB	BC	FF		
	4	AB	BC	GF		
	5	AB	BC	GF		
	6	AB	BC	GF		
	7	AB	BC	GF		
	8	AB	BC	FF		
	9	AB	BC	FF		
	10	AB	BC	GF		
M12	1	AA	AB	BF	1	0,75
	2	AA	AB	BF		
	3	AA	AB	BF		
	4	AA	AB	BF		
	5	AA	AB	BF		
	6	AA	AB	BF		
	7	AA	AB	BF		
	8	AA	AB	BF		
	9	AA	AB	BF		
	10	AA	AB	BF		

Tabela 48. Continuação.

Colônia	Indivíduo	Mbi278	T3-32	T4-171	Patrilineas	Parentesco
M15	1	AA	BC	CC	1	0,75
	2	AA	BC	GC		
	3	AA	CC	GC		
	4	AA	BC	GC		
	5	AA	BC	GC		
	6	AA	CC	GC		
	7	AA	BC	GC		
	8	AA	CC	GC		
	9	AA	CC	GC		
	10	AA	CC	GC		
M33	1	AA	AB	GF	1	0,75
	2	AA	BC	GF		
	3	AA	BC	GF		
	4	AA	BC	GF		
	5	AA	AB	GF		
	6	AA	BC	GF		
	7	AA	AB	GF		
	8	AA	AB	GF		
	9	AA	AB	GF		
	10	AA	AB	GF		
M44	1	AA	BC	CF	1	0,75
	2	AA	BC	CF		
	3	AA	AB	CF		
	4	AA	AB	CF		
	5	AA	AB	CF		
	6	AB	BC	CF		
	7	AB	BC	AF		
	8	AB	AB	AF		
	9	AB	BC	AF		
	10	AA	BC	CF		
M46	1	AA	BC	AC	1	0,75
	2	AA	BC	CC		
	3	AA	BC	CC		
	4	AA	BC	AC		
	5	AA	BC	AC		
	6	AA	BC	CC		
	7	AA	BC	CC		
	8	AA	BC	AC		
	9	AA	BC	CC		
	10	AA	BC	AC		
M55	1	AA	BC	AF	1	0,75
	2	AA	BB	AF		
	3	AA	BB	AF		
	4	AA	BC	AC		
	5	AA	BB	AC		
	6	AA	BC	AF		
	7	AA	BC	AC		
	8	AA	BB	AC		
	9	AA	BC	AF		
	10	AA	BC	AF		

Tabela 49. Genótipos observados para os locos Mbi215, Mbi278 e T4-171; número de patrilíneas estimadas e grau de parentesco observado entre indivíduos de uma mesma colônia de *P. helleri*.

Colônia	Indivíduo	Mbi215	Mbi278	T4-171	Patrilíneas	Parentesco
Ph01	1	AB	AA	AC	2	0,5
	2	BB	BB	BC		
	3	BB	BB	BC		
	4	BB	BB	BC		
	5	BB	BB	AC		
	6	BB	AB	BC		
	7	BB	BB	AC		
	8	BB	BB	BC		
	9	BB	AB	BC		
	10	BB	AB	AC		
Ph02	1	AA	AB	AC	1	0,75
	2	AA	AB	AC		
	3	AA	AB	AC		
	4	AA	BB	AC		
	5	AA	AB	AC		
	6	AA	AB	AC		
	7	AA	AB	AC		
	8	AA	AB	AC		
	9	AA	AB	AC		
	10	AA	AB	AC		
Ph06	1	AB	AA	AC	1	0,75
	2	AB	AA	AC		
	3	AB	AA	AC		
	4	AB	AA	AC		
	5	AB	AA	AC		
	6	AB	AA	AC		
	7	AB	AA	AC		
	8	AB	AA	AC		
	9	AB	AA	AC		
	10	AB	AA	AC		
Ph22	1	AA	BB	AC	1	0,75
	2	AA	AB	AC		
	3	AA	AB	AC		
	4	AA	AB	AC		
	5	AA	BB	AC		
	6	AA	AB	AC		
	7	AA	BB	AC		
	8	AA	BB	AC		
	9	AA	BB	AC		
	10	AA	AB	AC		
Ph29	1	BB	BB	AC	2	0,5
	2	AA	AB	AC		
	3	AA	AB	AC		
	4	AA	BB	AC		
	5	AA	BB	AC		
	6	AB	BB	AC		
	7	AB	AB	AC		
	8	BB	AB	AC		
	9	BB	AB	AC		
	10	BB	BB	AC		

Tabela 49. Continuação

Colônia	Indivíduo	Mbi215	278	T4-171	Patrilineas	Parentesco
Ph30	1	BB	BB	AC	2	0,5
	2	AA	BB	AC		
	3	AA	BB	AC		
	4	AA	AB	AC		
	5	AA	AB	AC		
	6	BB	BB	AC		
	7	AA	BB	AC		
	8	AB	BB	AC		
	9	AB	AB	AC		
	10	AB	AB	AC		
Ph32	1	BB	BB	AC	1	0,75
	2	AB	AB	AC		
	3	BB	AB	AC		
	4	BB	AB	AC		
	5	BB	AB	AC		
	6	BB	AB	AC		
	7	AB	BB	AC		
	8	AB	BB	AC		
	9	AB	AB	AC		
	10	AB	BB	AC		
Ph35	1	BB	AB	AC	1	0,75
	2	BB	AB	AC		
	3	BB	AB	AC		
	4	BB	AB	AC		
	5	BB	AB	AC		
	6	BB	AB	AC		
	7	BB	AB	AC		
	8	BB	AB	AC		
	9	AB	AB	AC		
	10	AB	AB	AC		
Ph40	1	BB	AB	CE	1	0,75
	2	BB	AB	CE		
	3	BB	AB	BC		
	4	BB	AB	CE		
	5	BB	AB	CE		
	6	BB	AB	CE		
	7	BB	AB	BC		
	8	BB	AB	BC		
	9	BB	AB	BC		
	10	BB	AB	BC		
Ph47	1	AB	AB	AC	1	0,75
	2	AB	AB	AC		
	3	AB	BB	AC		
	4	AB	AB	AC		
	5	AB	AB	AC		
	6	AB	BB	AC		
	7	AB	BB	AC		
	8	AB	AB	AC		
	9	AB	AB	AC		
	10	AB	BB	AC		

Apenas observando os genótipos de *P. mulata* já podemos concluir que um único macho fertilizou as rainhas desta espécie. Tal conclusão vem da observação de no máximo três alelos por colônia para todos os locos estudados, um do macho hemizigoto e outros dois da rainha heterozigota, como por exemplo, na colônia M55 proveniente de Campo Grande (Tabela 48).

Para *P. mulata*, foi observada apenas uma patrilinea em todas colônias, com 5% de probabilidade de se aceitar essa hipótese e esta ser incorreta. Portanto, nas dez colônias analisadas, os indivíduos apresentaram $r = 0,75$ (Tabela 48).

Tal como para *P. mulata*, *P. helleri* apresentou no máximo, três alelos por colônia (Tabela 49). No entanto, algumas colônias apresentaram genótipos não concordantes com a hipótese de monoandria, ou seja, que apenas um macho teria fecundado a rainha, como: Ph01 (Mbi278), Ph29 (Mbi215) e Ph30 (Mbi215) (Tabela 49). Para que apenas um macho tivesse fecundado a rainha, deveríamos observar pelo menos um alelo comum a todos os indivíduos analisados para o mesmo loco. Isso porque, sendo hemizogotos, os machos doam sempre o mesmo alelo para seus descendentes. O grau de parentesco destas colônias foi então calculado em 0,5, pois foram estimadas duas patrilineas responsáveis pelos genótipos observados. Todas as outras colônias apresentaram apenas uma patrilinea e $r = 0,75$.

Estudos de parentesco foram realizados em abelhas da tribo Meliponini por Peters *et al.* (1999). Estes autores verificaram para 13 espécies dos gêneros *Lestrimellita*, *Melipona* (três espécies), *Nanotrigona*, *Paratrigona*, *Partamona*, *Plebeia*, *Scaptotrigona* (duas espécies), *Schwarziana*, *Tetragona* e *Trigona*, que apenas um macho havia fecundado as rainhas daquelas espécies, visto que todas apresentaram grau de parentesco em torno de 75%. Estes autores foram os primeiros a utilizarem

marcadores microssatélites em *Partamona* (*P. aff. cupira*) e, analisando 12 colônias provenientes do Panamá, encontraram no máximo dois alelos por loco e grau de parentesco de 80% entre as operárias.

Caso realmente apenas um macho fecunde a rainha de *Partamona* como sugere Peters *et al.* (1999), uma possível explicação para a presença de genótipos discordantes com a hipótese de monoandria em *P. helleri* seria a recente substituição da rainha. Por exemplo, na colônia Ph29, para o loco Mbi215 (Tabela 49), a primeira rainha poderia ser AB e ter sido fecundada por um macho B, originando uma prole composta por operárias AB ou BB. Se a rainha antiga tivesse sido substituída por outra rainha AB que tenha sido fecundada por um macho A, veríamos na prole indivíduos AA ou AB. Assim, durante a transição, observaríamos operárias AB, BB e AA na prole.

A inclusão de machos na amostra também poderia produzir tal resultado. Entretanto, uma rigorosa triagem das abelhas foi realizada antes da extração de DNA para a composição dos grupos, o que descarta essa hipótese. Uma outra possibilidade seria que indivíduos de colônias diferentes tivessem sido coletados como sendo de um mesmo ninho. Na tentativa de evitar esse problema, as coletas foram realizadas capturando-se indivíduos que saíam de dentro dos ninhos em decorrência de uma perturbação provocada. No entanto, esse procedimento não inviabiliza necessariamente tal possibilidade.

Paxton *et al.* (1999b) identificaram até duas possíveis patrilíneas em *Melipona becheei* e até seis em *Scaptotrigona postica* e propôs que a poliandria talvez seja uma característica amplamente difundida entre os Meliponini. Os autores embasaram tal afirmação citando as observações de Imperatriz-Fonseca *et al.* (1998) de múltiplos acasalamentos em *Tetragonisca angustula* registrados em vídeo, e refutando variáveis

que possam levar a um reconhecimento de falsa poliandria em ninhos de abelhas sem ferrão como:

1. Entrada de abelhas de outros ninhos nas colônias: rejeitaram a hipótese porque verificaram mais de uma patrilínea também em abelhas provenientes de um favo de *S. postica* e não só nos adultos;
2. Alelos nulos não deveriam ter sido observados visto que a maioria das abelhas analisadas era heterozigota;
3. Substituição recente de rainha seria possível, porém estas vivem um tempo muito longo, bem maior do que suas filhas operárias.

Paxton *et al.* (1999b) também citam a presença de conflitos, característicos de espécies poliândricas, entre operárias de *M. subnitida*, observados por Koedam *et al.* (1998), para corroborar sua hipótese de que múltiplos acasalamentos sejam comuns em Meliponini. Em *Partamona*, interações entre operárias e destas com a rainha foram analisadas por Azevedo e Zucchi (2000). Não foram observados comportamentos agressivos entre as nove espécies estudadas, incluindo *P. mulata* e *P. helleri*.

Segundo Ross (2001), a poliandria seria seletivamente favorável para as colônias de Hymenoptera visto que o aumento da variabilidade genética acentuaria a divisão de trabalho ou a resistência a parasitas, ou minimizaria os efeitos deletérios da produção de machos estéreis (diplóides). De acordo com Wiernasz *et al.* (2004), o efeito de múltiplos acasalamentos no fenótipo das colônias teria um benefício material para a rainha, em que o aumento da variabilidade genética entre as operárias aumentaria as chances de sobrevivência da colônia, resultando em maior tempo de vida e maior sucesso reprodutivo.

Acreditamos que antes de afirmarmos que de fato há múltipla fecundação de rainhas de *P. helleri*, seja necessário um estudo mais amplo com a transferência de colônias para caixas de observação, amostragens periódicas durante um longo período e marcação da rainha para acompanhamento de possível substituição.

5. Conclusões

Com bases nos objetivos propostos para o presente trabalho e nos resultados obtidos das análises populacionais de *P. mulata* e *P. helleri*, é possível concluir que:

1. A técnica de PCR+RFLP foi eficiente para o mapeamento dos sítios de restrição no genoma mitocondrial de *P. mulata* e *P. helleri* (Anexo 1). Os mapas parciais obtidos poderão servir futuramente para comparações interespecíficas e desta forma contribuir para o melhor entendimento das relações interespecíficas do gênero *Partamona* e entre os Meliponini em geral;
2. O PCR+RFLP também foi eficiente na identificação de haplótipos mitocondriais em *P. mulata* e *P. helleri*. A baixa diversidade haplotípica de *P. mulata* pode estar relacionada com afunilamentos populacionais recentes e colonização de áreas a partir de um único refúgio, possivelmente a partir do pediplano cuiabano. Em *P. helleri* foram identificados dez haplótipos distribuídos de forma descontínua ao longo da distribuição geográfica. A distribuição filogeográfica destes haplótipos sugere que as populações desta espécie estiveram em contato no passado e que a fragmentação das áreas no período glacial teria isolado populações, que acumularam mutações no DNAmT dando origem a haplótipos locais exclusivos. A dispersão de haplótipos também pode ter ocorrido no sentido norte-sul após a última glaciação do Pleistoceno visto o compartilhamento de um haplótipo por três populações;

3. O fluxo gênico em *P. mulata* ou ocorreu via fêmea ou a espécie é muito recente visto que as populações se apresentaram indiferenciadas com base no DNAm. Em *P. helleri* postulou-se que se há migração nos dias atuais entre populações este deve ser via machos, pois as populações estão diferenciadas em nível de DNAm e pouco estruturadas com base nos microssatélites, o que é prontamente observável pela comparação entre os índices de F_{ST} do DNAm e microssatélites;

4. As variabilidades genéticas de *P. mulata* e *P. helleri* diferiram quanto ao DNAm, porém foram muito semelhantes quanto aos locos microssatélites. Não foi possível concluir se a diferença no tamanho das distribuições geográficas de ambas espécies tem relação com este resultado. A obtenção de *primers* homoespecíficos para *Partamona* pode auxiliar no refinamento desses dados, pois pode responder se a baixa variabilidade genética encontrada nas espécies é devido a alelos nulos ou se o tamanho das áreas de distribuição, bem como a degradação das coberturas vegetais em suas áreas de endemismo, estão afetando de fato a estrutura genética das populações destas espécies;

5. Em *P. mulata* foi possível observar que apenas um macho fecundou as rainhas das colônias estudadas indicando que esta espécie é monoândrica. Entretanto, em *P. helleri* foram observadas duas patrilineas em algumas colônias. Acreditamos que um estudo mais aprofundado deva ser realizado para a confirmação da possível poliandria desta espécie, com acompanhamento de colônias a fim de se testar a hipótese de substituição recente de rainhas.

