

Flávio de Oliveira Francisco

Diversidade Genética de Populações
da Abelha sem Ferrão *Plebeia remota*:
Análise do DNA Mitocondrial e Microssatélites

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Mestre em
Ciências, na Área de Biologia/Genética

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Cristina Arias

São Paulo

2002

FICHA CATALOGRÁFICA

Francisco, Flávio de Oliveira

Diversidade genética de populações da abelha sem ferrão *Plebeia remota*: análise do DNA mitocondrial e microssatélites

vii + 140 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Biologia.

1. *Plebeia remota* 2. DNA mitocondrial 3. Microssatélites

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Biologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Maria Cristina Arias

Orientadora

DEDICATÓRIA

*Às inúmeras Plebeia remota que perderam suas
vidas para a realização deste trabalho,
à minha mãe, ao meu pai,
à minha orientadora
e a Deus
Dedico*

EPÍGRAFE

INSTANTES

Se eu pudesse viver novamente a minha vida, na próxima trataria de cometer mais erros. Não tentaria ser tão perfeito, relaxaria mais. Seria mais tolo ainda do que tenho sido, na verdade bem poucas coisas levaria a sério. Seria menos higiênico. Correria mais riscos, viajaria mais, contemplaria mais entardeceres, subiria mais montanhas, nadaria mais rios. Iria a mais lugares onde nunca fui, tomaria mais sorvete e menos lentilha, teria mais problemas reais e menos problemas imaginários. Eu fui dessas pessoas que viveu sensata e produtivamente cada minuto da sua vida: claro que tive momentos de alegria. Mas, se pudesse voltar a viver, trataria de ter somente momentos bons. Não os perca agora. Eu era desses que nunca ia a parte alguma sem ter um termômetro, uma bolsa de água quente, um guarda-chuva e um pára-quadras: se voltasse a viver viajaria mais leve. Se eu pudesse voltar a viver, começaria a andar descalço no começo da primavera e continuaria assim até o fim de outono. Daria mais voltas na minha rua, contemplaria mais amanheceres e brincaria com mais crianças, se tivesse outra vez uma vida pela frente. Mas já viram, tenho 85 anos e sei que estou morrendo.

(o argentino Jorge Luiz Borges, falecido na Suíça em 1987, é considerado um dos maiores escritores do século)

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Maria Cristina Arias... palavras são insuficientes para expressar a minha gratidão...

À todas as pessoas (presentes e passadas) do LGEA: Dã, Campinas, Patrícia, Geraldo, Leila, Dani λ e Rutí.

Às outras pessoas que me deram o prazer do convívio: Eli, Susy, Dani Baby, Maria Elena, Lyria Mori e Eliana Dessen.

À Dra. Vera Lúcia Imperatriz-Fonseca e à Dra. Márcia de Fátima Ribeiro do Laboratório de Abelhas.

A Eduardo Mattos, Geraldo Moretto, Carlos Chociai e Sebastião Gonzaga pelo fornecimento e coleta do material biológico.

Ao Dr. Paulo Otto e ao Dr. Gabriel Melo.

À todos meus amigos do IB.

À FAPESP.

À Márcia.

À Drica, que não faz idéia do quanto me ajudou.

Ao meu pai.

À minha mãe.

A Deus.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
1. As Abelhas sem Ferrão	2
1.1. <i>O SUBGÊNERO PLEBEIA SCHWARZ SENSO ESTRITO</i>	3
<u>1.1.1. A espécie <i>Plebeia remota</i> Holmberg</u>	3
2. Marcadores Moleculares	6
2.1. <i>O DNAMT DOS ANIMAIS</i>	8
<u>2.1.1. O DNAMt e as abelhas</u>	10
2.2. <i>OS MICROSSATÉLITES</i>	10
<u>2.2.1. Os microsatélites e as abelhas</u>	15
2.3. <i>O DNAMT E OS MICROSSATÉLITES EM ABELHAS</i>	16
II. OBJETIVO	17
III. MATERIAIS E MÉTODOS	19
1. RFLP DO DNAMT	23
1.1. <i>EXTRAÇÃO DE DNA</i>	24
1.2. <i>DIGESTÃO DO DNAMT</i>	25
1.3. <i>“SOUTHERN BLOT”</i>	27
1.4. <i>PCR</i>	28
1.5. <i>ANÁLISE DOS DADOS</i>	31
2. MICROSSATÉLITES	34
2.1. <i>TESTES INICIAIS</i>	34
<u>2.1.1. Extração de DNA</u>	34
<u>2.1.2. “Primers”</u>	34
<u>2.1.3. PCR</u>	36
<u>2.1.4. Visualização</u>	37
<u>2.1.5. Seleção de locos</u>	37
2.2. <i>SEQÜENCIAMENTO</i>	38
2.3. <i>ANÁLISE POPULACIONAL</i>	40
<u>2.3.1. Extração de DNA</u>	40

<u>2.3.2. PCR e visualização</u>	40
<u>2.3.2. Análise dos dados</u>	41
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
1. RFLP DO DNAMT	46
2. MICROSSATÉLITES	69
2.1. TESTES INICIAIS	69
2.2. SEQÜENCIAMENTO	70
2.3. PRÉ-ANÁLISE: COLMÉIAS DE SP (C E C-SP) E PRP (P-SP E P)	73
<u>2.3.1. Cinco indivíduos</u>	73
<u>2.3.2. Um indivíduo</u>	75
<u>2.3.3. Conclusões da pré-análise</u>	77
2.4. ANÁLISE TOTAL (SP, PRP, PRC E SC)	78
2.5. COMPARAÇÃO INTERESPECÍFICA	103
V. CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
VI. RESUMO	111
VII. ABSTRACT	113
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
IX. APÊNDICE	132

I. Introdução



REINO Animalia
FILO Arthropoda
CLASSE Insecta
ORDEM Hymenoptera
SUPERFAMÍLIA Apoidea
FAMÍLIA Apidae
SUBFAMÍLIA Apinae
TRIBO Meliponini
GÊNERO *Plebeia*
SUBGÊNERO *Plebeia*
ESPÉCIE *Plebeia remota*

1. As Abelhas sem Ferrão

As abelhas da tribo Meliponini (abelhas sem ferrão) encontram-se amplamente distribuídas pelas regiões tropicais do planeta (WILLE, 1979). Ao sul, sua distribuição chega até 35°S na Austrália e América do Sul e até 28°S na África (MICHENER, 2000). Ao norte, o limite de sua distribuição alcança o trópico de Câncer (MICHENER, 2000).

Cerca de 400 espécies, englobando aproximadamente 50 gêneros (VELTHUIS, 1997) foram descritas, no entanto esse número pode estar sendo subestimado devido ao grande número de espécies crípticas (MICHENER, 2000). A maior abundância e diversidade dessas abelhas ocorre nos neotrópicos (WILLE, 1979; CAMARGO E PEDRO, 1992). Nessas áreas, a tribo Meliponini está representada por cerca de 30 gêneros e aproximadamente 300 espécies (CAMARGO E PEDRO, 1992). O Brasil é um dos principais locais de ocorrência dos meliponíneos, sendo esses de grande importância para a ecologia de diversos ecossistemas. Por exemplo, a polinização de grande parte da Mata Atlântica é realizada fundamentalmente por essas abelhas (KERR *et al.*, 1996).

1.1. O SUBGÊNERO *PLEBEIA SCHWARZ SENSU ESTRITO*

De acordo com a classificação de MICHENER (2000), o gênero *Plebeia* Schwarz é composto por três subgêneros: *Plebeia* Schwarz, *Scaura* Schwarz e *Schwarziana* Moure. As abelhas pertencentes ao subgênero *Plebeia* são caracterizadas por serem pequenas (3-6 mm de comprimento), apresentarem marcas brancas ou amarelas na face ou no tórax, e nidificarem em cavidades de árvores, cavidades artificiais, ou no chão (MICHENER, 2000). Esse subgênero é representado por aproximadamente 30 espécies (MICHENER, 2000), entretanto, acredita-se que esse número possa chegar a até 50 (MOURE, comunicação pessoal). É um subgênero de origem pós “Gondwana”, com distribuição do México à Argentina (MICHENER, 2000), cujo centro de origem parece ser as regiões Sul e Sudeste do Brasil (CAMARGO E WITTMANN, 1989), lugares esses onde é encontrada a maior diversidade de espécies pertencentes a esse subgênero (MICHENER, 2000).

Existe um paradoxo acerca das abelhas desse subgênero: elas são morfologicamente primitivas (MICHENER, 1990), mas possuem traços derivados de comportamento (VAN BENTHEM *et al.*, 1995). Para CAMARGO E PEDRO (1992) o grupo *Plebeia* é pobremente definido, sendo as relações entre os táxons obscuras e incertas. Controvérsias sobre a classificação e sistemática desse gênero são freqüentemente relatadas na literatura (CAMARGO E PEDRO, 1992).