6. RESUMO

O gênero *Partamona* compreende 33 espécies, distribuídas do sul do México ao sul do Brasil. O gênero tem sido amplamente estudado em diferentes níveis: citogenético, etológico e morfológico. O presente trabalho teve como objetivo contribuir com dados moleculares para o conhecimento do grupo, realizando estudos populacionais por meio da caracterização do DNA mitocondrial por PCR+RFLP e da análise de regiões de microssatélites do DNA genômico de duas espécies: *P. mulata* de distribuição restrita ao sul de Mato Grosso e norte do Mato Grosso do Sul, e *P. helleri* de distribuição mais ampla, do sul da Bahia até Santa Catarina. Foram detectados apenas dois haplótipos em *P. mulata*, os quais diferiram entre si por apenas um sítio de restrição. As análises estatísticas demonstraram não haver estruturação entre as populações sugerindo que esta espécie possa ter passado por recente afunilamento populacional. Em *P. helleri* foram observados dez haplótipos sendo alguns exclusivos e outros compartilhados. Análises estatísticas apontaram alta estruturação entre as populações e a distribuição filogeográfica observada sugere um possível isolamento por fragmentação da Mata Atlântica durante o Pleistoceno. A análise dos locos microssatélites mostrou baixa variabilidade genética em ambas espécies e discreta estruturação entre as populações, não relacionada com a distribuição geográfica das mesmas. Isto pode ser consequência de migração de machos entre populações visto que as rainhas são filopátricas ou, fragmentação dos habitats pela rápida degradação do cerrado e da Mata Atlântica, ou por alelos nulos causados pelo uso de *primers* heteroespecíficos. A análise de parentesco entre abelhas de um mesmo ninho apontou a existência de apenas uma patrilinea em *P. mulata* sugerindo monoandria para esta espécie. Foram encontradas duas patrilineas em algumas colônias de *P. helleri*, o que pode ser resultante de fecundação por mais de um macho ou substituição recente da rainha. A caracterização parcial do DNAm_t de duas espécies de *Partamona* poderá contribuir em estudos filogenéticos tanto do gênero quanto de outras espécies de Meliponini. A análise populacional mostrou o *status* da variabilidade genética das espécies, suas possíveis histórias evolutivas e a possível relação desta com degradação dos ambientes onde estas estão distribuídas.

7. ABSTRACT

The *Partamona* genus comprises 33 species distributed from south Mexico to south Brazil. This genus has been studied at different levels: cytogenetical, ethological and morphological. This work aimed at to contribute with molecular data for the knowledge about the group performing a population study employing the PCR+RFLP of mtDNA, and analysis of microsatellite loci from nuclear DNA of two species, *P. mulata* which is distributed in south Mato Grosso and north Mato Grosso do Sul, and *P. helleri* which geographic distribution is wider, from Santa Catarina to southern Bahia. It was detected two haplotypes in 58 colonies of *P. mulata*, each one differing by one single restriction site. The statistical analyses indicated no differentiation among populations suggesting that the species could have passed through a recent populational bottleneck. It was observed ten haplotypes in 47 colonies of *P. helleri*, some exclusive and others shared among populations. Statistical analysis pointed high population differentiation and the observed phylogeography distribution suggested a possible recent isolation probably by Atlantic Forest fragmentation during the Pleistocene. The microsatellite analysis showed low genetic variability in both species and discrete population structuring, not related to the geographic distribution. This might be consequence of migration of males, since the queens are highly phylopatric, or habitat fragmentation by degradation of savanna and Atlantic forest areas, or null alleles caused by the use of heterospecific *primers*. The relatedness investigation revealed only one patriline in nest mates of *P. mulata* that suggests monoandry for this species. It was found two patrilines in *P. helleri* that can be resulted from more than one mating or recent queen replacement. The partial characterization of the mtDNA of two *Partamona* species can contribute to further phylogenetic studies among bees of this genus or among other Meliponini species. The populational analysis showed the genetic variability status of the species, their putative evolutionary histories and the possible relation between the results and the environmental degradation in their distribution areas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SABER A.N. 1979. Os mecanismos da desintegração das paisagens tropicais no Pleistoceno. **Paleoclimas**, 8: 1-11.
- AB'SABER A.N. 1988. O Pantanal mato-grossense e a teoria dos refúgios. **Rev. Brasil Geogr.**, 50 (n° esp. t. 2): 9-57.
- AIDAR D.S. 1996. A mandaçaia. **Biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Série Monografias**. Ed. SBG, Ribeirão Preto.
- AMORIM D.S., PIRES M.R.S. 1996. Neotropical biogeography and method for maximum biodiversity estimation. "In": **Biodiversity in Brazil, a first approach** (eds. Bicudo C.E., Menezes N.A.). 183-219. CNPq, São Paulo.
- ARIAS M.C., SOARES A.E.E., NOBREGA F.G. 1990. Improvements to the mitochondrial restriction maps for Italian and Africanized honey bees. **Brazilian Journal of Genetics**, 13: 501-507.
- ARIAS M.C., SHEPPARD W.S. 1996. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. **Mol. Phylogen. Evol.**, 5: 557-566.
- ARIAS M.C., INFANTE-MALACHIAS M.E. 2001. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. "In": **Biologia Molecular e Evolução** (ed. Matioli S.R.) 143-152. Holos Editora, Ribeirão Preto.
- ARIAS M.C., SOARES A.E.E., NÓBREGA E F.G. 1990. Improvements to the mitochondrial restriction maps for italian and africanized honey bees. **Rev. Brasil. Genet.**, 13: 501-507.

- ARIAS M.C., FRANCISCO F.O., SILVESTRE D. 2003. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. "In": **Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure** (eds. Melo G.A.R., Alves-dos-Santos I.) 306-309.UNESC, Criciúma.
- ARIAS M.C., TINGEK S., KELITU A., SHEPPARD W.S. 1996. *Apis nuluensis* Tingek, Koeniger and Koeniger, 1996 and its genetic relationship with sympatric species inferred from DNA sequences. **Apidologie**, 27: 415-422.
- ARIAS M.C., FRANCISCO F.O., SILVESTRE D., WEINLICH R., SHEPPARD W.S. 1998. Utilização de pares de *primers* específicos para amplificação integral do genoma mitocondrial de abelhas *Apis mellifera*. **Anais do III Encontro Sobre Abelhas**, Ribeirão Preto, Brasil, p. 271.
- AVISE J.C. 1994. **Molecular markers, natural history and evolution**. Chapman and Hall, NY, USA.
- AVISE J.C. 2000. **Phylogeography. The history and formation of species**. Harvard University Press, Boston.
- AVISE J.C., ARNOLD I, BALL R.M., BERMINGHAM E., LAMB T., NIEGEL J.E., REEB C.A., SAUNDERS N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, 18: 489-522.
- AZEVEDO G.G. 1997. **Atividade de vôo e determinação do número de ínstares larvais em *Partamona helleri* (Friese): (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Viçosa, UFV, 64 p. Dissertação de Mestrado (Entomologia). Universidade Federal de Viçosa.
- AZEVEDO G.G. 2001. **Estudo etológico-comparado de alguns táxons de *Partamona Schwarz* e *Parapartamona Schwarz* (Hymenoptera, Apinae, Meliponini)**.

- Ribeirão Preto, USP: 119 p. Tese de doutorado. (Entomologia). Universidade de São Paulo.
- AZEVEDO G.G., ZUCCHI R. 2000. Relações etológicas entre *Partamona* Schwarz e *Parapartamona* Schwarz (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Anais do IV Encontro Sobre Abelhas**. Ribeirão Preto, SP: 258-264.
- BAKER C.S., MEDRANO-GONZALEZ L., CALAMBOKIDIS J., PERRY A., PICHLER F., ROSENBAUM H., STRALEY J.M., URBAN-RAMIREZ J., YAMAGUCHI M. 1998. Population structure of nuclear and mitochondrial DNA variation among humpback whales in the north Pacific. **Mol. Ecol.**, 7: 695-707.
- BALOUX F., LUGON-MOULIN N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Mol. Ecol.**, 11:155-165.
- BANDELT H-J., FORSTER P., RÖHL A. 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Mol. Biol. Evol.**, 16: 37-48.
- BEGO L.R., MAETA Y., TESUKA T., ISHIDA K. 1989. Floral preference and flower constancy of brazilian stingless bee, *Nannotrigona testaceicornis* kept in a greenhouse (Hymenoptera, Apidae). **Bull. Fac. Agric. Shim. Univ.**, 23: 46-54.
- BOORE J.L., COLLINS T.M., STANTON D., DAEHLER L.L., BROWN W.M. 1995. Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements. **Nature**, 376: 163-165.
- BRITO R.M. 1998. **Caracterização citogenética de duas espécies do gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Viçosa, UFV, 103 p. Dissertação de Mestrado (Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa.

- BRITO R.M., COSTA M.A., POMPOLO S.G. 1997. Characterization and distribution of supernumerary chromosomes in 23 colonies of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Brazil. J. Genet.**, 20: 185-188.
- BRITO-RIBON R.M., MIYAZAWA C.S., POMPOLO S.G. 1999. First karyotype characterization of four species of *Partamona* (Friese, 1980) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) in Mato Grosso State – Brazil. **Cytobios**, 100: 19-26.
- BRITO R.M., CAIXEIRO A.P.A., POMPOLO S.G., AZEVEDO G.G. 2003. Cytogenetic data of *Partamona peckolti* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining with DA/CMA3 and DA/DAPI. **Genet. Mol. Biol.**, 26: 53-57.
- BROWER A.V.Z. 1994. Phylogeny of *Heliconius* butterflies inferred from mitochondrial DNA sequences (Lepidoptera: Nymphalidae) **Mol. Phylogenet. Evol.**, 3:159-174.
- BROWN W.M., GEORGE M.JR., WILSON A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **P.N.A.S., USA** 76: 1967-1971.
- BRUNNER P.C., DOUGLAS M.R., BERNATCHEZ L. 1998. Microsatellite and mitochondrial DNA assessment of population structure and stocking effects in Artic charr *Salvelinus alpinus* (Teleostei, Salmonidae) from central alpine lakes. **Mol. Ecol.**, 7:209-223.
- BURNS E.L., ELDRIDGE M.D.B., HOULDEN B.A. 2004 . Microsatellite variation and population structure in a declining Australian hylid *Litoria aurea*. **Mol. Ecol.**, 13: 1745-1757.
- CALLEN D.F., THOMPSON A.D., SHEN Y., PHILLIPS H.A., RICHARDS R.I., MULLEY J.C., SHUTHERLAND G.R. 1993. Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers. **Am. J. Hum. Genet.**, 52: 922-927.

- CAMARGO J.M.F. 1980. O grupo *Partamona* (*Partamona*) *testacea* (Klug): suas espécies, distribuição e diferenciação geográfica (Meliponinae, Apidae, Hymenoptera). **Acta Amaz.**, Supl. 4: 7-175.
- CAMARGO J.M.F. 1996. Meliponini neotropicais (Apinae, Apidae, Hymenoptera): Biogeografia histórica. **Anais do II Encontro sobre abelhas**, Ribeirão Preto, SP. 107-121.
- CAMARGO J.M.F., PEDRO S.R.M. 1992. Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini review. **Apidologie**, 23: 1-32.
- CAMARGO J.M.F., MOURE J.S. 1996. Meliponini neotropicais: o gênero *Geotrigona* Moure, 1943 (Apinae, Apidae, Hymenoptera), com especial referência à filogenia e biogeografia. **Arq. Zool.**, 33: 95-161.
- CAMARGO J.M.F., PEDRO S.R.M. 2003. Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae) – bionomia e biogeografia. **Rev. Brasil. Entomol.**, 47: 311-372.
- CAVALCANTI M.J. 1988. Programa BASIC para teste de associação entre matrizes de distância. **Ciência e Cultura**, 40: 903.
- CAVALLI-SFORZA L.L., EDWARDS A.W.F. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. **Am. J. Hum. Genet.**, 19: 233-257.
- CHAPCO W., KELLN R.A., MCFADYEN D.A. 1992. Intraspecific mitochondrial DNA variation in the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. **Heredity**, 69: 547-557.

- CLARY D.O., WOLSTENHOLME D.R. 1985. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. **J. Mol. Evol.**, 22: 252-271.
- CORNUET J.-M., GARNERY L., SOLIGNAC M. 1991. Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. **Genetics**, 1128: 393-403.
- CORPET F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucl. Acids Res.**, 16: 10881-10890.
- COSTA M.A., POMPOLO S.G., CAMPOS L.A.O. 1992. Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Rev. Brasil. Genet.**, 15: 801-806.
- CROZIER R.H., CROZIER Y.C. 1993. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and the genome organization. **Genetics**, 133: 97-117.
- CROZIER R.H., CROZIER Y.C., MACKINLAY A.G. 1989. The CO-I and CO-II region of honeybee mitochondrial DNA: evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates, **Mol. Biol. Evol.**, 6: 399-411.
- DA SILVA D.L., ZUCCHI R., KERR W.E. 1972. Biological and behavioural aspects of reproduction in some species of *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) **Anim. Behav.**, 20: 123-132,
- DE BRITO R.A., MANFRIN M.H., SENE F.M. 2002. Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzati*. **Genet. Mol. Biol.**, 25: 161-171.