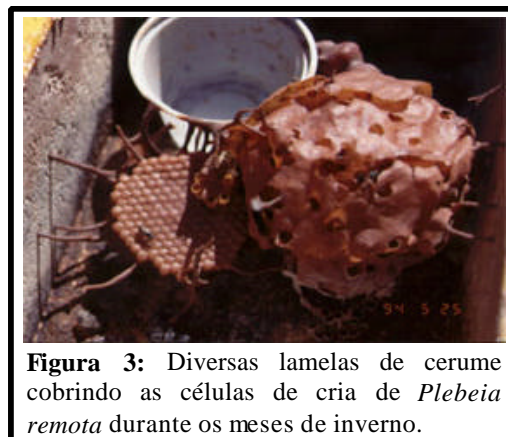
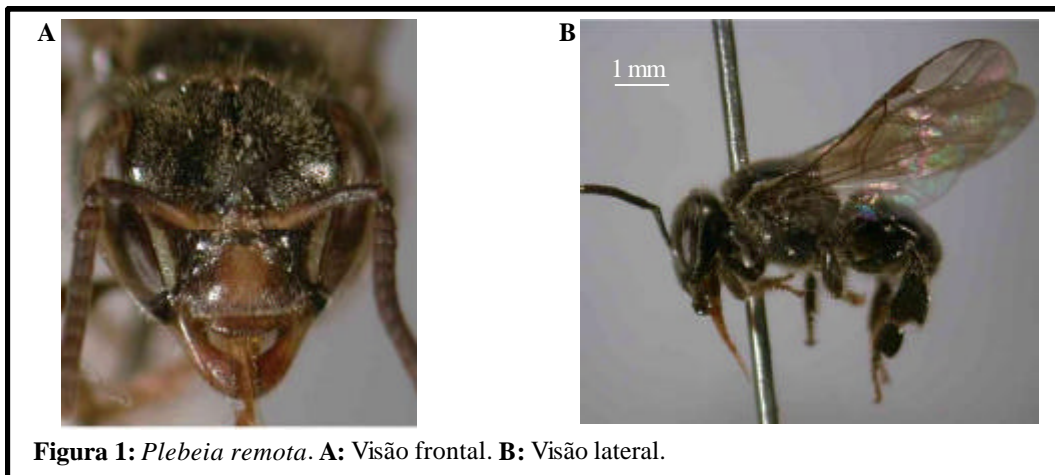
1.1.1. A espécie *Plebeia remota* Holmberg

A espécie *Plebeia remota* (**Figura 1**) está geograficamente distribuída pelos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (NOGUEIRA-NETO,

1970), sendo possível encontrá-la também nos países adjacentes a esses estados (VAN BENTHEM *et al.*, 1995). As abelhas dessa espécie costumam nidificar em cavidades de árvores, sendo possível que a colméia possa ter até 5.000 indivíduos (VAN BENTHEM *et al.*, 1995).

Existem nas colméias de *P. remota* numerosos cabos de cerume (**Figura 2**), formando uma “rede” que servem como “andaimes” para ligar e fixar os favos de cria, células em cacho, potes etc. (NOGUEIRA-NETO, 1997). Durante o inverno, diversas lamelas de cerume (invólucro) são construídas pelas operárias, envolvendo as células de cria (**Figura 3**). A presença dessa camada de cerume parece estar associada com a termorregulação do ninho (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Os aspectos de biologia geral e principalmente de comportamento dessa espécie, estão sendo estudados pelo Laboratório de Abelhas do Departamento de Ecologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Observações recentes feitas nesse laboratório quanto às características do cerume, como a cor e o cheiro, e ao comportamento, têm mostrado diferenças importantes entre colméias de *P. remota* provenientes de duas localidades, Cunha (SP) e Prudentópolis (PR), como por exemplo, o período de redução da atividade das abelhas durante o inverno, período em que a postura de ovos e a construção de células de cria são interrompidos. Existe uma tendência de que isso ocorra por um maior período de tempo (de março a setembro) em *P. remota* de Prudentópolis. Nas abelhas de Cunha, essa diminuição de atividade ocorre por menor tempo, geralmente de maio a agosto (RIBEIRO, comunicação pessoal). Tais diferenças observadas podem ser um reflexo de um isolamento comportamental e ecológico entre essas duas populações.



2. Marcadores Moleculares

Até o ano de 1966, o estudo de polimorfismos nas populações era realizado com base nos fenótipos dos organismos. Como os variantes fenotípicos são raros, as populações eram freqüentemente classificadas como geneticamente homogêneas (FUTUYMA, 1992). Em um dos primeiros ensaios de variação genética envolvendo o uso de um marcador molecular, foi observado que cerca de 30% dos locos em cinco populações de *Drosophila pseudoobscura* eram polimórficos (LEWONTIN E HUBBY, 1966). A técnica utilizada por esses autores foi a eletroforese de proteínas, demonstrada inicialmente por HARRIS (1966) e HUBBY E LEWONTIN (1966). A partir de então, essa técnica foi amplamente usada em escala populacional em vários tipos de organismos, representando uma revolução para a genética de populações (SOLFERINI E SELIVON, 2001). No entanto, para alguns organismos essa técnica não é a mais apropriada, pois detecta pouca variabilidade, como por exemplo, em insetos sociais (PAMILO *et al.*, 1975; PAMILO *et al.*, 1978; PAMILO E CROZIER, 1981).

Com a descoberta das enzimas de restrição no ano de 1968 (LINN E ARBER, 1968; MESELSON E YUAN, 1968) e o conseqüente desenvolvimento da técnica de RFLP (do inglês “Restriction Fragment Length Polymorphism”), surgiu um novo tipo de marcador amplamente utilizado em diversos tipos de estudos, inclusive populacionais. Marcadores do tipo RFLP possuem algumas vantagens em relação à eletroforese de proteínas e marcadores morfológicos e citológicos, pois, com algumas exceções, possuem herança mendeliana, são seletivamente neutros, podem ser obtidos em número elevado e estão distribuídos aleatoriamente no genoma (ARIAS E INFANTE-MALACHIAS, 2001).

Atualmente existe uma ampla gama de marcadores moleculares descritos (por exemplo, ORITA *et al.*, 1989; WILLIAMS *et al.*, 1990; GUPTA *et al.*, 1994; VOS *et al.*, 1995) e que podem ser empregados em vários tipos de estudos, tais como forenses, comportamentais, de estrutura populacional, de sistemática, relações evolutivas entre organismos, entre outros. A escolha dos marcadores a serem empregados depende de alguns fatores como disponibilidade de recursos, experiência do pesquisador e até mesmo modismo (SOLFERINI E SELIVON, 2001). Outro fator refere-se ao tipo de problema a ser analisado (DOWLING *et al.*, 1996; SUNNUCKS, 2000).

Existem duas classes de marcadores moleculares, os dominantes e os codominantes. A escolha de qual marcador a ser utilizado em um determinado problema também pode depender da classe a que ele pertence. Sabe-se que o uso de marcadores RAPD (dominante) em estudos de genética de populações requer de duas a dez vezes mais indivíduos e mais locos quando comparados a marcadores codominantes, como RFLP e microssatélites (LYNCH E MILLIGAN, 1994; BAVERSTOCK E MORITZ, 1996). Essa informação é de grande importância, pois estudos que envolvam pouca disponibilidade de material biológico, por exemplo, devem se basear no uso de marcadores codominantes.

O estudo genético da biologia de populações deve estar concentrado no uso de marcadores haplóides e/ou codominantes, pois eles fornecem dados mais robustos para as análises quando comparados a marcadores dominantes, que possuem desvantagens técnicas e analíticas (SUNNUCKS, 2000). O DNA mitocondrial (DNAm) e os microssatélites são dois marcadores moleculares que se enquadram nessas categorias, e que têm sido usados extensivamente em estudos populacionais e evolutivos, pois eles

revelam diferentes tipos de informação e são eficazes não somente na detecção de diferenciação, mas também na detecção de diferentes processos em uma perspectiva ecológica e evolutiva (HAAVIE *et al.*, 2000).

2.1. O DNAMT DOS ANIMAIS

Desde a década de 1970 a análise do DNAMt tem se estabelecido como uma poderosa ferramenta para estudos evolutivos em animais (MORITZ *et al.*, 1987). O DNAMt dos animais é uma molécula circular e pequena, com cerca de 14.000 a 26.000 pares de bases. Essa variação de tamanho, embora pareça grande, é ainda bem menor quando comparada àquelas apresentadas entre os protistas, as plantas e os fungos (SEDEROFF, 1984; MORITZ *et al.*, 1987). O DNAMt é uma molécula peculiar por apresentar herança materna; ausência de recombinação; conteúdo gênico conservado; regiões intergênicas pequenas ou ausentes; ausência de introns, de DNA repetitivo, de pseudogenes, de elementos transponíveis; e alta taxa de evolução (MORITZ *et al.*, 1987). Estima-se que, em primatas, a evolução do DNAMt seja até dez vezes maior do que a evolução de um gene nuclear de cópia única (BROWN *et al.*, 1979; MORITZ *et al.*, 1987). No entanto, genes nucleares envolvidos na biogênese mitocondrial evoluem mais rapidamente que os demais, possuindo a mesma taxa de evolução do DNAMt (PIETROMONACO *et al.*, 1986; MORITZ *et al.*, 1987). Ainda, alguns organismos possuem a taxa de evolução do genoma mitocondrial igual à de um gene nuclear de cópia única, como por exemplo, *Drosophila* (POWELL *et al.*, 1986).

O conteúdo gênico da molécula de DNAMt dos animais mostra-se muito conservado, apresentando dois genes para subunidades ribossômicas (12S e 16S), 22

para os RNA transportadores (RNAt), três para as subunidades da enzima citocromo oxidase (COI, II e III), um para o citocromo B, dois para as subunidades da ATPase (6 e 8) e sete para as subunidades da NADH desidrogenase. Existe também uma região não codificadora, rica em A+T, responsável pela origem de replicação e transcrição da molécula (WOSTENHOLME, 1992). O tamanho dessa região exibe grande variação entre os organismos, sendo detectado por vezes polimorfismo de tamanho a nível intraespecífico (MORITZ *et al.*, 1987).

O fato da molécula de DNAm apresentar uma alta taxa de evolução, ser pequena e de estrutura gênica simples, faz com ela seja muito utilizada em estudos de caráter evolutivo e filogenético (BROWN, 1985; HARRISON, 1989). O polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) do DNAm é uma das metodologias a qual tem sido freqüentemente empregada em estudos de populações naturais (AVISE *et al.*, 1987). Portanto, a rápida taxa de evolução do DNAm possibilita que a análise de restrição dessa molécula seja bem sucedida em estudos entre táxons com divergência recente, como por exemplo, populações (DESALLE *et al.*, 1986).

Devido ao fato do DNAm ser de herança materna, estudar a diferenciação dessa molécula equivale a estudar a população de fêmeas. Isso, combinado com o fato do DNAm ser haplóide, faz com que o tamanho efetivo da população estudada seja quatro vezes menor do que quando se utiliza um marcador nuclear diplóide (HAAVIE *et al.*, 2000).

2.1.1. O DNAmT e as abelhas

O primeiro estudo no Brasil de caracterização total do DNAmT por RFLP em abelhas, ocorreu no ano de 1990 com abelhas *Apis mellifera* africanizadas e européias (ARIAS *et al.*, 1990). A primeira publicação brasileira empregando essa metodologia nas abelhas sem ferrão só veio a ocorrer neste século, envolvendo cinco espécies do gênero *Plebeia* (FRANCISCO *et al.*, 2001). Em *A. mellifera* o DNAmT foi uma das principais moléculas empregadas no entendimento da estrutura populacional, mecanismos de dispersão e determinação de possíveis limites de ocupação dessas abelhas com relação às barreiras climáticas nas Américas (SHEPPARD *et al.*, 1991a; SHEPPARD *et al.*, 1991b; LOBO, 1995). Para estudos de detecção de polimorfismos a nível populacional e intersubespécífico de *A. mellifera*, o DNAmT também tem sido empregado com sucesso (MORITZ *et al.*, 1986; SMITH, 1988; GARNERY *et al.*, 1992; SHEPPARD *et al.*, 1994; ARIAS E SHEPPARD, 1996). O seqüenciamento total do genoma mitocondrial de *A. mellifera* (CROZIER E CROZIER, 1993), o primeiro a ser realizado em um himenóptero, sem dúvida contribuiu bastante para o avanço desses estudos em abelhas de um modo geral, principalmente pela facilidade em se desenhar “primers” para a amplificação de regiões de interesse (por exemplo, SIMON *et al.*, 1994; FRANCISCO *et al.*, 2001).

2.2. OS MICROSSATÉLITES

Os microsatélites são seqüências de uma a seis bases de comprimento repetidas em tandem (HANCOCK, 1999). No entanto, não existe ainda na literatura um consenso sobre o número máximo de bases na repetição que um microsatélite possa vir a ter (MATIOLI E PASSOS-BUENO, 2001). O termo microsatélite foi usado inicialmente

apenas para as repetições CA (ou GT) (LITTE LUTY, 1989; HANCOCK, 1999), enquanto que termos como “simple sequences” (TAUTZ, 1989) e “short tandem repeats” (EDWARDS *et al.*, 1991) foram usados para designar outros tipos de repetições (HANCOCK, 1999). Atualmente, o termo microssatélite tem sido amplamente aceito e utilizado para designar todas as repetições que envolvam pequeno número de bases (HANCOCK, 1999).

Os microssatélites têm sido descritos em todos os organismos até hoje analisados (HANCOCK, 1999). Estão distribuídos aleatoriamente pela região eucromática do genoma (SCHLÖTTERER E WIEHE, 1999), embora sejam raros nas regiões codificadoras (HANCOCK, 1999). Plasmídeos, DNAm e DNA de cloroplastos também podem possuir microssatélites. Os microssatélites podem ser amplificados via PCR (“Polymerase Chain Reaction”) (SAIKI *et al.*, 1985; SAIKI *et al.*, 1988), utilizando-se “primers” flanqueadores, posicionados em regiões conservadas do genoma (WEBER E MAY, 1989; STRASSMANN *et al.*, 1996).

Os microssatélites podem ser organizados em quatro classes (GOLDSTEIN E SCHLÖTTERER, 1999):

1. Microssatélite Perfeito: seqüência de bases repetidas sem nenhuma interrupção.
Ex.: CTCTCTCTCT;
2. Microssatélite Imperfeito: uma ou mais repetições carregam uma base que não se encaixa na estrutura repetitiva. Ex.: CTCTCACTCT;
3. Microssatélite Interrompido: inserção de um pequeno número de bases que não se encaixam na estrutura repetitiva. Ex.: CTCTCAAACTCT;

4. Microssatélite Composto: dois ou mais microssatélites adjacentes com diferentes seqüências repetitivas. Ex.: CTCTCTCTCTGATGATGATGAT.

As interrupções parecem estabilizar os microssatélites, diminuindo a possibilidade de erro durante a replicação (WEBER, 1990), fazendo com que os microssatélites perfeitos possuam mais alelos do que os microssatélites interrompidos (CHUNG *et al.*, 1993; PÉPIN *et al.*, 1995).

A taxa de mutação dos microssatélites é muito variável e depende de vários fatores. Um deles é o número de repetições, pois se sabe que quanto maior for esse número, mais polimórficos serão os microssatélites (WEBER, 1990). Outro fator refere-se à composição de bases das repetições desses marcadores (ESTOUP E CORNUET, 1999) e ao tipo de repetição (CHAKRABORTY *et al.*, 1997). O tipo de genoma em que os microssatélites estão localizados também parece ser importante, pois já foi observado que microssatélites em cromossomos nucleares são mais estáveis do que microssatélites idênticos em plasmídeos (HENDERSON E PETES, 1992; EISEN, 1999). Entre diferentes organismos, a taxa de mutação dos microssatélites também varia. Estima-se que essa taxa seja de 10^{-3} por loco por geração em humanos (WEBER E WONG, 1993) e 6×10^{-6} por loco por geração em *Drosophila* (SCHUG *et al.*, 1997). Embora existam diferentes tipos de mutação que ocorrem nos locos de microssatélites, as alterações no número de repetições são as mais freqüentes (EISEN, 1999). Existem atualmente dois modelos para explicar o modo de mutação nos microssatélites:

1^o “Crossing-over” desigual (SMITH, 1976): a presença das repetições aumenta a probabilidade de erro no emparelhamento entre os cromossomos homólogos,

acarretando, após o “crossing-over”, em alterações no número original de repetições de cada cromossomo;

2º “Slipped-strand Mismatching” (STREISINGER *et al.*, 1966): um “deslize” da DNA polimerase, durante o processo de replicação do DNA, pode acrescentar ou diminuir repetições.

Existem evidências de que a elevada taxa de “Slipped-strand Mismatching” seja a principal responsável pelo grande número de polimorfismos dos microsatélites (SIA *et al.*, 1997; EISEN, 1999). Esses erros durante o processo de replicação do DNA são mais frequentes em microsatélites do que em outras regiões do genoma (EISEN, 1999).

Os microsatélites têm sido extremamente úteis em estudos de mapeamento gênico, relações de parentesco (CHAKRABORTY E KIMMEL, 1999), variação intraespecífica (MORITZ E HILLIS, 1996), hibridação, história populacional e filogeografia. Também têm sido empregados para avaliar o impacto do comportamento reprodutivo, estrutura social e dispersão em populações em extinção (BEAUMONT E BRUFORD, 1999). Atualmente, a utilização dos microsatélites tem sido bastante difundida na análise de polimorfismos (MATIOLI E PASSOS-BUENO, 2001).

Dentre as características dos microsatélites que os tornam úteis nesses vários tipos de estudos, destaca-se o fato deles serem caracteres mendelianos, codominantes, seletivamente neutros (suas seqüências não são codificadoras) e altamente polimórficos (STRASSMANN *et al.*, 1996). Polimorfismos nos microsatélites são determinados por novas mutações, deriva genética e seleção em genes “ligados” às seqüências repetitivas (SCHLÖTTERER E WIEHE, 1999).

Embora seja um marcador molecular de grande aplicação nos estudos acima mencionados, alguns problemas quanto ao seu emprego precisam ser ponderados, como a não amplificação via PCR de alelos devido a mutações nos sítios de ligação dos “primers” (CALLEN *et al.*, 1993; BEAUMONT E BRUFORD, 1999); ao fato da *Taq* polimerase poder gerar produtos com um número de repetições diferente do número presente nas fitas moldes (BEAUMONT E BRUFORD, 1999); e à dificuldade em se identificar e caracterizar microssatélites em algumas espécies (BEAUMONT E BRUFORD, 1999). No entanto, o maior problema está no modo de análise dos dados de microssatélites, que é a ausência de um modelo evolutivo bem substanciado que possa ser aplicado universalmente (BEAUMONT E BRUFORD, 1999). O atual modelo de estudo de evolução dos microssatélites é um modelo nulo, formulado quando se tinha apenas pouca evidência dos processos de mutação dos microssatélites, sendo que as suposições-base desse modelo são (AMOS, 1999):

1. Probabilidade dos microssatélites ganharem uma repetição é igual a perderem.

Tal simetria não é observada. Não se sabe os motivos, mas ganhar uma repetição é muito mais freqüente do que perder (AMOS, 1999).

2. O modelo teórico de mutação assumido é o “stepwise mutation model”.

O uso desse modelo não é unânime, existindo pelo menos, mais três modelos usados nos cálculos de parâmetros populacionais (ESTOUP E CORNUET, 1999).

3. Taxa de mutação constante.

Foram vistos acima, vários fatores que influenciam na variabilidade da taxa de mutação dos microssatélites.

2.2.1. Os microssatélites e as abelhas

O estudo de microssatélites em abelhas começou em 1993, com a descrição de alguns “primers” desenhados para *A. mellifera* e *Bombus terrestris* (ESTOUP *et al.*, 1993). Esse foi o ponto de partida para o uso desse marcador em vários tipos de estudos. Ainda envolvendo essas duas espécies, ESTOUP *et al.* (1995a) estudaram os processos mutacionais de microssatélites interrompidos e a frequência do fenômeno chamado de homoplasia de tamanho.

A primeira utilização dos microssatélites como marcador em um estudo de estrutura genética de populações de abelhas ocorreu em 1995 (ESTOUP *et al.*, 1995b), envolvendo subespécies africanas e européias de *A. mellifera*.