- DE LA RÚA P., GALIÁN J., SERRANO J., MORITZ R.F.A. 2001. Molecular characterization and population structure of the honeybees from the Balearic islands (Spain). **Apidologie**, 32: 417-427.
- DHUYVETTER H., GAUBLOMME E., DESENDER K. 2004. Genetic differentiation and local adaptation in the salt-marsh beetle *Pogonus chalceus*: a comparison between allozyme and microsatellite loci. **Mol. Ecol.**, 13: 1065-1074.
- DOWLING T.E., MORITZ C., PALMER J.D., RIESEBERG L.H. 1996. Nucleic acids III: analysis of fragments and restriction sites. "In": **Molecular Systematics**. 2nd edition (eds. Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K.). 249-320, Sinauer Associates, Massachusetts.
- ESTOUP A., JARNE P., CORNUET J.-M. 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequence for population genetics analysis. **Mol. Ecol.**, 11: 1591-1604.
- ESTOUP A., SOLIGNAC M., HARRY M., CORNUET J.-M. 1993. Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. **Nuc. Ac. Res.**, 21: 1427-1431.
- ESTOUP A., TAILLIEZ C., CORNUET J.-M., SOLIGNAC M. 1995. Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). **Mol. Biol. Evol.**, 12: 1074-1084.
- ESTOUP A., SOLIGNAC M., CORNUET J.-M., GOUDET J., SCHOLL A. 1996. Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. **Mol. Ecol.**, 5: 19-31.
- EXCOFFIER L., SMOUSE P.E., QUATTRO J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, 131: 479-491.

- FORSTER P., TORRONI A., RENFREW C., RÖHL A. 2001. Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. **Mol. Biol. Evol.**, 18: 1864-1881.
- FRANCISCO F.O. 2002 . **Diversidade genética de populações da abelha sem ferrão *Plebeia remota*: análise do DNA mitocondrial e microssatélites**. São Paulo, USP: 140p. Dissertação de mestrado. (Biologia Genética). Universidade de São Paulo.
- FRANCISCO F.O., SILVESTRE D., ARIAS M.C. 2001. Mitochondrial DNA characterization of five species of *Plebeia* (Apidae: Meliponinae): RFLP, restriction maps and phylogenetic inferences. **Apidologie**, 32: 323-332.
- FRANCK P., GARNERY L., SOLIGNAC M., CORNUET J.-M. 1998. The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*) new insights from microsatellite and mitochondrial data. **Evolution**, 52: 1119-1134.
- FRANCK P., GARNERY L., CELEBRANO G., SOLIGNAC M., CORNUET J.-M. 2000. Hybrid origins of honeybee from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). **Mol. Ecol.**, 9: 907-921.
- FRANCK P., GARNERY L., LOISEAU A., OLDROYD B.P., HEPBURN H.R., CELEBRANO G., SOLIGNAC M., CORNUET J.-M. 2001. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. **Heredity**, 87: 420-430.
- GARNERY L., CORNUET J.-M., SOLIGNAC M. 1992. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. **Mol. Ecol.**, 1: 145-154.

- GARNERY L., VAUTRIN D., CORNUET J.-M., SOLIGNAC M. 1991. Phylogenetic relationships in the genus *Apis* inferred from mitochondrial DNA sequence data. **Apidologie**, 22: 87-92.
- GOLDSTEIN D.B., SCHLÖTTERER C. 1999. **Microsatellites: Evolution and Applications**. Oxford University Press, New York.
- GOROPASHNAYA A.V., FEDOROV V.B., SEIFERT B., PAMILOS P. 2004. Limited phylogeographical structure across Eurasia in two red wood ant species *Formica pratensis* and *F. lugubris* (Hymenoptera, Formicidae). **Mol. Ecol.**, 13: 1849-1858.
- GOUDET J., RAYMOND M., DE MEEÛS T., ROUSSET F. 1996. Testing differentiation in diploid populations. **Genetics**, 144: 1933-1940.
- HAAVIE J., SÆTRE G.-P., MOUM T. 2000. Discrepancies in population differentiation at microsatellites, mitochondrial DNA and plumage color in the pied flycatcher – inferring evolutionary process. **Mol. Ecol.**, 9: 1137 – 1148.
- HALL H.G., SMITH D.R. 1991. Distinguishing African and European honeybee matrilineal lineages using amplified mitochondrial DNA. **P.N.A.S.**, 88: 4248-4552.
- HAMILTON W.D. 1964. The genetical evolution of social behaviour I. **J. Theor. Biol.**, 7: 1-52.
- HAMMOND R.L., MACASERO W., FLORES B., MOHAMMED O.B., WACHER T., BRUFORD M.W. 2001. Phylogenetic reanalysis of the Saudi gazelle and its implications for conservation. **Conserv. Biol.**, 15: 1123-1133.
- HANCOCK J.M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. “In”: **Microsatellites: Evolution and Applications** (eds. Goldstein D.B., Schlotterer C.). 1-9. Oxford University Press, New York.

- HANSEN M.M., MENSBERG K.-L.D., BERG S. 1999. Postglacial recolonization patterns and genetic relationships among whitefish (*Coregonus* sp.) populations in Denmark, inferred from mitochondrial DNA and microsatellite markers. **Mol. Ecol.**, 8: 239-252.
- HARPER G.L., MACLEAN N., GOULSON D. 2004. Microsatellite markers to assess the influence of population size, isolation and demographic change on the genetic structure of the UK butterfly *Polyommatus bellargus*. **Mol. Ecol.**, 12: 3349-3357.
- IMPERATRIZ-FONSECA V.L., MATOS E.T., FERREIRA F., VELTHUIS H.W. 1998. A case of multiple mating in stingless bees (Meliponinae). **Insect Soc.**, 45: 231-233.
- ITTIG R.E.G., THEILER G.R., GARDENAL C.N. 2002. A contribution to the subgeneric systematics of *Oligoryzomys* (Rodentia, Muridae) from Argentina by means of PCR-RFLP patterns of mitochondrial DNA. **Biochem. Syst. Ecol.**, 30: 23-33.
- JONES M.W., O'REILLY P.T., MCPHERSON A.A., MCPARLAND T.L., ARMOSTRONG D.E., COX A.J., SPENCE K.R., KENCHINTON E.L., TAGGART C.T., BENTZEN P. 2003. Development, characterization, inheritance, and cross-species utility of American lobster (*Homarus americanus*) microsatellite and mtDNA PCR-RFLP markers. **Genome**, 46: 59-69.
- KAWATA, M. 1997. Loss of genetic variability in a fragmented continuously distributed population. **Res. Popul. Ecol**, 39: 227-237.
- KERR W.E. 1996. **Biologia e manejo da tíuba: a abelha do Maranhão**. EDUFMA, São Luiz.
- KERR W.E., CARVALHO G.A., NASCIMENTO V.A. 1996. **Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação**. Fundação Acangáú, Belo Horizonte.

- KERR W.E., ZUCCHI R., NAKADAIRA J.T., BUTOLO J.E. 1962. Reproduction in the social bees (Hymenoptera, Apidae). **J.N.Y. Ent. Soc.**, 70: 265-276.
- KOEDAM D., CONTRERA F.A.L., IMPERATRIZ-FONSECA V.L. 1998. A study of reproductive behavior of workers in *Melipona subnitida*: patterns in production of males? **Anais do III Encontro sobre abelhas**. Ribeirão Preto, SP. 189.
- KUMAR S., TAMURA K., JAKOBSEN I.B., NEI M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. **Bioinformatics**, 17: 1244-1245.
- LEHMAN N., EINSENHAWER A., HANSEN K., MECH D., PETERSON R., GOGAN P.J.P. 1991. Introgression of coyote mitochondrial DNA into sympatric north american gray wolf populations. **Evolution**, 45: 104-119.
- LENK P., FRITZ U., JOGER U., WINKS M. 1999. Mitochondrial phylogeography of the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus 1758). **Mol. Ecol.**, 8: 1911-1922.
- LOVETTE I.J., BERMINGHAM E., ROHWER S., WOOD C. 1999. Mitochondrial restriction fragment length polymorphism (RFLP) and sequence variation among closely related avian species and the genetic characterization of hybrid *Dendroica* warblers. **Mol. Ecol.**, 8: 1431-1441.
- LUNT D.H., IBRAHIM K.M., HEWITT G.M. 1998. MtDNA phylogeography and postglacial patterns of subdivision in the meadow grasshopper *Chortippus parallelus*. **Heredity**, 80: 633-641.
- MACHADO M.F.P., CONTEL E.P.B., KERR W.E. 1984. Proportion of males sons-of-the-queen and sons-of-workers in *Plebeia droryana* (Hymenoptera, Apidae) estimated from data of an MDH isozyme polymorphic system. **Genetica**, 65: 193-198.

- MAMURIS Z., SFOUGARIS A.I., STAMATIS C. 2001. Genetic structure of greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations as revealed by mtDNA RFLP-PCR analysis: implications for conserving genetic diversity. **Biol. Conserv.**, 101: 187-196.
- MATIOLI S.R., PASSO-BUENO M.R.S. 2001. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. "In": **Biologia Molecular e Evolução** (ed. Matioli S.R.). 153-161. Holos Editora, Ribeirão Preto.
- McELROY D., MORAN P., BERMINGHAM E., KORNFIELD I. 1992. REAP: an integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data. **J. Hered.**, 83: 157-158.
- McPHERON B.A., GASPARICH G.E., HAN H.-Y., STECK G.J., SHEPPARD W.S. 1994. Mitochondrial DNA restriction map for the mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. **Biochem. Genet.**, 32: 25-33.
- MEIXNER M.D., ARIAS M.C., SHEPPARD W.S. 2000. Mitochondrial DNA polymorphisms in honey bee subspecies from Kenya. **Apidologie**, 31: 181-190.
- MEIXNER M.D., MCPHERON B.A., SILVA J.G., GASPARICH G.E., SHEPPARD W.S. 2002. The mediterranean fruit fly in California: evidence of multiple introductions and persistent populations based on microsatellite and mitochondrial DNA variability. **Mol. Ecol.**, 11: 891-899.
- MICHENER C.D. 2000. **The Bees of the World**. The John Hopkins University Press, Baltimore.
- MOIALANEN A, SUNDSTRÖM L., PEDERSEN, J.S. 2004. **Matesoft. A program for genetic analysis for mating systems Version 1.0**. Documentation. Disponível em: www.zi.ku.dk/popecol/personal/JSPedersen/MateSoft.htm.

- MORITZ C., DOWLING T.E., BROWN W.M. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, 18: 269-292.
- MOYSÉS C.B., ALMEIDA-TOLEDO L.F. 2002. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genet. Mol. Biol.**, 25: 401-407.
- NEI M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89: 583-590.
- NEI M. 1987. **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press, New York.
- NEI M., TAJIMA F. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. **Genetics**, 97: 145-163.
- NEI M., TAJIMA F. 1983. Maximum likelihood estimation of the number of nucleotide substitutions from restriction sites data. **Genetics**, 105: 207-217.
- NEI M., MILLER J.C. 1990. A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. **Genetics**, 125: 873-879.
- NOGUEIRA-NETO P. 1997. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. Editora Nogueirapis, São Paulo.
- OJALA D., MONTOYA J., ATTARDI G. 1981. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. **Nature**, 290: 470-474.

- PAPASOTIROPOULOS V., KLOSSA-KILIA E., KILIAS G., ALAHOTIS. S. 2002. Genetic divergence and phylogenetic relationships in grey mullets (Teleostei: Mugilidae) based on PCR-RFLP analysis of mtDNA segments. **Biochem. Genet.**, 40: 71-86.
- PARKER P.G., SNOW A.A., SCHUNG M.D., BOOTON G.C., FUREST P.A. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, 79: 361-182.
- PAXTON, R.J. 2000. Genetic structure of colonies and male aggregation in the stingless bee *Scaptotrigona postica*, as revealed by microsatellite analysis. **Insect Soc.**, 47: 63-69.
- PAXTON R.J., WEIßSCHUN N., QUEZADAEUÁN J.J.G. 1999a. Characterization of dinucleotide microsatellite loci for stingless bees. **Mol. Ecol.**, 8: 690-692.
- PAXTON R.J., WEIßSCHUN N., ENGELS W., HARTELDER K., QUEZADA-EUÁN J.J.G. 1999b. Not only single mating in stingless bees. **Naturwissenschaften**, 86: 143-146.
- PEDRO S.R.M., CAMARGO J.M.F. 2003. Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae). **Rev. Brasil. Ent.**, 47: 1-117.
- PERWITASARI-FARAJALLAH D. 2001. Genetic characterization of long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) on Tabuan island, Indonesia. **Primates**, 42: 141-152.
- PETERS J.M., QUELLER D.C., IMPERATRIZ-FONSECA V.L., STRASSMANN J.E. 1998. Microsatellite loci for stingless bees. **Mol. Ecol.**, 7: 784-787.

- PETERS J.M., QUELLER D.C., IMPERATRIZ-FONSECA V.L., ROUBIK D.W., STRASSMANN J.E. 1999. Mate number, kin selection and social conflicts in sting less bees and honeybees. **Proc. Royal Soc.**, 266: 379-384.
- QUELLER D.C., STRASSMANN J.E., HUGHE, C.R. 1993. Microsatellites and kinship. **TREE**, 8: 285-289.
- RAYMOND M., ROUSSET F. 1995a. An exact test for population differentiation. **Evolution**, 49: 1280-1283.
- RAYMOND M., ROUSSET F. 1995b. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J. Hered.**, 86: 248-249.
- RESS D.J., EMERSON BC., OROMÍ P., HEWITT G.M. 2001. Reconciling gene trees with organism history: the mtDNA phylogeography of three *Nesotes* species (Coleoptera: Tenebrionidae) on the western Canary islands. **J. Evol. Biol.**, 14: 139-147.
- ROFF D.A., BENTZEN P. 1989. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: χ^2 and the problem of small samples. **Mol. Biol. Evol.**, 6: 539-545.
- ROSS K.G. 2001. Molecular ecology of social behavior: analyses of breeding systems and genetic structure. **Mol. Ecol.**, 10: 265-284.
- ROSS K.G., KRIEGER M.J.B., SHOEMAKER D.D., VARGO E.L., KELLER L 1997. Hierarchical analysis of genetic structure in native fire ant populations: results from three classes of molecular markers. **Genetics**, 147: 643-655.
- ROUBIK D.W. 1989. **Ecology and natural history of Tropical Bees**. Cambridge University Press, Cambridge.

- ROUSSET F., RAYMOND M.L. 1995. Testing heterozygote excess and deficiency. **Genetics**, 140: 1413-1419.
- RUTTNER F. 1988. **Biogeography and taxonomy of honeybees**. Springer-Verlag, Berlin.
- RUTTNER F., TASSENCOURT L., LOUVEAUX J. 1978. Biometrical-Statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. **Apidologie**, 9: 363-381.
- RZHETSKY A., NEI, M. 1992. A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. **Mol Biol. Evol**, 9: 945-967.
- SAIKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A., ARNHEIM N. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, 230: 1350-1354.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- SCHLÖTTERER C., WIEHE T. 1999. Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps. "In" **Microsatellites: Evolution and Applications** (eds. Goldstein D.B., Schlotterer C.), 238-248, Oxford University Press, New York.
- SCHNEIDER S., ROESSLI D., EXCOFFIER L. 2000. **Arlequin Ver. 2.000: A Software For Population Genetic Data Analysis**. Genetics And Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- SHEPPARD W.S., MCPHERON B.A. 1991. Ribosomal RNA diversity in Apidae. "In": **Diversity in the genus *Apis*** (ed. Smith D.R.), Westview Press, Oxford.

- SHEPPARD W.S., ARIAS M.C., MEIXNER M.D. 1997. *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee subspecies from Malta. **Apidologie**, 28: 287-293.
- SHEPPARD W.S., RINDERER T.E., MAZZOLI J., STELZER J.A., SHIMANUKI H. 1991. Gene flow between African- and European-derived honey bee populations in Argentina. **Nature**, 349: 782-784.
- SHEPPARD W.S., RINDERER T.E., MEIXNER M.D., YOO H.R., STELZER J.A., SCHIFF N.M., KAMEL S.M., KRELL R. 1996. *Hinf* I variation in mitochondrial DNA of old world honey bee subspecies. **J. Hered.**, 87: 35-40.
- SIHANUNTAVONG D., SITTIPRANEED S., KLINBUNGA S. 1999. Mitochondrial DNA diversity and population structure of the honey bee, *Apis cerana*, in Thailand. **J. Apicult. Res.**, 38: 211-219.
- SILBERBAUER-GOTTSBERGER I., GOTTSBERGER G. 1988. A polinização de plantas do cerrado. **Rev. Brasil. Biol.**, 48: 651-663.
- SILVA J.G., MEIXNER M.D., MCPHERON B.A., STECK G.J., SHEPPARD W.S. 2003. Recent mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) infestations in Florida – A genetic perspective. **Entomol. Soc. Am.**, 96: 1711-1718.
- SILVEIRA F.A., MELO G.A.R., ALMEIDA E.A.B. 2002. **Abelhas brasileiras. Sistemática e Identificação**. Fernando Silveira, Belo Horizonte.
- SILVESTRE D. 2002. **Seqüenciamento e análise do genoma mitocondrial de *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. São Paulo, USP: 119p. Dissertação de mestrado. (Biologia Genética). Universidade de São Paulo.
- SILVESTRE D., WEINLICH R., FRANCISCO F.O., ARIAS M.C. 1999. Clonagem e sequenciamento de regiões do genoma mitocondrial de *Melipona bicolor*. **Genet. Mol. Biol.**, 22: 178.

- SILVESTRE D., FRANCISCO F.O., WEINLICH R., ARIAS M.C. 2002. A scientific note on mtDNA gene order rearrangements among highly eusocial bees (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie**, 33: 355-356.
- SIMON C., FRATI F., BECKNBACH A., CRESPI B., LIU H., FLOOK P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction *primers*. **Annals Entomol. Soc. Am.**, 87: 651-701.
- SIMONSEN B.T., SEIGISMUND H.R., ARCTANDER P. 1998. Population structure african buffalo inferred from mtDNA sequences and microsatellite loci: high variation but low differentiation. **Mol. Ecol**, 7: 225-237.
- SITTIPRANEED S., LAOAROON S., KLINBUNGA S., WONGSIRI S. 2001. Genetic differentiation of the honey bee (*Apis cerana*) in Thailand: evidence from microsatellite polymorphism. **J. Apicult. Res.**, 40: 9-16.
- SLATKIN M. 1987. Gene flow and the geographic structure of populations. **Science**, 236: 787-792.
- SMITH G.P. 1976. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. **Science**, 191: 528-535.
- SWOFFORD D.L., SELANDER R.B. 1997. **BIOSYS-2. A computer program for the analysis of allelic variation in genetics**. Department of Genetics and Development, University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois.
- TARELHO Z.V.S. 1973. **Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea**. Tese de doutorado. (Genética). Ribeirão Preto, USP. 112p. Universidade de São Paulo.

- THOMAZ D., GUILLER A., CLARKE B. 1996. Extreme divergence of mitochondrial DNA within species of pulmonate land snails. **Proc. Royal Soc.**, 263: 363-368.
- TOSTA V.C., WALDSCHMIDT A.M., BRITO R.M., POMPOLO S.G., SALOMÃO T.M.F., BARROS E.G., CAMPOS L.A.O. 1998. Marcadores moleculares RAPD ligados à presença de cromossomos supranumerários em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). **Genet. Mol. Biol.**, 21: 83.
- VARGO E.L., HUSSENER C., GRACE J.K. 2003. Colony and population genetic structure of Fomosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*, in Japan. **Mol. Ecol.**, 12: 2599-2608.
- VAWTER L., BROWN W.M. 1986. Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. **Science**, 234: 194-196.
- VELTHUIS H.H.W. 1997. **Biologia das abelhas sem ferrão**. USP and Universidade Utrecht, São Paulo.
- VIGINIER B., PEETERS C., BRAZIER L., DOUMS C. 2004. Very low genetic variability in the Indian queenless ant *Diacamma indicum*. **Mol Ecol.**, 13: 2095-2100.
- WALSH P.S., METZGER D.A., HIGUCHI R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**, 10: 506-513.
- WEINLICH R., FRANCISCO F.O., ARIAS M.C. 2004. Mitochondrial DNA restriction and genomic maps of seven species of *Melipona* (Apidae: Meliponini). **Apidologie**, 35: 365-370.

- WIDMER A., SCHMID-HEMPEL P. 1999. The population genetic structure of a large temperate pollinator species, *Bombus pascuorum* (Scopoli) (Hymenoptera, Apidae). **Mol. Ecol.**, 8: 387-398.
- WIDMER A., SCHMID-HEMPEL P., ESTOUP A., SCHOLL A. 1998. Population genetic structure and colonization history of *Bombus terrestris* s.l. (Hymenoptera, Apidae) from the Canary Islands and Madeira. **Heredity**, 81: 563-572.
- WIERNASZ D.C., PERRONI C.L., COLE B.J. 2004. Polyandry and fitness in the western harvester ant, *Pogonomyrmex occidentalis*. **Mol. Ecol.**, 13: 1601-1606.
- WILLE A., OROZCO E. 1975. Observations on the founding of a new colony by *Trigona cupira* (Hymenoptera: Apidae) in Costa Rica. **Rev. Biol. Tropical**, 22: 253-287.
- WILSON E.O. 1971. **The Insect Societies**. Belknap Press, Cambridge.
- WILSON A.C., CANN R.L., GEORGE M., GYLLENSTEN U.B., HELM-BYCHOWSKI K.M., HIGUSHI R.G., PALUMBIE M., SAGE R.D., STONEKING M. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biol. J. Linn. Soc.**, 26: 375-400.
- WOLSTENHOLME D.R. 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. "In" **Mitochondrial Genomes** (eds. Wolstenholme D.R., Jeon K.W.). 173-216, Academic Press, San Diego.
- WRIGHT S. 1922. Coefficients of inbreeding and relationship. **Am. Nat.**, 56: 330-338.
- ZANE L., BARGELLONI L., PATARNELLO T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Mol. Ecol.**, 11: 1-16.

ANEXO 1

CARACTERIZAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES : PARTE I

1. MAPEAMENTO DE RESTRIÇÃO DO DNAm_t

Com o objetivo de caracterizar o DNAm_t de *P. mulata* e *P. helleri*, foram usados *primers* para amplificação deste genoma por meio de PCR: universais para insetos (Simon *et al.*, 1994), derivados de *Apis mellifera* (Hall e Smith, 1991; Arias *et al.*, 1998) e de *Melipona bicolor* (Francisco *et al.*, 2001; Silvestre, 2002). Inicialmente foram testados os 10 pares de *primers* que amplificaram com sucesso o DNAm_t de *Plebeia* (Francisco *et al.*, 2001). Para as regiões do DNAm_t não amplificadas com estes *primers*, foram testadas outras 116 combinações (Tabela 50). As reações foram montadas e realizadas com o ciclo básico tal como descrito na seção 3.2.2.

Os fragmentos obtidos foram estudados por meio de digestões com enzimas de restrição e sequenciamento. Os dados obtidos permitiram a construção de mapas de restrição parciais e adicionalmente o sequenciamento da região entre os genes COI e COII de *P. mulata* e *P. helleri*. Esses resultados foram aceitos para publicação na revista *Apidologie*. Assim, a metodologia empregada em ambas espécies para amplificação do DNAm_t, os mapas de restrição, o sequenciamento parcial e a discussão destes resultados, podem ser vistos na publicação incluída no presente anexo.

A análise e discussão das seqüências dos fragmentos amplificados com os *primers* COI-IIIF/mtD18 podem ser vistas na publicação e no item 3 do presente anexo.

Tabela 50. Combinações de *primers* e temperaturas de hibridação dos *primers* testadas para regiões do DNAm_t de *P. mulata* e *P. helleri* não amplificadas com os pares usados em *Plebeia* (Francisco *et al.*, 2001). Cf – comprimento do fragmento; Ta – temperatura de hibridação dos *primers* testada.

Genes principais	Primer1 (Referência)	Primer2	Cf (pb) esperado	Ta (°C)	Referência (Primer 2)	
ATPase 6/8 COIII	<i>mtD19</i> b	AMB 8	1623	42	a	
		Seq11	1200	42	e	
		Seq17	889	42	e	
	<i>Seq42</i> a	AMB8			42	a
		mtD22	1815	42	b	
		Seq11	1248	42	e	
		Seq17	889	42	e	
	<i>AMB7</i> a	AMB8	1519	42	a	
		mtD22	1711	42	b	
		Seq11	1144	42	e	
		Seq17	785	42	e	
	<i>Seq10</i> e	AMB8	1126	42	a	
		Seq11	751	42	e	
		Seq19	1600	42	e	
		TPheF	2145	42	d	
		mtD22	1318	42	b	
<i>Seq24</i> e	mtD22	600	42	b		
ND5	<i>Seq25</i> e	7960F	1366	42	a	
		8467F	1873	42	a	
		AMB10	821	42	a	
		AMB12	2268	42	a	
		Seq23	1528	41,5 e 42	e	
		Seq34	1006	41,5 e 42	e	
		Seq37	2740	42	e	
		tHisF	1906	42	a	
	<i>tArgR</i> a	7960F	1366	42	a	
		8467F	1873	42	a	
		AMB10	821	42	a	
		AMB12	2268	42	a	
		Seq23	1528	42	e	
		Seq34	1006	42	e	
		tHisF	1906	42	a	
		tPheF	1110	42	d	
	<i>tPheR</i> a	7960F	1115	42	a	
		8467F	1622	42	a	
		AMB10	570	41,5 e 42	a	
		AMB12	2017	41,5 e 42	a	
		Seq23	1277	42	e	
		Seq34	755	41,5 e 42	e	
		tHisF	1655	42	a	

Tabela 50 . Continuação.