Em 1998, outro trabalho envolvendo homoplasia e estrutura populacional utilizou como material biológico três espécies de invertebrados, das quais duas eram espécies de abelhas, *A. mellifera* e *B. terrestris* (VIARD *et al.*, 1998). E foi nesse ano que surgiu o primeiro trabalho de microssatélites em abelhas da tribo Meliponini (PETERS *et al.*, 1998), descrevendo “primers” desenhados para *Melipona bicolor*. Com a descrição de mais “primers” desenhados para outro meliponíneo, *Scaptotrigona postica* (PAXTON *et al.*, 1999a), a utilização de microssatélites nas abelhas sem ferrão tomou novos rumos, com a aplicação desses marcadores em estudos comportamentais (PAXTON *et al.*, 1999b; PETERS *et al.*, 1999).

2.3. O DNAMT E OS MICROSSATÉLITES EM ABELHAS

A utilização desses dois tipos de marcadores em estudos populacionais e evolutivos é recente, e tem se mostrado muito adequada, com resultados muito promissores em outros organismos (por exemplo, ROSS *et al.*, 1997; SIMONSEN *et al.*, 1998; HAAVIE *et al.*, 2000). Em abelhas, a utilização desses dois tipos de marcadores está restrita a apenas dois gêneros: *Apis* e *Bombus*.

WIDMER *et al.* (1998) estudaram a estrutura genética populacional e a história de colonização de *B. terrestris* nas ilhas Canárias e da Madeira, e observaram que as abelhas dessas duas ilhas não compartilham uma história comum de colonização.

A estrutura genética de populações de *B. pascuorum* foi estudada por WIDMER E SCHMID-HEMPEL (1999), que observaram um isolamento parcial entre populações divididas pelos Alpes.

Os estudos envolvendo subespécies e populações de linhagens européias e africanas de *A. mellifera* foram realizados por FRANCK *et al.* (1998, 2000, 2001), que confirmaram a existência de algumas linhagens já reportadas com base na morfologia (RUTTNER, 1988) e no DNAMt (SMITH, 1991; ARIAS E SHEPPARD, 1996) e identificaram mais duas novas linhagens no nordeste do continente africano.

O sucesso do emprego do DNAMt e microssatélites em abelhas foi incentivador para o uso das mesmas metodologias em *P. remota*, visto que esses marcadores se complementam, tornando possível obter um quadro muito mais completo e detalhado da estrutura populacional dessa espécie.

II. Objetivo



Diante das evidências de que as abelhas da espécie *P. remota* provenientes de Cunha e Prudentópolis apresentam diferentes características, no que se refere à estrutura do ninho e ao comportamento, este trabalho teve por objetivo verificar se essas duas populações poderiam também estar diferenciadas geneticamente. Para tanto, resolvemos caracterizar essas e outras duas populações de *P. remota* utilizando dois marcadores moleculares, o DNAm_t e os microssatélites, com o intuito de detectar aspectos evolutivos como estruturação ou fluxo gênico entre elas.

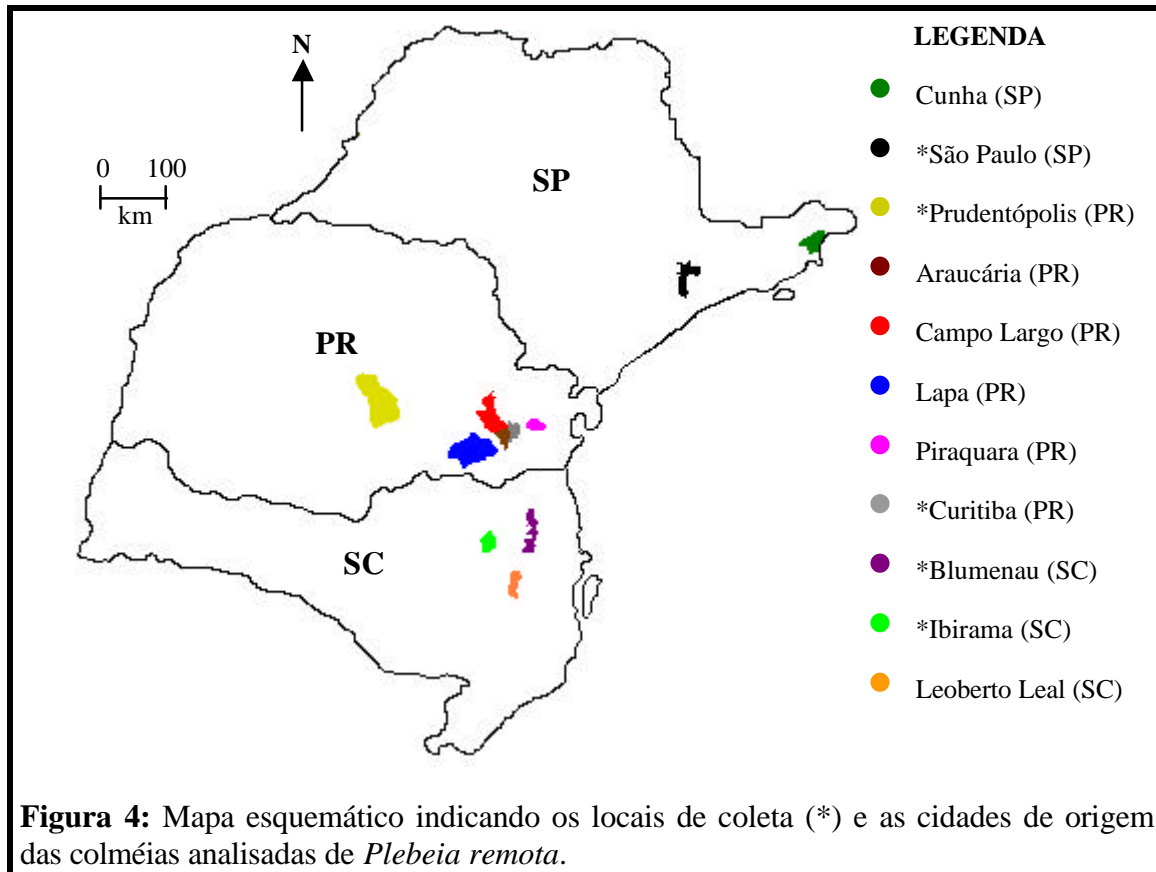
III. Materiais e Métodos



Neste trabalho foram analisados indivíduos de *P. remota* provenientes de três estados brasileiros (SP, PR e SC), totalizando nove localidades e 73 colméias, assim distribuídas:

- *Cunha (SP)*: 19 colméias originalmente coletadas em Cunha, porém mantidas no Laboratório de Abelhas do Departamento de Ecologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB/USP), localizado em São Paulo, SP;
- *Prudentópolis (PR)*: 35 colméias, sendo que 16 foram transportadas e mantidas no Laboratório de Abelhas do departamento de Ecologia do IB/USP; e 19 foram coletadas diretamente de um meliponário em Prudentópolis, PR;
- *Araucária (PR)*: uma colméia mantida por quatro anos na Associação Paranaense dos Apicultores, localizada em Curitiba (bairro Santa Cândida), PR;
- *Lapa (PR)*: três colméias mantidas por quatro anos na Associação Paranaense dos Apicultores, localizada em Curitiba (bairro Santa Cândida), PR;
- *Campo Largo (PR)*: duas colméias mantidas por seis anos na Associação Paranaense dos Apicultores, localizada em Curitiba (bairro Portão), PR;
- *Piraquara (PR)*: uma colméia mantida por seis anos na Associação Paranaense dos Apicultores, localizada em Curitiba (bairro Portão), PR;
- *Blumenau (SC)*: sete colméias, cujos indivíduos foram coletados de ninhos localizados em troncos de árvores da mesma cidade;
- *Ibirama (SC)*: quatro colméias recém transportadas da natureza para uma casa localizada na mesma cidade;
- *Leoberto Leal (SC)*: uma colméia mantida por um ano na Fundação Universidade Regional de Blumenau.

A **Figura 4** indica as cidades de origem das colméias, assim como as cidades de onde elas foram coletadas.



As abelhas coletadas no IB/USP foram mantidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a extração do DNA. As abelhas coletadas em Prudentópolis (PR) foram trazidas em álcool comum, lavadas e depois armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a extração do DNA. As abelhas provenientes das outras localidades foram trazidas em nitrogênio líquido e depois armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da extração do DNA.

Para melhor compreensão, as colméias originárias de Cunha serão denominadas como população **SP**. As colméias originárias de Prudentópolis, **PRp**. Os ninhos que estavam sendo mantidos em Curitiba, independentemente do lugar de origem, serão

denominados como população **PRc**. Finalizando, os ninhos originários de Blumenau, Ibirama e Leoberto Leal, serão a população **SC**. Para a divisão das amostras em quatro populações, foram considerados: a proximidade entre os locais originais das colméias e o número de colméias amostradas.

1. RFLP do DNAm

ABREVIATURAS DOS GENES MITOCONDRIAIS

12S: subunidade ribossômica menor;	A: RNA transportador de alanina;
16S: subunidade ribossômica maior;	C: RNA transportador de cisteína;
6: ATP F ₀ sintase subunidade 6;	D: RNA transportador de ácido aspártico;
8: ATP F ₀ sintase subunidade 8;	E: RNA transportador de ácido glutâmico;
COI: subunidade I do complexo citocromo oxidase c;	F: RNA transportador de fenilalanina;
COII: subunidade II do complexo citocromo oxidase c;	G: RNA transportador de glicina;
COIII: subunidade III do complexo citocromo oxidase c;	H: RNA transportador de histidina;
cytB: citocromo B;	I: RNA transportador de isoleucina;
ND1: subunidade 1 do complexo da NADH desidrogenase;	K: RNA transportador de lisina;
ND2: subunidade 2 do complexo da NADH desidrogenase;	L: RNA transportador de leucina;
ND3: subunidade 3 do complexo da NADH desidrogenase;	M: RNA transportador de metionina;
ND4: subunidade 4 do complexo da NADH desidrogenase;	N: RNA transportador de asparagina;
ND5: subunidade 5 do complexo da NADH desidrogenase;	P: RNA transportador de prolina;
ND6: subunidade 6 do complexo da NADH desidrogenase;	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.