	Primer1 (Referência)	Primer2	Cf (pb) esperado	Ta (°C)	Referência (Primer 2)
ND5	Seq31 e	7960F	960	42	a
		8467F	1467	41,5 e 42	a
		AMB10	415	41,5 e 42	c
		AMB12	1862	41,5 e 42	c
		Seq23	1122	41,5 e 42	e
		Seq34	600	42	e
		tHisF	1500	41,5 e 42	a
	AMB11 c	Seq29F	2300	42	e
		7960F	660	42	a
		8467F	1167	42	a
		AMB12	1562	41,5 e 42	c
		ND4F	2700	42	e
		Seq 37	2035	42	e
		Seq23	822	41,5 e 42	e
		Seq34	300	41,5 e 42	e
	tHisF	1200	41,5 e 42	a	
	Seq35 e	7960F	360	41,5 e 42	a
		8467F	867	41,5 e 42	a
		AMB12	1262	41,5 e 42	c
		mtD23	1735	41,5 e 42	b
		ND4F	2400	41,5 e 42	e
Seq23		522	41,5 e 42	e	
Seq29F			42	e	
Seq37		1735	41,5 e 42	e	
tHisF	900	41,5 e 42	a		
ND5/ND4	8200R a	8467F	267	42	a
		AMB12	662	42	c
		AMB14	2200	42	c
		mtD23	1135	42	b
		ND4F	1800	41,5 e 42	e
		Seq29F	1400	42	e
	ThisR a	ND4F	1500	42	e
		mtD23	835	41,5 e 42	b
		Seq29F	1100	41,5 e 42	e
	Seq36 e	Seq37	1100	41,5 e 42	e
		ND4F	1400	42	e
	MtD24 b	Seq37	635	42	e
		tThrF	967	42	a
		mtD27	2100	42	b
ND4F		700	42	e	
Seq32		2048	42	e	
Seq39	1782	42	e		

Tabela 50. Continuação

	Primer1 (Referência)	Primer2	Cf (pb) esperado	Ta (°C)	Referência (Primer 2)	
ND4/ND6	<i>Seq29R</i> e	11781F	2181	42	a	
		AMB14	817	42	c	
		AMB16	2258	42	c	
		mtD27	1835	42	b	
		mtD28	2284	42	b	
		ND4F	400	42	e	
		Seq32	1783	42	e	
		Seq39	1517	42	e	
		Seq46	1100	42	a	
	Seq47	1300	42	e		
ND6	<i>Seq33</i> e	11781F	1780	42	a	
		AMB14	400	42	c	
		AMB16	1850	42	c	
		mtD27	1400	42	b	
		mtD28	1880	42	b	
		Seq32	1380	42	e	
		Seq39	1110	42	e	
		Seq46	700	42	e	
		Seq47	900	42	e	
		<i>Seq 38</i> e	AMB16	1400	42	c
			mtD27	1000	42	b
			mtD28	1400	42	b
			Seq32	1000	42	e
			Seq39	900	42	e
COB, NDI	<i>MtD26</i> b	mtD30	1700	42	b	
Região Controle (A+T)	<i>AMB24</i> c	mtD35mel	*	42	a	
		Seq8	*	42	e	
		mtD36R	*	42	b	
		AMB23	*	42	c	
	<i>MtD3</i> b	mtD35	*	42	e	
		mtD35mel	*	42	a	
		Seq8	*	42	e	
		mtD36R	*	42	e	
		AMB23	*	42	c	

a: desenhado no laboratório; b: Simon *et al.* (1994); c: Arias *et al.* (1998); d: Francisco *et al.* (2001); e: Silvestre (2002). *: Cf desconhecido.

2. PUBLICAÇÃO

----- Original Message -----

From: "Walter Steven Sheppard" <sheppard@ib.usp.br>

To: "Rute Brito" <rbrito@ib.usp.br>

Sent: Tuesday, December 21, 2004 2:57 PM

Subject: letter of acceptance

>

>

>

>> Dear Ms. Brito,

>

> I am pleased to inform you that your manuscript "Mitochondrial DNA

> characterization of two Partamona species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

> by PCR+RFLP and sequencing. Authors: Rute Magalhães Brito and Maria

> Cristina Arias" has been accepted for publication in Apidologie. You will

> received final galley proofs and details from the publisher or the French

> Editorial Office, but the expectation is that your printed paper should

> appear in one of the 2005 issues.

>

> On behalf of the editorial board of Apidologie, I thank you for your

> interest to publish your research in the Journal.

>

> Sincerely

>

> Walter S Sheppard

> US Editor, Apidologie

>

>

> --

**Mitochondrial DNA characterization of two *Partamona* species
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by PCR+RFLP and sequencing.**

Brito, Rute Magalhães and Arias, Maria Cristina. Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, USP, São Paulo, SP, 05508-090, Brazil.

ABSTRACT

We characterized the mitochondrial DNA of two stingless bee species of the genus *Partamona*. Partial restriction maps were obtained based on digestion of PCR amplified fragments with 8 restriction enzymes. Using *Melipona bicolor* mtDNA sequence as a model, we were able to amplify 12120 bp of *P. mulata* and 10300 bp of *P. helleri*, about 65.5% and 55.7% of their mitochondrial genome, respectively. The digestion assays showed 16 restriction sites for *P. mulata* and 20 for *P. helleri*, some of which were exclusive to the genus and others shared with other Meliponini species. The main mitochondrial genes could be mapped and through sequencing analysis we verified that the intergenic region that occurs between the genes CO I and CO II in *Apis* is absent in *Partamona*.

***Partamona* / Meliponini / mtDNA / pcr+rflp / restriction map**

1. INTRODUCTION

The tribe Meliponini is composed of stingless bees which are distributed in the tropical and southern subtropical areas of the World. The number of species is not well-defined although Michener (2000) estimated the occurrence of several hundred. Their ecological role as natural pollinators is unquestionable, and some species have been domesticated for commercial honey production (Nogueira-Neto, 1997).

This tribe presents a great diversity of nest architecture, intra colony population size, habitat, morphology and behavior. The recently revised genus *Partamona* comprises 33 species and is broadly distributed, being found from southern Mexico to southern Brazil (Pedro and Camargo, 2003). A number of morphological, ethological and cytogenetical analyses have been used to infer evolutionary relationships within the group (Brito-Ribon *et al.*, 1999; Azevedo and Zucchi, 2000; Brito *et al.*, 2003; Pedro and Camargo, 2003). As a result 4 major phylogenetic groups have been defined within the genus: *bilineata/epiphytophyla*, *musarum*, *nigrior* and *cupira* (Pedro and Camargo, 2003). The inclusion of nest architecture information improved the resolution of the phylogenetic relationships within the *cupira* group, in which only *P. helleri* does not build nests associated with termites, thus being positioned as sister species (Camargo and Pedro, 2003).

Mitochondrial DNA (mtDNA) analysis has been used widely in studies of population dynamics, biogeography and genetic relationships among species (Avice *et al.*, 1987). However, for stingless bees these studies are only beginning, with just a few species belonging to the genera *Plebeia* and *Melipona* having been studied so far (Francisco *et al.*, 2001; Francisco, 2002; Silvestre *et al.*, 2002; Weinlich *et al.*, 2004).

This present work reports the partial characterization of the mitochondrial genome for two *Partamona* species of the *cupira* group: *P. helleri* (Friese) that has a large geographical distribution (from south to northeastern Brazil in the Atlantic Forest) and *P. mulata* (Moure) that is restricted to “cerrado” (savanna like) areas in central western Brazil. Also, although they belong to the same species group (*cupira*), *P. helleri* is not associated with termite nests.

2. MATERIALS AND METHODS

Individuals from one natural nest of *Partamona mulata* and one of *P. helleri* were collected, respectively, in Poconé, MT (16° 18' LS, 56° 31' LW) and Viçosa, MG (20 45' LS, 42° 52' LW), Brazil, and used for the mtDNA analyses.

Total DNA was extracted using ten thoraces per tube following the methodology of Sheppard and McPheron (1991). For the mtDNA amplification, primers designed for *Apis mellifera* (Hall and Smith, 1991; Arias *et al.*, 1998), *Melipona bicolor* (Silvestre, 2002) and others insects (Simon *et al.*, 1994) were tested in a total of 116 combinations. The PCR reactions were performed in 50 µl, containing 0.5 µl of DNA extraction, 5 µl of 10 X PCR buffer, 1.5 µl of each primer (20 µM), 5 µl of dNTPs (2 mM each), 1.5 µl of MgCl₂ (50 mM) and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). The PCR amplifications followed the conditions described elsewhere (Francisco *et al.*, 2001). However the annealing temperature and the cycle number were adjusted for each primer combination to improve the reaction specificity (Table 1). The PCR products, 10 µl of each reaction, were submitted to electrophoresis on 0.8% agarose gels. The gels were stained with ethidium bromide, visualized and photographed under UV light with Polaroid film.

Digestions of PCR fragments were carried out using 13 different restriction enzymes: *Bcl* I; *Bgl* II; *EcoR* I; *EcoR* V; *Hae* III; *Hind* III; *Pst* I; *Pvu* II; *Sca* I; *Xba* I; *Xho* I (Boehringer Mannheim Biochemica); *Cla* I (Gibco BRL) and *Nde* I (New England Biolabs). The reactions were prepared with 3 to 5 µl of the PCR amplified DNA and 5 U of restriction enzyme following the manufactures instructions, and incubated overnight. For double digestions, the DNA was first digested overnight with one enzyme, precipitated, and then digested with the second enzyme.

The fragment amplified with the primer pair COI-IIF/mtD18 from both species (see Table I in Results) was cloned and sequenced. The cloning was carried out using the M-13 vector (pGEM T-Easy - Promega) and the sequencing reactions were performed using a Big Dye Terminator kit (Applied Biosystem), according to their respective protocols. The single strand fragments originated were analyzed by an automated sequencer ABI-PRISM 310 (Perkin Elmer), and sequence alignments were performed with the programs Generunner V3.00 (Hastings Software) and MultiAlign 5.4.1 (Corpet, 1988).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Mitochondrial DNA fragments of *Partamona mulata* and *P. helleri*

From the 116 primer pair combinations, 17 mtDNA regions amplified in *P. mulata* and 13 in *P. helleri*. Figure 1 presents the amplified fragments and their positions in comparison to the *M. bicolor* mtDNA genome (Silvestre, 2002). Some amplified regions overlapped. Table I summarizes those data and also the PCR conditions determined for each primer pair.

The sum of the fragments amplified, discounting overlapping stretches, is about 12120 bp for *P. mulata* and 10300 bp for *P. helleri*. Assuming that *Partamona* mtDNA has the same genome size (18500 bp) as *M. bicolor* and other Meliponini (Francisco *et al.*, 2001; Silvestre, 2002; Fernandes-Salomão *et al.*, 2002; Weinlich *et al.*, 2004), we were able to amplify 65.5% and 55.7%, respectively (Figure 1).

Some mtDNA regions did not amplify even using several primer combinations and modifications in the PCR conditions. One of the main regions absent in our map (Figure 1) corresponds to the region encompassing the genes ND5 and ND4, although a short incomplete fragment was obtained for *P. mulata*. We believe that sequencing the adjacent regions and designing specific primers for *Partamona* mtDNA would be the best strategy for further sequencing attempts. A second area of absence in our map corresponds to the A+T rich region, or control region, the size of which is quite difficult to estimate since no data have been obtained for any Meliponini species to date.

The sizes of the amplified fragments were similar to expected, according to the *M. bicolor* mtDNA sequence (Silvestre, 2002) (Table I), suggesting that the *Partamona* mitochondrial genome has the same main gene order. However, the *Partamona* fragment amplified by the primers mtD2/mtD9 was 200bp less than in *Melipona bicolor*. This region comprises the ND2, 5'CO I and several tRNA genes. Transfer RNA genes are more likely to undergo translocations in the mtDNA genome than protein coding genes, a suggestion supported by the finding that at least 8 tRNA translocations have been reported between *A. mellifera* and *M. bicolor* mtDNA (Silvestre, 2002; Silvestre *et al.*, 2002). Thus this phenomenon may be quite frequent in bees and explain the length differences observed, since this mtDNA region comprises several tRNA genes. This needs to be further investigated by sequencing.

As described for *Plebeia* (Francisco *et al.*, 2001) and *M. bicolor* (Silvestre, 2002), the *Partamona* species did not have an intergenic region between the COI and COII genes. The absence of the intergenic region in *P. mulata* and *P. helleri* was inferred initially by a fragment length, that was 300 bp shorter than that described in *A. mellifera* (but similar to those observed in *Plebeia* and *Melipona*). This region was sequenced from both *Partamona* species (GenBank accession numbers: AY497503 and AY497504), and a total of 924 bp was aligned. The similarity level between *P. helleri* and *P. mulata* was estimated at 95.15% and 17 transversions, 23 transitions and 5 indels were verified. Sequence comparison between *P. mulata* and *M. bicolor* showed 90.7% similarity, 57 transversions, 23 transitions, and 6 indels, and with *P. helleri* 92.1% similarity, 48 transversions, 22 transitions and 3 indels. The nucleotide sequence corresponds to the 3'COI, tRNA^{Leu} and 5'COII genes, and no single nucleotide was found between the tRNA^{Leu} and 5'COII genes, which would characterize the intergenic region. In *A. mellifera* this region was first described by Crozier *et al.* (1989), and later Cornuet *et al.* (1991) verified that it has a high level of length variation among *A. mellifera* subspecies (ranging from 200 to 650 bp). Moreover, Cornuet *et al.* (1991) proposed that this region may function as an extra mtDNA origin of replication, based on its secondary structure. The lack of an intergenic region in *Plebeia* (Francisco *et al.*, 2001), *Melipona* (Silvestre, 2002; Weinlich *et al.*, 2004) and *Partamona* (present work) suggests that it is a conserved evolutionary characteristic among the stingless bees.

3. 2. Partial restriction maps of *Partamona mulata* and *P. helleri*

Of the 12 restriction enzymes used on all fragments, three (*EcoR* V; *Sca* I, and *Xho* I) did not cut in either species. The enzyme *Pvu* II was tested only on the mtD36/16SR fragment and no cleavage was observed. Sixteen restriction sites were detected in *P. mulata* and 20 in *P. helleri*, corresponding to 94 and 118 base pairs, respectively. Partial restriction maps are shown in Figure 1. Some restriction sites were found only in *Partamona* and not in *Melipona* and *Plebeia*. These included: *Bgl* II; *Cla* I; *Hind* III; *Nde* I, in fragment **II** (COI-COII) (Figure 1); *Bcl* I; *Bgl* II; *Pst* I in **IV** (COII/ATPase 6 and 8) and *Nde* I in **XIV** (cytB and ND1). Moreover, some of those above mentioned sites were exclusive for *P. helleri*; such as *Bgl* II and *Hind* III in **II**; and *Bgl* II in **IV** (Figure 1). However, restriction site differences that appear fixed must be considered premature until surveys of population samples are completed.

Comparing our results to mtDNA restriction maps previously described for *A. mellifera* (Crozier and Crozier, 1993), *Plebeia* (Francisco *et al.*, 2001) and *Melipona* (Weinlich *et al.*, 2004), we verified that some restriction sites seem to be very conserved within corbiculate bees, such as: *Bcl* I sites in fragment **II**; *EcoR* I and *Cla* I in **XIV** and *Pst* I in **XV** (Figure 1).

Some restriction sites were shared exclusively among bees from the tribe Meliponini such as: *Cla* I site in fragment **III** (but not in *Melipona rufiventris* and *P. mulata*); *Hind* III in fragment **VII** except for *Melipona melanoventer* and *M. rufiventris*; and *Hae* III in fragment **XVII**. We also found *Partamona* sites that were shared with one other species or genus: *Bcl* I and *Nde* I in fragment **III** with *A. mellifera*; *Nde* I in fragment **IV** with *Plebeia* except *Plebeia saiqui*; and one *Cla* I site on fragment **II** shared only with *Plebeia* sp.

The PCR+RFLP technique employed here provides the first molecular characterization of the mitochondrial genome of *Partamona* species. We were able to show that, in spite of *Taq* polymerase errors, it is possible to use this technique to map restriction sites as an alternative to Southern blot procedures. This PCR based method has some clear advantages over Southern blot mapping, as the latter can require a probe with high specificity, considerably more sample DNA to conduct the restriction digestions and more time and labor. *Taq* polymerase errors are easily resolved by repeating doubtful results, digesting PCR products from different reactions or even digesting other fragments that overlap with the suspect one. The potential of PCR+RFLP to assess genetic variability has been demonstrated in various studies on birds, lagomorpha, rodents, primates and fishes (Lovette *et al.*, 1999; Mamuris *et al.*, 2001; Perwitasari-Farajallah, 2001; Ittig *et al.*, 2002; Papatotopoulos *et al.*, 2002). We plan to further use this technique to analyze mitochondrial haplotypes in population genetics studies of the Meliponini.

The data obtained here constitutes the first step toward haplotype recognition that will be useful in population genetic studies of *Partamona helleri* and *P. mulata*. The variability found in the mtDNA of these species also suggests that this methodology can be used to investigate phylogenetic relationships within and among *Partamona* groups.

4. ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Núcleo de Estudo da Fauna (NIEFA) - Universidade Federal de Mato Grosso for the great cooperation; to Dr. Lucio A. O. Campos of Universidade Federal de Viçosa for providing *Partamona helleri* specimens; to Mr. João Losano (Piuval Farm, Poconé - MT - Brazil) for allowing us to collect *P. mulata* specimens at his private property; to Susy Coelho for technical support; and to Dr. Walter Steven Sheppard for his comments and English revision. This work was financially supported by FAPESP.

5. GENERAL SUMMARY

The genus *Partamona* comprises 33 species and is broadly distributed, being found from southern Brazil and Paraguay to Peru and southern Mexico (Pedro and Camargo, 2003). Evolutionary inferences in this group of bees have been attempted, although the low level of variability found has allowed only the designation of major phylogenetical groups within the genus. However, mitochondrial DNA (mtDNA) analyses have been used in studies of genetic relationships among species belonging to the tribe Meliponini, and have shown variability at intergeneric, interspecific and intraspecific levels. The objective of this present work was to characterize the mitochondrial DNA of two stingless bee species of the genus *Partamona*. Using the *M. bicolor* mtDNA sequence as a model, we were able to amplify 12120 bp of *P. mulata* and 10300 bp of *P. helleri* mtDNA, which means about 65.5% and 55.7% of their total mitochondrial genome, respectively (Tab. I and Fig. 1). Absence of an intergenic region between the cytochrome oxidase I (COI) and cytochrome oxidase II (COII) genes was confirmed by sequencing. The lack of the intergenic region in *Partamona* and other Meliponini bees suggests that it is a conserved evolutionary characteristic among stingless bees. Partial restriction maps were constructed by the digestion of PCR amplified fragments using 8 restriction enzymes. The digestion assays showed 16 restriction sites for *P. mulata* and 20 for *P. helleri* (Fig. 1), some sites being restricted to the genus and others shared with other Meliponini species. We believe that the mtDNA molecular analyses will provide additional data to better establish the genetic relationship within and among *Partamona* species.

6. REFERENCES

- Arias M.C., Francisco F.O., Silvestre D., Weinlich R., Sheppard W.S. (1998) Utilização de pares de *primers* específicos para amplificação integral do genoma mitocondrial de abelhas *Apis mellifera*. Anais do III Encontro Sobre Abelhas, Ribeirão Preto, Brasil, p. 271.
- Avice J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Niegel J.E., Reeb C.A., Saunders N.C. (1987) Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18, 489-522.
- Azevedo G.G., Zucchi R. (2000) Relações etológicas entre *Partamona* Schwarz e *Parapartamona* Schwarz (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Anais do IV Encontro Sobre Abelhas, Ribeirão Preto, Brasil, 258-264.
- Brito-Ribon R.M., Miyazawa C.S., Pompolo S.G. (1999) First Karyotype characterization of four species of *Partamona* (Friese, 1980) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) in Mato Grosso state – Brazil, *Cytobios* 100, 19-26 .
- Brito R.M., Caixeiro A.P.A., Pompolo S.G., Azevedo G.G. (2003) Cytogenetic data of *Partamona peckolti* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining with DA/CMA₃ and DA/DAPI, *Genet. Mol. Biol.* 26, 53-57.
- Camargo J.M.F., Pedro S.R.M. (2003) Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae) – bionomia e biogeografia. *Rev. Brasil. Entomol.* 47: 311-372.
- Cornuet J.-M., Garnery L., Solignac M. (1991) Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA, *Genetics* 1128, 393-403.
- Corpet F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, *Nucl. Acids Res.* 16, 10881-10890.

- Crozier R.H., Crozier Y.C. (1993) The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera* complete sequence and the genome organization, *Genetics* 133, 97-117.
- Crozier R.H., Crozier Y.C., Mackinlay A.G. (1989) The CO-I and CO-II region of honeybee mitochondrial DNA: evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates, *Mol. Biol. Evol.* 6, 399-411.
- Fernandes-Salomão T.M., Muro-Abad J.I., Campos L.A.O., Araújo E.F. (2002) Mitochondrial and nuclear DNA characterization in the *Melipona* species (Hymenoptera, Meliponini) by RFLP analysis, *Hereditas* 137, 229-233.
- Francisco F.O. (2002) Diversidade genética de populações da abelha sem ferrão *Plebeia remota*: análise do DNA mitocondrial e microssatélites, MSc thesis, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Francisco F.O., Silvestre D., Arias M.C. (2001) Mitochondrial DNA characterization of five species of *Plebeia* (Apidae: Meliponinae): RFLP, restriction maps and phylogenetic inferences, *Apidologie* 32, 323-332.
- Hall H.G., Smith D.R. (1991) Distinguishing African and European honeybee matriline using amplified mitochondrial DNA, *P.N.A.S.* 88, 4248-4552.
- Ittig R.E.G., Theiler G.R., Gardenal C.N. (2002) A contribution to the subgeneric systematics of *Oligoryzomys* (Rodentia, Muridae) from Argentina by means of PCR+RFLP patterns of mitochondrial DNA, *Biochem. Syst. Ecol.* 30, 23-33.
- Lovette I.J., Bermingham E., Rohwer S., Wood C. (1999) Mitochondrial restriction fragment length polymorphism (RFLP) and sequence variation among closely related avian species and the genetic characterization of hybrid *Dendroica* warblers, *Mol. Ecol.* 8, 1431-1441.

- Mamuris Z., Sfougaris A.I., Stamatis C. (2001) Genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations as revealed by mtDNA RFLP-PCR analysis: implications for conserving genetic diversity, Biol. Conserv. 1001, 187-196.
- Michener, C.D. (2000) The Bees of the World, The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, USA.
- Nogueira-Neto, P. (1997) Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão. Nogueirapis, São Paulo-SP, Brazil.
- Papasotiropoulos V., Klossa-Kilia E., Kiliadis G., Alahiotis S. (2002) Genetic divergence and phylogenetic relationships in grey mullets (Teleostei: Mugilidae) based on PCR-RFLP analysis of mtDNA segments. Biochem. Genet. 40, 71-86.
- Pedro S.R.M., Camargo J.M.F. (2003) Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae). Rev. Bras. Entomol. 47, 1-117.
- Perwitasari-Farajallah D. (2001) Genetic characterization of long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) on Tabuan island, Indonesia, Primates 42, 141-152.
- Sheppard W.S., McPherson B.A. (1991) Ribosomal DNA diversity in Apidae, in: Smith D.R. (Ed.), Diversity in the Genus *Apis*, Westview Press, Oxford, pp. 89-102.
- Silvestre D. (2002) Sequenciamento e análise do genoma mitocondrial de *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini), MSc thesis, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Silvestre D., Francisco F.O., Weinlich R., Arias M.C. (2002) A scientific note on mtDNA gene order rearrangements among highly eusocial bees, *Apidologie* 33, 355-356.

Simon C., Frati F., Becknbach A., Crespi B., Liu H., Flook P. (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers, *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 651-701.

Weinlich R., Francisco F.O., Arias M.C. (2004). Mitochondrial DNA restriction and genomic maps of seven species of *Melipona* (Apidae: Meliponini), *Apidologie* 35, 365-370.

FIGURE LEGEND

Figure 1: Linearized restriction maps, PCR-amplified regions for *Partamona mulata* and *P. helleri* and the main gene positions, using the *Melipona bicolor* mitochondrial genome as a guide. Amplified fragments are represented by bars and roman numbers (see Table I). Regions not amplified are represented by dotted lines. The A+T rich region and tRNAs were not represented. B, *Bcl* I; G, *Bgl* II; C, *Cla* I; E, *EcoR* I; A, *Hae* III; D, *Hind* III; N, *Nde* I; P, *Pst* I. Italic letters represent restriction sites conserved between both species. ND2, NADH dehydrogenase subunit 2; COI, cytochrome c oxidase subunit 1; COII, cytochrome c oxidase subunit 2; 8, ATP F₀ synthase subunit 8; 6, ATP F₀ synthase subunit 6; COIII, cytochrome c oxidase subunit 3; ND3, NADH dehydrogenase subunit 3; ND5, NADH dehydrogenase subunit 5; ND4, NADH dehydrogenase subunit 4; ND6, NADH dehydrogenase subunit 6; cytB, cytochrome B; ND1, NADH dehydrogenase subunit 1; 16S, large subunit ribosomal RNA; 12S, small subunit ribosomal RNA.

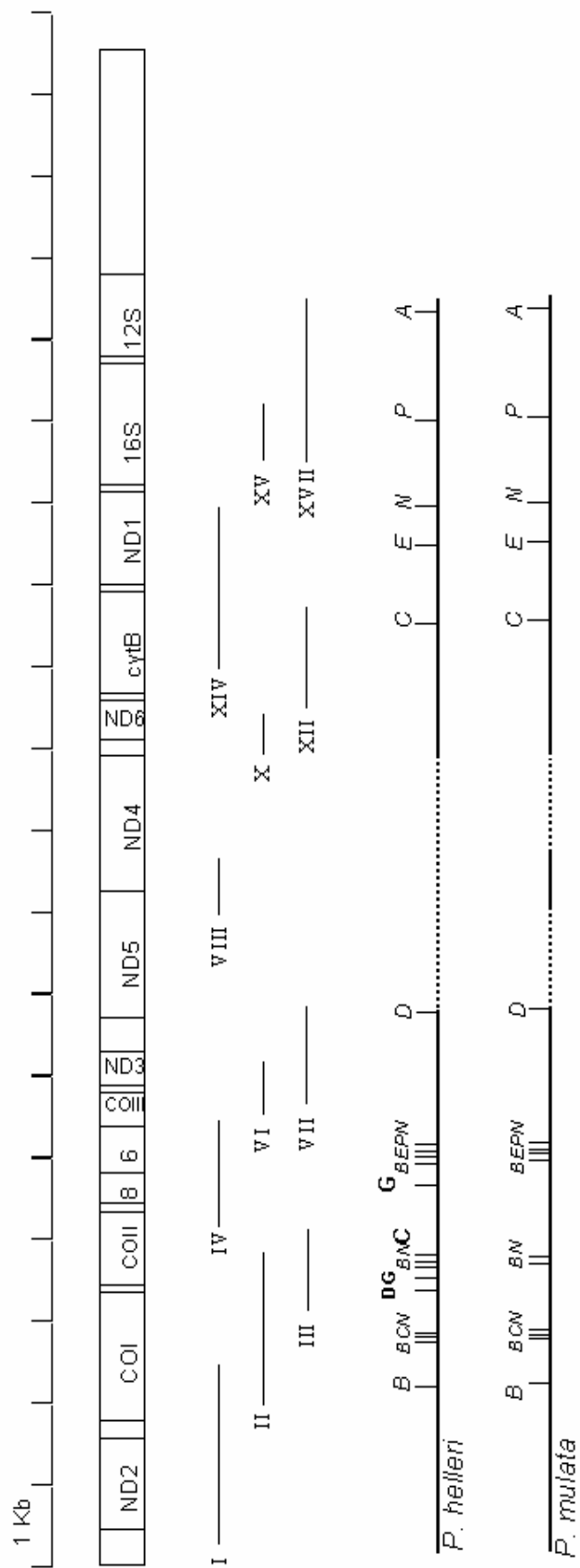


Figure 1

Table I: PCR conditions and primer pairs that resulted in amplification of *Partamona* mtDNA. Gene content per region, fragment length (**Fl**) in base pair (bp) expected (according to *Melipona bicolor*) and observed, annealing temperature (**At**) in Celsius degrees and (number of PCR cycles) are shown. (-): Not amplified.