A análise de RFLP do DNAm de *P. remota* envolveu um total de 70 colméias das 73 amostradas, sendo 18 de SP, 33 de PRp, sete de PRc, e 12 de SC. As três colméias restantes não puderam ser analisadas pois o número de indivíduos coletados não foi suficiente para a extração do DNA.

1.1. EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA total foi extraído de vinte indivíduos de cada colméia. As cabeças foram retiradas para evitar contaminação das extrações com produtos glandulares e com os pigmentos dos olhos; tais contaminantes poderiam interferir no processo de digestão do DNA e na reação de PCR.

O procedimento para extração de DNA total, descrito por SHEPPARD e MCPHERON (1991), foi adaptado para ser utilizado em *P. remota*. Abaixo segue a descrição do protocolo de extração:

1. Macerar vinte indivíduos (sem cabeça) em 1 ml do tampão A (10 mM Tris pH 7,0; 60 mM NaCl; 5% sacarose; 10 mM EDTA);
2. Acrescentar 1 ml do tampão B (300 mM Tris pH 7,0; 1,24% SDS; 5% sacarose; 20 mM EDTA; 0,8% DEPC);
3. Colocar no gelo por 15 minutos;
4. Adicionar 1 volume de fenol. Misturar bem;
5. Colocar no gelo por 3 minutos;
6. Centrifugar a 7.000 rpm por 5 minutos a 4 °C;
7. Recolher o sobrenadante e adicionar a esse 1 volume de fenol/clorofórmio. Misturar bem;

8. Colocar no gelo por 3 minutos;
9. Centrifugar a 7.000 rpm por 5 minutos a 4 °C;
10. Recolher o sobrenadante e adicionar a esse 1 volume de clorofórmio. Misturar bem;
11. Centrifugar a 7.000 rpm por 5 minutos a 4 °C;
12. Recolher o sobrenadante e adicionar a esse 1 volume de TE 1X (10 mM Tris; 1 mM EDTA), 1/20 de volume de acetato de sódio 3 M pH 7,0 e 10 ml de etanol 100%. Colocar em congelador a -20 °C por 2 horas;
13. Centrifugar a 12.000 rpm por 30 minutos a 4 °C;
14. Descartar o sobrenadante e dissolver o precipitado com 1 ml de TE 1X. Adicionar 50 µl de acetato de sódio 3 M pH 7,0 e 10 ml de etanol 100%. Colocar em congelador a -20 °C por 2 horas;
15. Centrifugar a 12.000 rpm por 30 minutos a 4 °C;
16. Descartar o sobrenadante e lavar o precipitado com 200 µl de etanol 70%;
17. Centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C;
18. Descartar o etanol 70% e secar o precipitado a vácuo por 4 minutos;
19. Dissolver o precipitado com 100 µl de TE 1X;
20. Armazenar a -20 °C.

1.2. DIGESTÃO DO DNAMT

O DNA total extraído foi digerido por 15 enzimas de restrição (**Tabela 1**). Digestões simples e duplas foram realizadas seguindo as recomendações do fabricante (Boehringer Mannheim), porém, incubadas pela noite. Para cada digestão utilizou-se

cinco ou 17 µl da extração de DNA e 5 U de enzima, num volume final de 20 µl. Tal variação na quantidade de DNA deveu-se ao fato de que o DNA das amostras mantidas em álcool apresentou-se muito degradado, sendo assim, foi necessária a utilização de um volume maior da extração por digestão.

Tabela 1: Enzimas de restrição utilizadas para digerir o DNAm_t de *Plebeia remota*, seus respectivos sítios de restrição e indicações do local de corte (▼).

Enzimas	Sítio de Restrição
<i>Bam</i> H I	G▼GATCC
<i>Bcl</i> I	T▼GATCA
<i>Bgl</i> II	A▼GATCT
<i>Cfo</i> I	GCG▼C
<i>Cla</i> I	AT▼CGAT
<i>Eco</i> R I	G▼AATTC
<i>Eco</i> R V	GAT▼ATC
<i>Hae</i> III	GG▼CC
<i>Hind</i> III	A▼AGCTT
<i>Nde</i> I	CA▼TATG
<i>Pst</i> I	CTGCA▼G
<i>Pvu</i> II	CAG▼CTG
<i>Sca</i> I	AGT▼ACT
<i>Xba</i> I	T▼CTAGA
<i>Xho</i> I	C▼TCGAG

Para as duplas digestões o DNA foi digerido com duas enzimas em uma única reação, com um tampão adequado para a atividade de ambas as enzimas. No entanto, quando não havia compatibilidade entre os tampões, as duplas digestões ocorreram em duas etapas: após a digestão com a primeira enzima, o DNA foi precipitado com 1,1 µl de EDTA 0,2 M pH 8,0; 2 µl de acetato de sódio 3 M pH 7,0 e 100 µl de etanol 100%, em congelador a -20 °C, por 2 horas, seguindo-se uma centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 100 µl

de etanol 70%. Seguiu-se uma centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O etanol 70% foi então, descartado e o precipitado foi secado a vácuo por 4 minutos e ressuscitado em 17,5 µl de água deionizada. Acrescentava-se a essa solução a outra enzima de restrição com seu tampão de atuação.

Os fragmentos de restrição gerados após as digestões foram separados em géis de agarose 1%, corados com brometo de etídeo e visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta (UV). Em seguida, os géis foram fotografados com câmara Polaróide.

1.3. “SOUTHERN BLOT”

A detecção dos fragmentos de restrição do DNAm_t foi realizada com a utilização da técnica de “Southern blot” descrita por SOUTHERN (1975).

Os fragmentos separados em gel de agarose foram transferidos para uma membrana de náilon, e esta foi posteriormente hibridada com sonda heteroespecífica produzida a partir do DNAm_t de *A. mellifera*. Esse DNA foi obtido por amplificação via PCR do genoma mitocondrial completo dessa abelha, utilizando-se 12 pares de “primers” específicos (ARIAS *et al.*, 1998). Foram usados em média, 5 µl de cada um desses fragmentos amplificados, correspondendo a aproximadamente 1 µg total de DNA, em um volume de 50 µl. Esse conjunto de fragmentos foi precipitado com 14 µl de 9 M NH₄OAc e um volume de etanol 100% à temperatura ambiente por 5 minutos. Seguiu-se uma centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuscitado em 16 µl de TE 1X. O “DIG DNA Labelling and Detection Kit” (Boehringer Mannheim) foi utilizado para a marcação da sonda e detecção dos fragmentos na membrana, seguindo as recomendações do fabricante, porém, a

temperatura de hibridação foi mais baixa (54 °C) devido ao fato da sonda ser heteroespecífica.

1.4. PCR

A técnica de PCR também foi utilizada em nossas análises. Essa técnica consiste da amplificação *in vitro* de regiões específicas do genoma utilizando-se “primers” (oligonucleotídeos) flanqueadores dessas regiões. Para a amplificação do genoma mitocondrial de *P. remota* foram utilizados “primers” conhecidos como universais para esse genoma extra nuclear (“UBC Insect Mitochondrial DNA Primers Kit”) (SIMON *et al.*, 1994) e outros derivados da seqüência do DNAm de *A. mellifera* (HALL E SMITH, 1991; ARIAS *et al.*, 1998; FRANCISCO *et al.*, 2001) e de *M. bicolor* (FRANCISCO *et al.*, 2001) (**Tabela 2**). A amplificação de fragmentos de DNA das amostras de *P. remota* foi utilizada para a posterior digestão com enzimas de restrição, permitindo a localização mais precisa dos sítios de clivagem e complementação dos resultados, quando os obtidos por “Southern blot” não foram passíveis de serem analisados.

O método de extração do DNA de *P. remota* para as reações de PCR foi o mesmo usado para a realização das digestões. Para a montagem da reação de PCR foram utilizados: 0,5 µl da extração como DNA molde; 2,5 µl de tampão de PCR; 0,75 µl de cada “primer” 20 µM; 2,5 µl de dNTPs 2 mM cada e 1 U de *Taq* DNA polimerase (Gibco-BRL), em um volume final de 25 µl. Cada reação de PCR foi submetida inicialmente a uma desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos (desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento por 1 minuto e alongação 64 °C por 3 minutos). Ao final desses ciclos, um passo extra de alongação a 64 °C por 10 minutos

foi efetuado. A temperatura de anelamento foi ajustada para cada par de “primers” utilizado (**Tabela 2**).

Os produtos da reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corados com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador de UV. Posteriormente os fragmentos amplificados foram digeridos com as mesmas enzimas da **Tabela 1** e analisados em gel 1,5% Nusieve (FMC) 3:1 agarose, corados e visualizados como descrito anteriormente.

Tabela 2: Pares de “primers” testados para a amplificação de fragmentos via PCR de algumas amostras de *Plebeia remota*, as temperaturas de anelamento (**Ta**) determinadas para cada um deles, principais genes contidos no fragmento, o tamanho aproximado (em pares de bases) do produto amplificado e suas respectivas referências.