Fragment (see Fig. 1)	Primers	Principal genes	Fl (bp) expected	At (n° of cycles)		Fl (bp) observed	Primer reference
				<i>P. mulata</i>	<i>P. helleri</i>		
I	mtD2	ND2, COI	2200	43.5 (45x)	43 (45x)	2000	a
	mtD9						a
II	mtD7	COI, COII	1600	43.5 (45x)	47 (35x)	1600	a
	COI-IIR						b
III	COI-IIF	COI, COII	900	43 (40x)	43.5 (35x)	900	b
	mtD18						a
IV	mtD19	ATP8, ATP6	1100	42 (35x)	42 (35x)	1200	a
	Seq11						c
V	Seq10	ATP8, ATP6	751	42 (35x)	42 (35x)	800	c
	Seq11						c
VI	Seq24	COIII	600	42 (35x)	-	600	c
	mtD22						a
VII	5612R	COIII, ND3	1100	44 (35x)	43 (40x)	1100	d
	tPheF						c
VIII	Seq35	ND5, ND4	900	41.5 (35x)	-	900	c
	tHisF						c
IX	Seq29R	ND4	400	42 (35x)	42 (35x)	400	c
	ND4F						c

Table I: Cont.

Fragment (see Fig. 1)	Primers	Principal genes	Fl (bp) expected	At (n° of cycles)		Fl (bp) observed	
				<i>P. mulata</i>	<i>P. helleri</i>		
X	mtD24	ND4	667	42 (35x)	42 (35x)	700	a
	ND4F						c
XI	Seq38	ND6	1400	42 (35x)	-	1200	c
	AMB16						d
XII	Seq38	ND6, cytB	1400	42 (35x)	42 (35x)	1400	c
	mtD28						a
XIII	Seq38	ND6	1000	42 (35x)	-	1100	c
	mtD27						a
XIV	mtD26	cytB, ND1	1700	42 (35x)	42 (35x)	1700	a
	mtD30						a
XV	16SF	16S	800	43.5 (35x)	43 (35x)	800	b
	MEL3						c
XVI	16SF	16S	600	42 (35X)	42 (35X)	600	b
	16SR						b
XVII	mtD36	16S/12S	1800	53 (35x)	53 (35x)	1800	a
	16SR						b

a - Simon *et al.* (1994); **b** - Hall and Smith (1991); **c** - Silvestre (2002); **d** - Arias *et al.* (1998).

3. SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO DNAmT DE *P.mulata* E *P.helleri*

Analisando-se as seqüências de aminoácidos a partir da tradução das duas seqüências de nucleotídeos obtidas (GenBank: AAR99479; AAR99480; AAR99481; AAR99482), observou-se que o gene para citocromo oxidase I apresentou dois códons de parada seguidos (TAA) em *P. mulata*, enquanto que em *P. helleri* este códon é incompleto, do tipo TA (Figura 25). Tal diferença ocorre exatamente na região não emparelhada entre as duas seqüências (Figura 25). Códon de parada anômalos já foram descritos em *Apis mellifera* por Crozier e Crozier (1993), para os genes COI e COII. Códon de parada incompletos também já foram observados em *Drosophila yakuba*, tanto T como TA (Clary e Wolstenholme, 1985) bem como em mamíferos, aves, equinodermos e nemátodos (Wolstenholme, 1992). Em humanos, Ojala *et al.* (1981) demonstraram que poliadenilação pós-transcricional completava os códons de terminação incompletos após a clivagem do RNA policistrônico transcrito. Como tais códons de terminação são difundidos entre grupos tão diversos, acredita-se que o surgimento do mecanismo de clivagem-poliadenilação seja muito antigo na evolução da mitocôndria dos Metazoa (Wolstenholme, 1992).

O tRNA da leucina das duas espécies de *Partamona* foi comparado com a seqüência de *Melipona bicolor* (Silvestre, 2002) e verificamos que as diferenças estão localizadas em regiões de fita simples na estrutura secundária (Figuras 25 a 28). Observamos modificações idênticas em ambas espécies na alça dihidrouridina (D), uma transversão (T \leftrightarrow A) e um *indel*; no braço do anticódon, uma transição (A \leftrightarrow G) e ainda, no braço T Ψ C uma transversão (T \leftrightarrow A). Observamos, porém, uma modificação em *P. mulata* em relação a *Melipona bicolor* que não ocorre em *P. helleri*, uma transversão (C \leftrightarrow A) no braço do anticódon, o que torna este braço diferente entre as duas espécies estudadas (Figura 28).



Figura 25. Alinhamento, obtido através do software MultiAlign (Corpet, 1988), entre seqüências de *Partamona mulata* e *P. helleri* localizadas entre os primers COI-III/mtD18 do DNAmT de ambas espécies. **1 a 263:** região 3' do gene COI; **264 a 268:** região espaçadora; **269 a 334:** tRNA^{Leu}; **335 a 929:** região 5' do gene COII. Região marcada em amarelo: duplo códon de parada em *P. mulata* e incompleto de *P. helleri*. Região marcada em azul: seqüência do tRNA^{Leu}. Substituições de bases estão destacadas em azul (bases C e A) e preto (bases T e G).


```

      3' COI
      |
      v
1
melipona ATATTC AGATTATCCT GATTCATATT ATGTGTGAAA TATAATTCA TCACTAGGAT
mulata TCTATACCAC GACGTTATTC AGATTATCCA GATTCATATT ATCGTTGAAA CTTTATTTC TCTATAGGAT
71
melipona CTATAATTC AATAAATAGA TTATTATTA TAATATTTAT TATTTTGAA AGATTAATAT CAAAACGATT
mulata CAATAATTC AATAAATAGA TTATTATTC TTATTTTAC TATTTTCGAA AGATTATAT CTAACGATT
141
melipona TATTTTATTT AAATTTTCAT AATCATCATT AGAATGACTA AATAATTATC CTCCATTTAA TCATATATGT
mulata AATTTTATTT AAATTTTCAT AATCATCACT TGAATGATTA AATAATTATC CACCATTTAA TCATATATGT
211
melipona AATGAAATTC CTTTATTAAT AAAAAATAA ATTAAAAATA TTTTAAATA ATAAT----T TAATATGGCA
mulata AATGAAATTC CTTTATTAAT TATAAATAA ATTAAAAATA TTTTAAATA ATAATAAAT TAATATGGCA
281
melipona GATTAAGTGC TTTGAATTTA AATTCAATT ATAAATATA TAATTTTAT TAAAAATTC AACATGAAAT
mulata GAATA-GTGC TTTGAATTTA AGATTCAAAAT ATAAATTTA TA-TTTTAT TAAAAATCTC AACATGAAAT
351
melipona ATAATTTTCAT TTCAGATTC AAATTCATTA TATTCTGATA ATTTAATTTT ATTTTCATAAT TTAATTATAA
mulata ATATTAACAT TCCAAGATTC AAATCTTTT TACTCTGATA ATTTAATTTT ATTTTCATAAT TTTATTATAA
421
melipona TATTTATTAT TATAATTAT TCATTAACAT TATTTTTTAT TATTGATTTT ATATTTAATA AATTTTAAA
mulata TATTCATTAT TATAATTAT TCATTAACAT TATATTTTAT TTTAGATATT ATATTAACA AATATTTAAA
491
melipona TTTATCTTTA TTAAAAATC ATTTAATGA AATTATTGA ACATTAATAC CAATAATTAT TTTATTAATA
mulata TCTTCATTA TTAAAAATC ATCAATGA AATTATTGA ACTTAATAC CTATAATTAT TTTATTAATA
561
melipona ATTTGTTATC CATCATTA AATTTTATAT TTTATTGATG AAATATTAA TCCATACTTT TCTATTAAA
mulata ATTTGTTATC CATCATTA AATTTTATAT TTCATTGACG AAATATATA TCCATATTTT TCTATTAAAG
631
melipona CAATTGGTCA TCAATGATAT TGATCTTATG AATATCCAGA ATTTAATAAT TATGAAATTA ATTGTTATAT
mulata CAATTGGTCA TCAATGATAT TGATCATATG AATATCCAGA ATTTAATAAT TATGAAATTA ATTGTTATAT
701
melipona AAACAATTAT AATTATAAAA ATCAATTTTCG ATTATTAGAA ACAGATAATC GATTAATTAT TCCATTTAAA
mulata AAATAATTAT TTAATAATTA ATCAATTTTCG ATTATTAGAA ACTGATAATC GACTAATTAT TCCATTTAAA
771
melipona ATTTCAATTAC GATTAATTGT ATCATCAATA GATGTAATTC ATTCTTGAAC TATTCAATCT TTAGGAATTA
mulata ATTTCAATTAC GATTAATTGT TATCATCAAT GATGTTAATTC ATTCTTGAAC TATTCAATCT TTAGGAATTA
841
melipona AAGTTGATGC AATCCCTGGT CGAATTAATC AATTAAATTT ATTTACAATC CGACCAGGAT TATTTTTTGG
mulata AAGTTGATGC CATTCCGGA CGAATTAATC AATTAAATTT ATTTCTATC CGACCAGGTT TATATTTTGG
911
melipona TCAATGTTCA GAAATTTGTG G
mulata TCAATGTTCA GAAATTTGTG G

```

Figura 26. Alinhamento, obtido através do *software* MultiAlign (Corpet, 1988), entre seqüências de *Partamona mulata* e *Melipona bicolor* (Silvestre, 2002) localizadas entre os *primers* COI-IIF/mtD18 do DNAm de ambas espécies. **1** a **265**: região 3' do gene COI; **265** a **269**: região espaçadora; 270 a 336: tRNA^{Leu}; **337** a **931**: região 5' do gene COII. Região marcada em azul: seqüência do tRNA^{Leu}. Substituições de bases estão destacadas em azul (bases C e A).

```

      1                               3' COI                               70
melipona      ATAT TCAGATTATC CTGATTCATA TTATTGTTGA AATATAATTT CATCACTAGG
helleri      TCTATACC ACGACGTTAT TCAGATTATC CAGATTCATA TTATTGTTGA AATTTTATTT CATCAATAGG
71                               139
melipona      ATCTATAAAT TCAATAAATA GATTATTATT TATAATATTT ATTATTTTTG AAAGATTAAT ATCAAAACG
helleri      ATCTATAAAT TCAATAAATA GATTATTATT TCTTATTTTT ACTATTTTTG AAAGATTTAT ATCAAAACG
140                               209
melipona      ATTTATTTTA TTAAATTTT ATCAATCATC ATTAGAATGA CTAAATAAAT ATCCTCCATT TAATCATATA
helleri      ATTAATTTTA TTAAATTTT ATCAATCATC ACTTGAATGA TTAAATAAAT ATCCACCTTT TAATCATATA
210                               279
melipona      TGTAAATGAAA TTCCTTTATT AATAAAAAAT AAAAATAAAA ATATTTTTAA TAAATAATTT AATATGGCAG
helleri      TGTAAATGAAA TTCCTTTATT AATTATAAAT AAAAATAAAA ATATTTTCAA TAAATA-TTT AATATGGCAG
280                               5' COII 349
melipona      AATTAGTGCT TTGAATTTAA ATTTCAATTA TAAATATAT AATTTTTTAT AAAAAATTTCA ACATGAAATA
helleri      AATA-GTGCT TTGAATTTAA GCTTCAAATA TAAATTTAT A-TTTTTTAT AAAAAATCTCA ACATGAAATA
350                               419
melipona      TAATTTCAAT TCAAGATTC AATTCATTAT ATTCTGATAA TTTAATTTCA TTTCATAAAT TAATTATAAT
helleri      TAATTCATTT TCAAGATTC AATTCATTTT ATTCTGATAA CTTAATTTCA TTCCATAAAT TTATTATAAT
420                               489
melipona      ATTTATTATF ATAATTATTT CATTAAACATT ATTTTTTATT ATTGATTTTA TATTTAATAA ATTTTTAAAT
helleri      ATTTATTATF ATAATTATTT CATTAAACATT ATATTTTTATT TTAGATCTTA TATTAAATAA ATACTTAAAT
490                               559
melipona      TTATCTTTAT TAAAAAATCA TTTAATTGAA ATTATTTGAA CATTAAATACC AATAATTATT TTATTAATAA
helleri      CTTTCATTAT TAAAAAATCA TACAATTGAA ATCATTTGAA CTTAATACC AATAATTATT TTATTAATAA
560                               629
melipona      TTGTGTATCC ATCATTAAAA ATTTTATATT TTATTGATGA AATATTAAT CCATACTTTT CTATTAAAAC
helleri      TTGTGTATCC ATCACTAAAA ATTTTATATT TTATTGATGA AATATATAAT CCATATTTTT CAATTAAAGC
630                               699
melipona      AATTGGTCAT CAATGATATT GATCTTATGA ATATCCAGAA TTTAATAAAT ATGAAATTAA TTGTATATA
helleri      AATTGGTCAT CAATGATATT GATCATATGA ATATCCAGAA TTTAATAAAT ATGAAATTAA TTGTATATA
700                               769
melipona      ACAAATTATA ATTATAAAAA TCAATTTCGA TTATTAGAAA CAGATAATCG ATTAATTATT CCATTTAAAA
helleri      AATAATTATA TAAATAATAA TCAATTTCGA TTATTAGAAA CTGATAATCG ATTAATTATT CCATTTAAAA
770                               839
melipona      TTTCATTACG ATTAATTGTA TCATCAATAG ATGTAATTC A TTCTGAACT AITCAATCTT TAGGAATTAA
helleri      TTTCATTACG ATTAATTGTT TCATCAATAG ACGTAATTC A TTCATGAACA AITCAATCTT TAGGAATTAA
840                               909
melipona      AGTTGATGCA ATCCCTGGTC GAATTAATCA ATTAATTTA TTTACAATCC GACCAGGATT ATTTTTTGGT
helleri      AGTTGATGCT GTTCCTGGAC GAATTAATCA ATTAATCTTA TTTCTATCC GACCAGGATT ATTTTTTGGT
910                               929
melipona      CAATGTTTCAG AAATTTGTGG
helleri      CAATGTTTCAG AAATTTGTGG

```

Figura 27. Alinhamento, obtido através do *software* MultiAlign (Corpet, 1988), entre seqüências de *Partamona helleri* e *Melipona bicolor* (Silvestre, 2002) localizadas entre os *primers* COI-IIF/mtD18 do DNAm^t de ambas espécies. 1 a 267: região 3' do gene COI; 268 a 325: tRNA^{Leu}; 326 a 929: região 5' do gene COII. Região marcada em azul: seqüência do tRNA^{Leu}. Substituições de bases estão destacadas em azul.

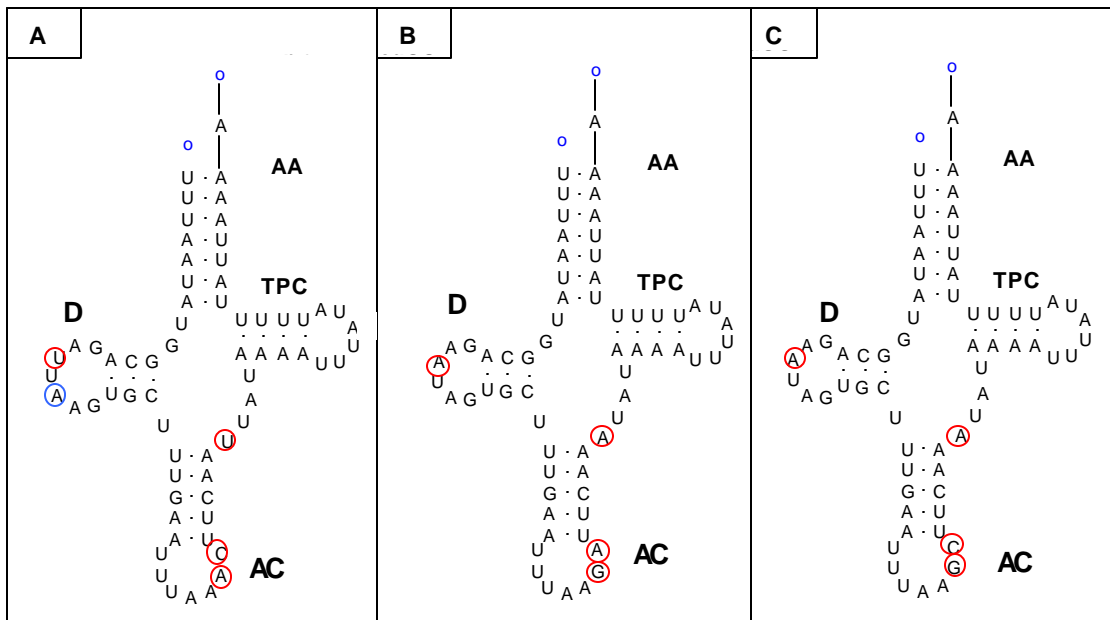


Figura 28. Comparação entre os tRNAs da Leucina (L2) de A) *Melipona bicolor*; B) *Partamona mulata* e C) *P. helleri*. ○ *ndel*; ○ *Mutação*.

ANEXO 2

CARACTERIZAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES: PARTE II

1. SEQUENCIAMENTO DE LOCOS MICROSSATÉLITES

1.1. METODOLOGIA

Os locos utilizados para o estudo populacional de *P. mulata* e *P. helleri* (Mbi11, Mbi28, Mbi32, Mbi33, Mbi201, Mbi218, Mbi215, Mbi278, Mbi522, T3-32 e T4-171) foram sequenciados a fim de se conhecer o tipo de repetição contida nas bandas visualizadas nos géis de poliacrilamida. Os locos foram amplificados num volume final de 50 μ l, utilizando-se o DNA chelex de *P. helleri* como molde. Alelos de locos estudados apenas em *P. mulata* foram amplificados a partir do DNA desta espécie.

Os produtos das PCRs foram precipitados com 10 μ l de acetato de amônio 5 M e 100 μ l de etanol absoluto, por 5 minutos em temperatura ambiente. Seguiu-se uma centrifugação a 12.000 rpm* por 5 minutos, à temperatura ambiente, descartando-se o sobrenadante posteriormente. O precipitado foi então lavado com etanol 70 % a -20 °C, e centrifugado novamente por 5 minutos. O precipitado foi secado em bomba de vácuo e ressuspenso em 10 μ l de TE 1X, dos quais 3 μ l foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% e corados com brometo de etídeo para quantificação visual do DNA.

As ligações foram montadas usando-se o kit pGEM[®] T-easy Vector I (PROMEGA): 1 μ l de T4-DNA ligase (kit); 1 μ l de vetor de clonagem (kit); 50 ng de DNA; e H₂O para completar o volume até 10 μ l. Seguiu-se então a incubação da ligação a 4 °C pela noite. Após esse período, a ligação foi estocada em freezer (-20° C) até o momento da transformação.

* – Centrifuga Eppendorf 5415 C, rotor de ângulo fixo modelo F - 45 - 18 - 11.

Células competentes de *Escherichia coli*, linhagem DH5 α , foram preparadas pelo método descrito por Sambrook *et al.* (1989) e transformadas com os plasmídeos recombinantes por meio da seguinte metodologia:

1. Incubar 100 μ l de células competentes com 30 ng de plasmídeo recombinante (ligação) por 15 minutos em gelo;
2. Incubar o tubo em banho-maria a 37 °C por cinco minutos;
3. Transferir rapidamente o tubo para o gelo e incubar por 15 minutos;
4. Adicionar 250 μ l de meio de cultura LB e incubar a 37 °C sob agitação de 250 rpm por uma hora;
5. Plaquear as células em meio LB-ágar com ampicilina e X-gal e incubar a 37 °C em estufa pela noite;
6. Transferir colônias brancas (contendo plasmídeo recombinante) separadamente para tubos contendo meio LB e incubar pela noite a 37 °C sob agitação de 250 rpm.

Os plasmídeos recombinantes foram extraídos de colônias positivas, utilizando-se o protocolo de miniprep descrito no manual “Automated DNA Sequencing Chemistry Guide” da Perkin Elmer Corporation (<http://www.appliedbiosystems.com>).

A verificação do sucesso da clonagem foi realizada pela digestão dos plasmídeos com uma enzima que apresenta sítios de restrição flanqueando o sítio de recombinação do plasmídeo M13, no caso a *EcoR* I. As digestões foram montadas usando-se 1 μ l da extração miniprep, 5 U de enzima, 2 μ l de tampão e água deionizada para completar o volume de 20 μ l e posteriormente incubadas por uma hora a 37°C. O tamanho, concentração e a pureza do fragmento clonado foram observados em gel de agarose 2 % corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador de luz UV.

Os fragmentos que apresentaram o tamanho esperado, 150 a 200 pb, foram usados para a reação de seqüenciamento: 2 µl do kit Big Dye Terminator kit (Applied Biosystem), 400 ng de DNA, 4 µl de *primer forward* ou *reverse* do plasmídeo M13, os quais flanqueiam o sítio de clonagem. As reações de PCR de seqüenciamento foram de acordo com a recomendação do fabricante (www.appliedbiosystems.com).

Os fragmentos de fita simples resultantes foram analisados em seqüenciador automático ABI-PRISM 310 (Perkin Elmer) do Instituto de Biociências da USP. As seqüências foram analisadas usando-se os programas TRACEVIEWER (<http://hgsc.bcm.tmc.edu>), GENERUNNER V3.00 (Hastings Software) e MULTIALIGN 5.4.1 (Corpet, 1988). O programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) foi utilizado para verificação da similaridade entre as seqüências obtidas e as demais seqüências de microsatélites de insetos depositadas no GenBank.

1.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DNA de *P. helleri* foi utilizado para amplificação dos locos: Mbi11, Mbi28, Mbi32, Mbi33, Mbi201, Mbi218, Mbi215, Mbi278, Mbi522 e T4-171. O DNA de *P. mulata* foi usado para amplificação do loco T3-32, o qual só foi amplificado com sucesso para esta espécie.

Os resultados dos seqüenciamentos estão apresentados na figura 29. Nenhum loco apresentou repetição do tipo “perfeita”. Microsatélites imperfeitos, com bases inseridas entre as repetições foram observados nos locos Mbi215, Mbi522 e T3-32. Dois

locos apresentaram microsatélites compostos: Mbi32 e T4-171. Todos os outros locos apresentaram repetições “interrompidas”.

Não foram observados entre os locos seqüenciados, repetições idênticas àquelas descritas para as espécies a partir das quais os *primers* foram desenhados (ver Tabela 3). Alguns locos apresentaram repetições semelhantes tal como T3-32, que apresenta onze repetições **CT** tanto em *Scaptotrigna postica* (Paxton *et al.*, 1999a) quanto em *Partamona*. Porém, para a primeira espécie a estrutura da repetição é “perfeita” (CT)₂₁, enquanto que na segunda é “interrompido” (CT)₄AC(CCT)₇, tal como observado para *Plebeia remota* (Francisco, 2002). A maioria dos locos **Mbi** apresentou a seqüência básica da repetição tal como descrito para *Melipona bicolor*: Mbi11 (AAC); Mbi28 (TCC); Mbi33 (TCC); Mbi201 (CTT); Mbi215 (TTC); e Mbi278 (CTT) (Figura 29 e Tabela 3). Entretanto, a estrutura das repetições (número, interrupções, composição com outras repetições) é diferente. Por exemplo, o loco **Mbi215** em *M. bicolor* (Peters *et al.*, 1998) e em *P. remota* (Francisco, 2002) é um microsatélite perfeito (TTC)₆, enquanto que em *Partamona* este se apresenta interrompido (TTC)₅GTC(TTC).

O loco Mbi32 apresenta uma seqüência semelhante à estrutura de repetição de *M. bicolor* (Tabela 3), destacada em verde na figura 29. Porém a região que melhor caracteriza esse loco como microsatélite é a seqüência (AGT)₂(AGC)₄. Por fim, o loco T4-171 apresentou repetições (CT) como *S. postica* (Paxton *et al.*, 1999a), porém composto com repetições (AC).

As seqüências foram submetidas ao BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>) e todas aquelas amplificadas com *primers* “Mbi” apresentaram alta similaridade com as seqüências de microsatélite de *M. bicolor*.

<p>Mbi 11</p> <p>1 70 CGTTCGTTCT TCCCAATGTC ACGCGATTAT TATTT CGCGC GTGTACCGTG CCA AGAGAGA GACCAAAGTG 71 137 AATCCACGAG TCCGCGATAA ATCGCT ACCA CCACCACC TT ACCACC GCC GCCGGTAAA TTCGATC</p> <p>Mbi28</p> <p>1 70 TTTTATCGCT CCGTATCCTCC CACCACATTC TCCCCATCT CCTCCATT TC CTTCTCTCC TCCCTTTCTA 71 105 TCTCCTACTC CCTTTC CACA CCGTCCTGTT GGATT</p>
<p>Mbi 32</p> <p>1 70 CTTTATCCGG TGCGTCGAAA CTTTTGGTGC ACGTTCCCGG T AGTAGTAGC AGCAGCAGC GCGCGAGCGG 71 140 C GGAGGA GTG GGGGTGCC AG AGAAGGAGAA GGCTTTCAGG CTCGTTCTTC CGGTGCAACA ACCCGGAATG</p>
<p>Mbi 33</p> <p>1 70 ATCACCTAAC TTGGCATCCC TGCGGTATAC TTGTGCGGC AGGGCACGCG GAGGA GTCCC TCTGC ACC GA 71 141 ACCACCGTTT CTCTCC TCT TCCTCC TCT CTCTCC CT AGAAGACTCC CCC TCCTCT GGCCCTTGATC</p>
<p>Mbi 201</p> <p>1 70 GTTAATCGC CCAAAGAGGC TGTTTCTCT CTCCTGTGC CCCCAGTAC TCCGCTA TTC GCCATT CGT 71 126 GCCTCTCT CTTC CTTGT CGGAATCTC TGCTGGT CGT GCTCCTTCTC GTCAAC</p>
<p>Mbi 215</p> <p>1 70 AGAGACGAAA AGTGGCGG TG GTGG TTCTTC TTCTTC TCT TCT TTCACCA CGAAGTGTA AACACCCCTA 71 95 GCCACAAATC TCTCCGCCG CTATC</p>
<p>Mbi 218</p> <p>1 70 CTCGACTTAA TTTCCATCGG CGGACCCGCC TTAATTGCAT CCTTTAATTT TTCTTCTCT TTTTCTCTT 71 121 CTTCTTTTT TTTTTTTT C ATTGTCGCCA CGC GGTCGCG ATTGAAATTG C</p>
<p>Mbi 278</p> <p>1 70 GTTCTGTGTT CGTGGTGAAT GTCTCGCGC CTTCTCCTCC TT TTATACTT CTTCTCTTC TTCT CGTCT 71 104 CTTCTGCTT CTT CATCGTC AGAGTTCTCG CAACCCTTC</p> <p>Mbi 522</p> <p>1 70 CCCTGGACAA ATACAAACGT AAAATGTGTG CTGCCAT TGC TGCTGCTGCT GT TGCTGCTG CTAACGACTG 71 135 TTTATCATT CACGCAGTCA CGTACTGAA CGAAAACGTT CGAAA TTCGG AGAAGAGCAT TGTT</p>
<p>T3-32</p> <p>1 70 GCGGGAGGGA AAGTCTCTC GCTGAC TCT CTCTC ACTCT CTCTCTCTCT C TGTGATCCC GCTCACGTCC 71 93 TTCCGCACG CCTGACGAAG ACG</p>
<p>T4-171</p> <p>1 70 GGTGCCGTCC GAGTCATTAG CTCGAAAAA GCCTAA CTCT CTCTCTCTCT CACACACAC ACACACA CCT 71 104 CTAATTTCCA CGTTC CCTT TTTCACTGA TTCA</p>

Figura 29. Sequências de locos microssatélites amplificados de *Partamona*. Os números indicam os tamanhos das sequências em pares de bases. Em cinza: *primers*. Em azul e vermelho: repetições microssatélites. Em verde: estrutura semelhante à repetição de *M. bicolor*. As sequências foram depositadas no GenBank sob os números de acesso, respectivamente: AY866506; AY866507; AY866508; AY866509; AY866510; AY866511; AY866512; AY866513; AY866514; AY866515; AY866516.