Par de “primers”	Ta (°C)	Principais Genes	Tamanho Aproximado (pb)	Referências Bibliográficas
mtD2 + mtD9	42	ND2 e COI	2.300	(SIMON <i>et al.</i> , 1994)
mtD7 + mtD12	42	COI	1.400	(SIMON <i>et al.</i> , 1994)
mtD7 + COI-IIR	44	COI e COII	1.650	(SIMON <i>et al.</i> , 1994) + (HALL E SMITH, 1991)
COI-III F + mtD18	44	COI e COII	900	(HALL E SMITH, 1991) + (SIMON <i>et al.</i> , 1994)
mtD19 + mtD22	42	ATPases 8 e 6, COIII	1.700	(SIMON <i>et al.</i> , 1994)
5612R + tPheF	42	COIII e ND3	1.100	(FRANCISCO <i>et al.</i> , 2001)
mtD24 + mtD28	42	ND4, ND6 e cytB	2.350	(SIMON <i>et al.</i> , 1994)
mtD26 + mtD30	42	cytB e ND1	1.700	(SIMON <i>et al.</i> , 1994)
MEL3 + 16SF	43	ND1 e 16S	800	(FRANCISCO <i>et al.</i> , 2001) + (HALL E SMITH, 1991)
16SR + 16SF	42	16S	570	(HALL E SMITH, 1991)
16SR + mtD36	42	16S e 12S	1.900	(HALL E SMITH, 1991) + (SIMON <i>et al.</i> , 1994)

1.5. ANÁLISE DOS DADOS

Cada um dos diferentes padrões de restrição produzidos por uma mesma enzima foi designado por uma letra maiúscula. Como foram utilizadas 15 enzimas de restrição na análise, cada colméia foi identificada por um código de 15 letras maiúsculas que, juntas, correspondem ao haplótipo do DNAm da colméia. Por exemplo:

Colméia01 AABACBBABAAACBA

A partir da análise de ganho/perda de sítios de restrição entre os padrões gerados por cada enzima separadamente, o programa de computador GENERATE construiu uma matriz de ausência/presença de sítios. A partir dessa matriz, o programa DSE gerou uma matriz de distância genética entre os haplótipos (d), baseado nos cálculos de NEI E TAJIMA (1981) e NEI E MILLER (1990). Os erros padrão dessas estimativas foram computados de acordo com NEI E TAJIMA (1983) e NEI (1987), também pelo programa DSE.

O índice de diversidade haplotípica (h), que representa a probabilidade de que dois indivíduos retirados ao acaso de uma amostra possuam haplótipos distintos, foi estimado segundo NEI (1987). Os valores de diversidade nucleotídica dentro de cada população (p) e de divergência de seqüência de nucleotídeos entre todos os pares de populações (d) foram ambos estimados de acordo com NEI E TAJIMA (1981) e NEI (1987). O cálculo desses índices foi realizado pelo programa DA.

A heterogeneidade das freqüências haplotípicas entre as amostras foi testada através da simulação Monte Carlo, um procedimento de randomização desenvolvido por ROFF E BENTZEN (1989). Esses testes foram realizados pelo programa MONTE.

Todos os programas até agora citados fazem parte do pacote de programas do REAP (“Restriction Enzyme Analysis Package”) v4.0 (MCELROY *et al.*, 1992).

Um outro cálculo realizado para verificar diferença entre as populações baseado nas frequências haplotípicas foi o teste exato, em conjunto com o método da cadeia de Markov (RAYMOND E ROUSSET, 1995a; GOUDET *et al.*, 1996). O programa ARLEQUIN v2.000 (SCHNEIDER *et al.*, 2000) foi utilizado nessas análises.

O estudo da estrutura populacional empregando-se a análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER *et al.*, 1992) foi realizada com o auxílio do programa ARLEQUIN v2.000 (SCHNEIDER *et al.*, 2000). Essa análise serviu para gerar estimativas da variância genética em diferentes níveis hierárquicos (ou seja, de como a diversidade genética encontra-se distribuída dentro das populações e entre as populações) e o valor de estatística Φ_{ST} (análoga à estatística F_{ST} de WRIGHT, 1951), que é definido como a correlação entre haplótipos retirados ao acaso de uma população, em relação ao total de haplótipos da espécie (EXCOFFIER *et al.*, 1992). Esse programa calculou 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, 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 quatro populações estudadas com base nos valores de δ e de F_{ST} .

Em estatística, um resultado com probabilidade de ocorrência igual ou inferior a 5% é considerado como tendo pouca probabilidade de acontecer. Por causa disso, esse valor é geralmente fixado como o nível de significância (α), que é o risco, ou probabilidade, que o pesquisador corre em rejeitar uma hipótese verdadeira (BEIGUELMAN, 1996). Neste trabalho será considerado $\alpha = 0,05$ (ou 5%). Por isso, sempre que $P > 0,05$, a hipótese nula será aceita.

Consideremos um exemplo acerca do teste do qui-quadrado (χ^2), retirado do livro de BEIGUELMAN (1996). Um valor de $\chi^2 = 0,148$ a um grau de liberdade, corresponde à probabilidade de 0,70, isto é, 70% (de acordo com a tabela do χ^2). Isso significa que aceitamos que em 70% de experimentos similares esperamos valores de χ^2 superiores ou iguais a 0,148 ($P = 0,70$).

2. Microssatélites

2.1. TESTES INICIAIS

2.1.1. Extração de DNA

O DNA para as reações de PCR foi extraído do tronco de uma única operária de *P. remota* (proveniente de Cunha, SP) pelo método Chelex (adaptado de WALSH *et al.*, 1991). Para a extração, o tronco foi macerado levemente em 400 µl de Chelex 10%, incubado por 30 minutos a 56 °C e depois por 5 minutos a 100 °C. A solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 3 minutos, e guardada a -20 °C.

2.1.2. “Primers”

Uma única amostra foi utilizada para os testes com os 25 pares de “primers” de microssatélites disponíveis em nosso laboratório. As seqüências desses “primers” encontram-se descritas na literatura e foram obtidas a partir de bibliotecas genômicas das seguintes espécies: *A. mellifera* (três pares) (ESTOUP *et al.*, 1993), *B. terrestris* (um par) (ESTOUP *et al.*, 1993), *M. bicolor* (16 pares) (PETERS *et al.*, 1998) e *S. postica* (cinco pares) (PAXTON *et al.*, 1999a) (**Tabela 3**).

Tabela 3: Descrição dos locos de microsatélite e seqüência dos “primers” derivados de *Apis mellifera* (**A**), *Bombus terrestris* (**B**), *Melipona bicolor* (**Mbi**) e *Scaptotrigona postica* (**T**) testados em *Plebeia remota*. **Ta:** Temperatura de anelamento sugerida pelos autores e suas respectivas referências bibliográficas.

Loco	Ta (°C)	Repetição	“Primers” (5’®3’)	Referência
A14	58	(CT) ₁₃ ...(GGT) ₉	GTGTCGCAATCGACGTAACC GTCGATTACCGATCGTGACG	ESTOUP <i>et al.</i> , 1993
A28	54	(CCT) ₃ GCT(CCT) ₆ (CT) ₅ TT(CT) ₄	GCCGTTTCATGGTTACCACG GAAGAGCGTTGGTTGCAGG	ESTOUP <i>et al.</i> , 1993
A88	55	(CT) ₁₀ TC(CCT) ₂ (CTTT) ₃ ...(GGA) ₇	CGAATTAACCGATTTGTCG GATCGCAATTATTGAAGGAG	ESTOUP <i>et al.</i> , 1993
B124	55	(CT) ₈ TCCTCTTC... (CT) ₁₄ CCTC	GCAACAGGCGGGTTAGAG CAGGATAGGGTAGGTAAGAG	ESTOUP <i>et al.</i> , 1993
Mbi11CAC	55	(GC) ₃ ...(GGCT) ₈ (ACC) ₈ ATC(GCC) ₅	CGTTCGTTCTTCCCAAT GATCGAATTTAACCGGC	PETERS <i>et al.</i> , 1998
Mbi28AAG	57,5	(TCC) ₆ ACC(TCC) ₃	TTTTATCGCTCCTATCCTCC AATCCAACAGGACGGTGT	PETERS <i>et al.</i> , 1998
Mbi32GAG	57,5	(GGA) ₄ (GGAGAA) ₅	CTTTATCCGGTGCGTGCGAA GAAGGCATTCCGGGTTGTT	PETERS <i>et al.</i> , 1998
Mbi33AAG	60	TTC(TCC) ₂ TCTTCC (TCT) ₂ (TCC) ₃	ATCACCTAACTTGGCATCCC GATCAAGGGCCAAGAGGA	PETERS <i>et al.</i> , 1998
Mbi88AAAGA	57,5	(GAAA) ₂ GGAAG(AAAGA) ₄ (AAGGA) ₂ AAAGAAAC(GAG) ₂	GCCGCCGTACGTTTCTGA GCGCTCGAGCAGCGTT	PETERS <i>et al.</i> , 1998
Mbi201AAG	60	(CTT) ₁₀ CTC(CTT) ₅ CCT ₉ (CTT) ₂	GTTTAATCGCCCAAAGAGGC GTTGACGAGAAGGAGCACG	PETERS <i>et al.</i> , 1998
Mbi215AAG	57,5	(TTC) ₆	AGAGACGAAAAGTGGCGG GATAGCGGCGGAGAGATT	PETERS <i>et al.</i> , 1998
Mbi218AAG	60	(CTT) ₃ (TCT) ₇	CTCGACTTAATTTCCATCGGC GCAATTTCAATCGCGACC	PETERS <i>et al.</i> , 1998
Mbi232AAG	50	(CTT) ₁₃	TTTTTCTCTTAAATTTTCTTCT CTTACTCGACGACTTTATTT	PETERS <i>et al.</i> , 1998
Mbi233AAG	57,5	(GAA) ₁₅	ACGAGCACGGGCCATAA GATCCATCGACCGCTTCTT	PETERS <i>et al.</i> , 1998
Mbi254AAG	55	(AAG) ₁₁	CAATCGTTGGAAGGGAAC GGACCTATACCCAAGTCCAT	PETERS <i>et al.</i> , 1998
Mbi256AAG	57,5	(AGA) ₉	GGATTCAAGCAGACGATA GATCAAAGTCCCCATCTT	PETERS <i>et al.</i> , 1998

Tabela 3: continuação.

Loco	Ta (°C)	Repetição	“Primers” (5’®3’)	Referência
Mbi259AAG	57,5	(AGG)(AGA) ₅ (GGA) ₂ GAA(GGA) ₂	CGACGTTAACATTTTCGCTA CTGTTCGACTGTTCTCACTCT	PETERS <i>et al.</i> , 1998
Mbi278AAG	60	CTT(CTC) ₂ CTTCTCTG CTTCC	GTTTAATCGCCCAAAGAGGC GTTGCGAGAACTCTGACGAT	PETERS <i>et al.</i> , 1998
Mbi305CAT	60	(TCT) ₉ CCCTTCG(TCT) ₂ (CAT) ₃ (CAG)(CAT) ₂ (CCT) ₃	GATCCGCTGCGCGAGAC GGACGAGGCTTGAGGCATG	PETERS <i>et al.</i> , 1998
Mbi522CAG	60	(TCT)(CTT) ₂ (CCT)(CTC) (TGC) ₄ TGT(TGC) ₃	CCCTGGACAAATACAAACGTA GAACAATGCTCTTCTCCGAA	PETERS <i>et al.</i> , 1998
T1-35	55	(CT) ₁₅	CCGTTGAATAAAATTTGACGGTTCG GGGATCGCCGATAAATTCTAGC	PAXTON <i>et al.</i> , 1999a
T3-32	60	(CT) ₂₁	GCGGGAGGGAAAGTCCTCTCG CGTCTTCGTCAGGCGTGC	PAXTON <i>et al.</i> , 1999a
T4-171	55	(CT) ₁₉	GGTGCCGTCCGAGTCATTAGC TGAATCAGTGAAAAATGGGAACGC	PAXTON <i>et al.</i> , 1999a
T7-5	60	(CT) ₂₀	GAGAGAGTCGGAGAAGAGGGC TGGCGGAACCACTGGTTCG	PAXTON <i>et al.</i> , 1999a
T8-40	55	(CT) ₁₈	TCTCCCGCTGCTTCCCAT CCCGGGGATCCATTATATCGC	PAXTON <i>et al.</i> , 1999a

2.1.3. PCR

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; 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 (Gibco-BRL). Cada reação de PCR foi submetida inicialmente a uma desnaturação a 93 °C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos (desnaturação a 93 °C por 40 segundos, anelamento por 50 segundos e alongação a 72 °C por 40 segundos). Ao final desses ciclos, um passo extra de alongação a 72 °C

por 5 minutos foi efetuado. A temperatura de anelamento variou de acordo com o par de “primer” testado (**Tabela 3**).

2.1.4. Visualização

Os produtos foram analisados em géis de poliacrilamida 5,6% não desnaturantes.

Para a revelação, o método seguido foi:

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 μl 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.

2.1.5. Seleção de locos

Sete locos foram selecionados para serem utilizados nas análises populacionais. Os locos Mbi259AAG e Mbi278AAG foram escolhidos por serem os únicos que apresentaram dois alelos de tamanhos diferentes nos testes iniciais. Já os locos T3-32 e T7-5 foram selecionados por apresentarem repetições de apenas dois nucleotídeos. Os locos Mbi33AAG, Mbi215AAG e Mbi254AAG foram escolhidos ao acaso.

Para facilitar a leitura daqui para frente, os nomes dos locos utilizados serão abreviados como a seguir:

T7-5: T7
T3-32: T3
Mbi278AAG: M278
Mbi259AAG: M259
Mbi254AAG: M254
Mbi215AAG: M215
Mbi33AAG: M33

2.2. SEQÜENCIAMENTO

Para nos certificarmos de que estávamos realmente amplificando regiões de microsatélites, os sete locos utilizados neste trabalho foram seqüenciados. Para tanto, esses locos foram amplificados de um único indivíduo, mas num volume final de 50 µl. Os fragmentos resultantes da reação de PCR foram ligados em plasmídeos específicos para essa finalidade, utilizando-se o conjunto de reagentes pGEM-T Easy (Promega). Para se obter um DNA mais limpo e concentrado, 50 µl do produto de PCR foram precipitados com 10 µl de acetato de amônia 7,5 M e 100 µl de etanol absoluto, por 5 minutos, à temperatura ambiente. Essa precipitação foi seguida de uma centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 100 µl de etanol 70%, seguido de outra centrifugação idêntica à primeira. Finalmente, o precipitado foi secado a vácuo e ressuspenso em 10 µl de TE 1X, dos quais 3 µl foram submetidos à eletroforese em gel de agarose-1000 (Gibco-BRL) 2% e corados com brometo de etídeo para quantificação visual antes da montagem das ligações, as quais foram realizadas seguindo-se as recomendações do fabricante.

Células competentes de *Escherichia coli* foram preparadas de acordo com o método descrito por SAMBROOK *et al.* (1989) e transformadas com os plasmídeos

recombinantes de acordo com o seguinte protocolo: 100 µl de células foram incubadas com 30 ng de plasmídeo recombinante por 15 minutos no gelo, em seguida a 37 °C por 5 minutos e por mais 15 minutos no gelo. À temperatura ambiente, 250 µl de meio LB foram acrescentados, seguindo-se uma incubação a 37 °C sob agitação por uma hora. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB-ágar com ampicilina e X-Gal e incubadas pela noite a 37 °C. Colônias brancas (as quais contêm plasmídeos recombinantes) foram inoculadas em meio LB e incubadas pela noite a 37 °C sob agitação.

Os plasmídeos recombinantes foram extraídos por meio de minipreps. As amostras foram extraídas pelo método descrito no manual “Automated DNA Sequencing Chemistry Guide” da “Perkin Elmer Corporation”, o qual pode ser encontrado no “site” da empresa (<http://www.appliedbiosystems.com>).

Para verificar se realmente havia o inserto de tamanho esperado, uma alíquota de 20% de cada miniprep foi digerida com 10 U de *Eco*R I. Essa enzima possui dois sítios de restrição que flanqueiam o inserto, de modo que, quando ocorre a digestão, este é isolado do plasmídeo. Ao final de uma hora, as digestões foram interrompidas e submetidas à eletroforese em gel de agarose-1000 (Gibco-BRL) 2%. Os géis foram corados com brometo de etídeo e os fragmentos visualizados através de luz UV. Os clones foram considerados positivos quando o inserto excisado do plasmídeo apresentava um tamanho compatível com o produto de PCR correspondente.

Aproximadamente 400 ng de cada clone positivo foram seqüenciados utilizando-se 2 µl do conjunto de reagentes “Big Dye Terminator” (Applied Biosystem). “Primers”

universais (M13forward e M13reverse), complementares a regiões do plasmídeo, foram utilizados nas reações à concentração final de 3,2 pM. Os outros passos foram seguidos de acordo com as recomendações do fabricante.

As amostras foram analisadas em seqüenciador automático ABI-PRISMA 310 (Perkin Elmer), do Departamento de Biologia do IB/USP. Para cada loco, foi seqüenciada uma fita do DNA proveniente de um clone. Para a análise das seqüências obtidas utilizou-se o programa GENERUNNER v3.00 (Hastings Software).

2.3. ANÁLISE POPULACIONAL

A análise populacional de *P. remota* envolveu um total de 360 indivíduos de 72 colméias, sendo 18 de SP, 35 de PRp, sete de PRc e 12 de SC.

2.3.1. Extração de DNA

Cinco indivíduos de cada colméia amostrada foram analisados individualmente. O DNA para as reações de PCR foi extraído do tronco de cada operária pelo método Chelex (adaptado de WALSH *et al.*, 1991).

2.3.2. PCR e visualização

As reações de PCR foram realizadas conforme o item 2.1.3. e seus produtos foram visualizados de acordo com o item 2.1.4., sendo que os produtos das reações de PCR com os pares de “primers” dos locos T3 e T7 foram analisados em géis de poliacrilamida 9%.

2.3.3. Análise dos dados

Foi realizada uma pré-análise comparando somente as amostras de Cunha e Prudentópolis coletadas em seu local de origem com aquelas transportadas e mantidas por vários anos no Laboratório de Abelhas do Departamento de Ecologia do IB/USP. Tal cuidado foi tomado pois poderia estar ocorrendo uma homogeneização do genoma nuclear das abelhas dessas colméias, por cruzamento direto entre elas e/ou cruzamento com as abelhas nativas da cidade São Paulo. As amostras foram divididas em quatro sub-populações:

- **C**: colméias originárias de Cunha e mantidas por poucos meses em São Paulo;
- **C-sp**: colméias originárias de Cunha e mantidas por vários anos em São Paulo;
- **P-sp**: colméias originárias de Prudentópolis e mantidas por vários anos em São Paulo;
- **P**: colméias originárias de Prudentópolis.

A realização dessa pré-análise, e a posterior análise total das amostras de *P. remota* foram divididas em duas partes:

1. Estrutura populacional através da análise de cinco indivíduos de cada colméia:

- Vantagem: grande número amostral;
- Desvantagem: aumento do número de indivíduos relacionados na população (relações de parentesco).

2. Estrutura populacional através da análise de um indivíduo de cada colméia escolhido aleatoriamente:

- Vantagem: diminuição das relações de parentesco entre os indivíduos;
- Desvantagem: pequeno número amostral.

Frequências alélicas, taxa de heterozigose observada (H_O), taxa de heterozigose esperada de acordo com equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_E) e taxa de heterozigose não-tendenciosa de NEI (1978) (H_N) foram calculadas para cada loco e população pelo programa BIOSYS-2 (SWOFFORD E SELANDER, 1997). A taxa não-tendenciosa é ideal para populações com poucos indivíduos amostrados (NEI, 1978).

A diversidade genética dentro de cada população foi medida através do número médio de alelos por loco (A), porcentagem de locos polimórficos com 95 e 99% de critério, taxa de heterozigose observada, taxa de heterozigose esperada para as proporções de Hardy-Weinberg e taxa de heterozigose não-tendenciosa segundo NEI (1978). Todos esses cálculos foram realizados pelo programa BIOSYS-2. Para um loco ser considerado polimórfico, a frequência do alelo mais comum tem que ser igual ou menor a uma porcentagem arbitrariamente escolhida (NEI, 1987). Neste trabalho, optou-se pelos valores 95 e 99%.

O programa GENEPOP v3.3 (RAYMOND E ROUSSET, 1995b) foi utilizado para a realização dos cálculos de equilíbrio de Hardy-Weinberg, desequilíbrio genotípico e diferenciação populacional (alélica e genotípica).

O ‘teste exato de Hardy-Weinberg’ de HALDANE (1954) foi utilizado para verificar se as populações e locos estavam em equilíbrio. Em casos em que o desvio do equilíbrio foi detectado, realizou-se o ‘teste U’ de ROUSSET E RAYMOND (1995) para verificar excesso ou deficiência de heterozigotos. O algoritmo usado nesses cálculos foi o método da cadeia de Markov (10.000 “dememorizations”, 1.000 “batches” e 10.000 “iterations per batch”), que estima o valor exato de P desses testes (GUO E THOMPSON, 1992). O método da cadeia de Markov é um caminho para gerar uma distribuição de

probabilidade exata sob a hipótese nula, que não é afetada por alelos raros ou pequeno tamanho amostral (RAYMOND E ROUSSET, 1995a).

Com relação ao desequilíbrio de ligação, tabelas de contingência foram criadas para todos os pares de locos em cada população. Depois, foi realizado o teste exato de Fisher para cada par de locos entre todas populações, usando a cadeia de Markov (10.000 “dememorizations”, 1.000 “batches” e 10.000 “iterations per batch”).

Testes de diferenciação genotípica também foram realizados sobre tabelas de contingência. Uma estimativa não-tendenciosa do valor de P de uma probabilidade logarítmica (G) foi realizada (‘teste exato baseado em G’). O princípio desse teste é o mesmo do teste exato de Fisher. Então, uma estimativa não-tendenciosa do valor de P foi realizada usando o método da cadeia de Markov (10.000 “dememorizations”, 1.000 “batches” e 10.000 “iterations per batch”). Os resultados de todos os testes foram combinados (‘teste exato de Fisher’), e valores de P foram estimados para cada loco (independência entre os locos é necessária para se combinar o resultado de todos os testes), e para cada par de populações.

Testes para diferenciação alélica foram concentrados na distribuição de alelos nas amostras. Para cada loco, um teste em uma tabela de contingência e uma estimativa não-tendenciosa do valor de P do ‘teste exato de Fisher’ foram realizados, como descrito por ROUSSET E RAYMOND (1995).

Segundo WEIR (1996) o ‘teste exato de Fisher’ usado em conjunto com a cadeia de Markov, é muito eficiente nos cálculos de diferenciação de populações. De acordo com RAYMOND E ROUSSET (1995a) testes exatos (tanto χ^2 como teste de probabilidade)

para diferenciação entre populações têm várias vantagens sobre outros métodos, como por exemplo:

1. São acurados e imparciais, mesmo para pequenas amostras ou alelos raros;
2. Fornecem resultados para cada loco, que permite a possibilidade de detectar, por exemplo, locos não neutros;
3. São independentes do nível de ploidia, embora cruzamento aleatório seja requerido para diplóides ou poliplóides.

Para estimar as distâncias genéticas entre cada par de populações, foi utilizada a distância “chord” de CAVALLI-SFORZA E EDWARDS (1967). As distâncias foram calculadas pelo programa BIOSYS-2 (SWOFFORD E SELANDER, 1997). Segundo um estudo de simulação realizado por TAKEZAKI E NEI (1996), essa é uma das melhores estimativas de distância para se obter uma correta topologia de reconstrução filogenética, independente inclusive, do modelo de mutação assumido. Essas distâncias serviram para a construção de um fenograma pelo método de Evolução Mínima (RZHETSKY E NEI, 1992), relacionando as quatro populações de *P. remota* estudadas.

IV. Resultados e Discussão



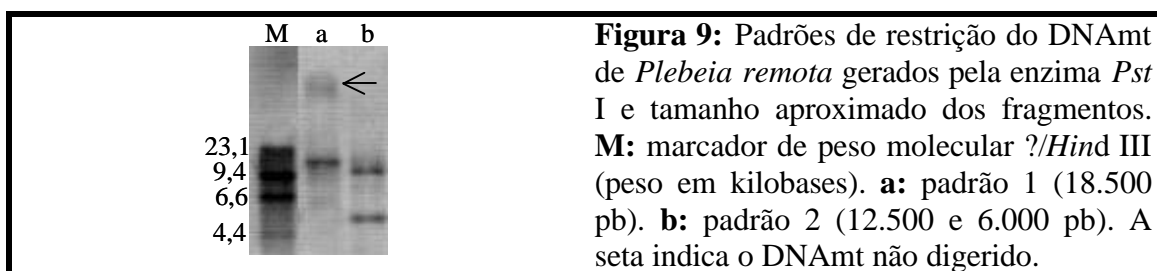
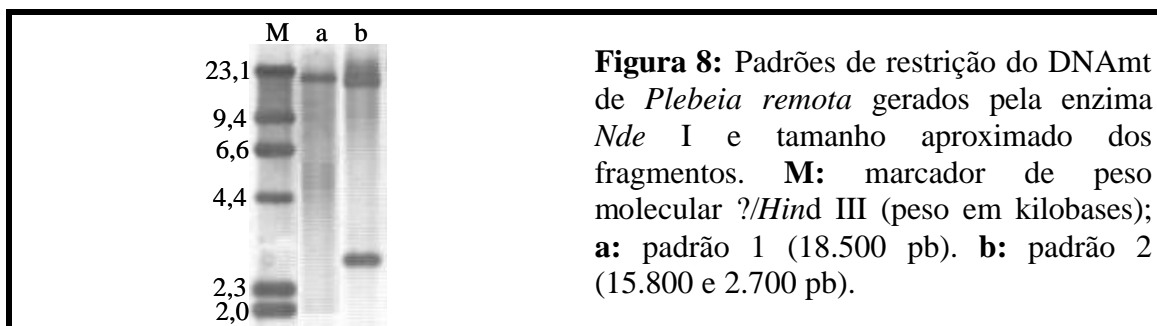
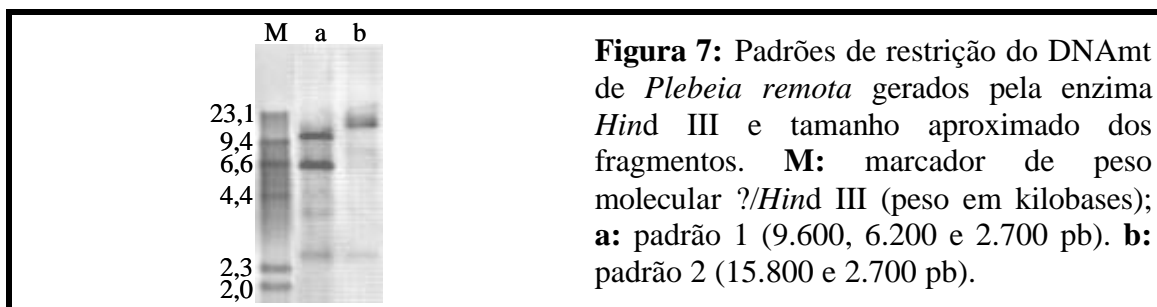
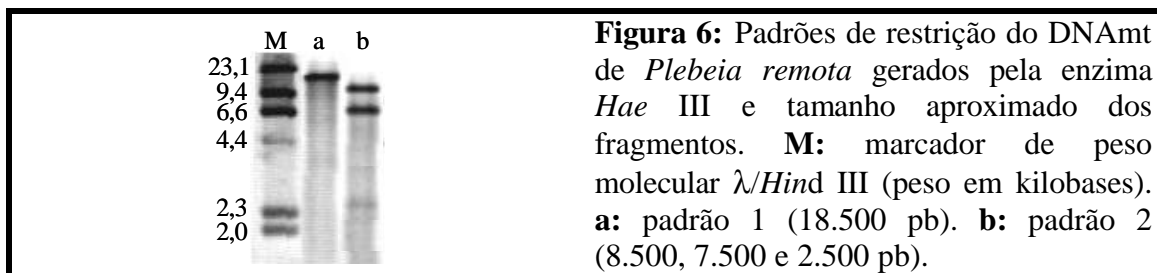
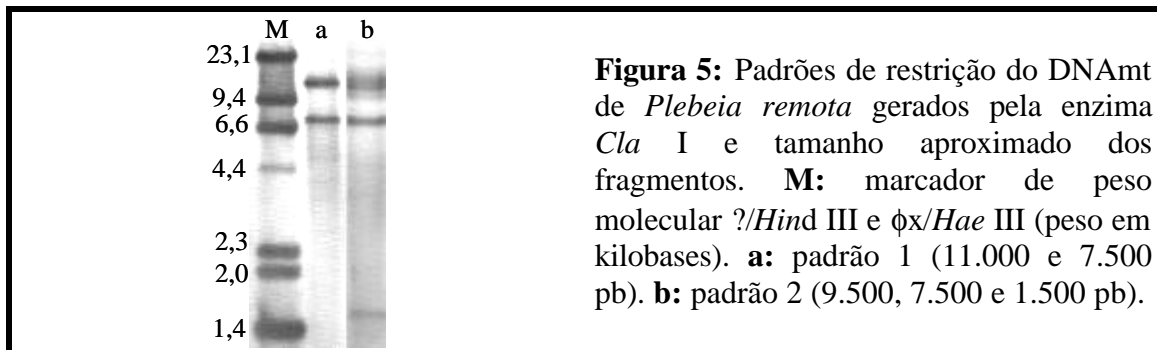
1. RFLP do DNAm

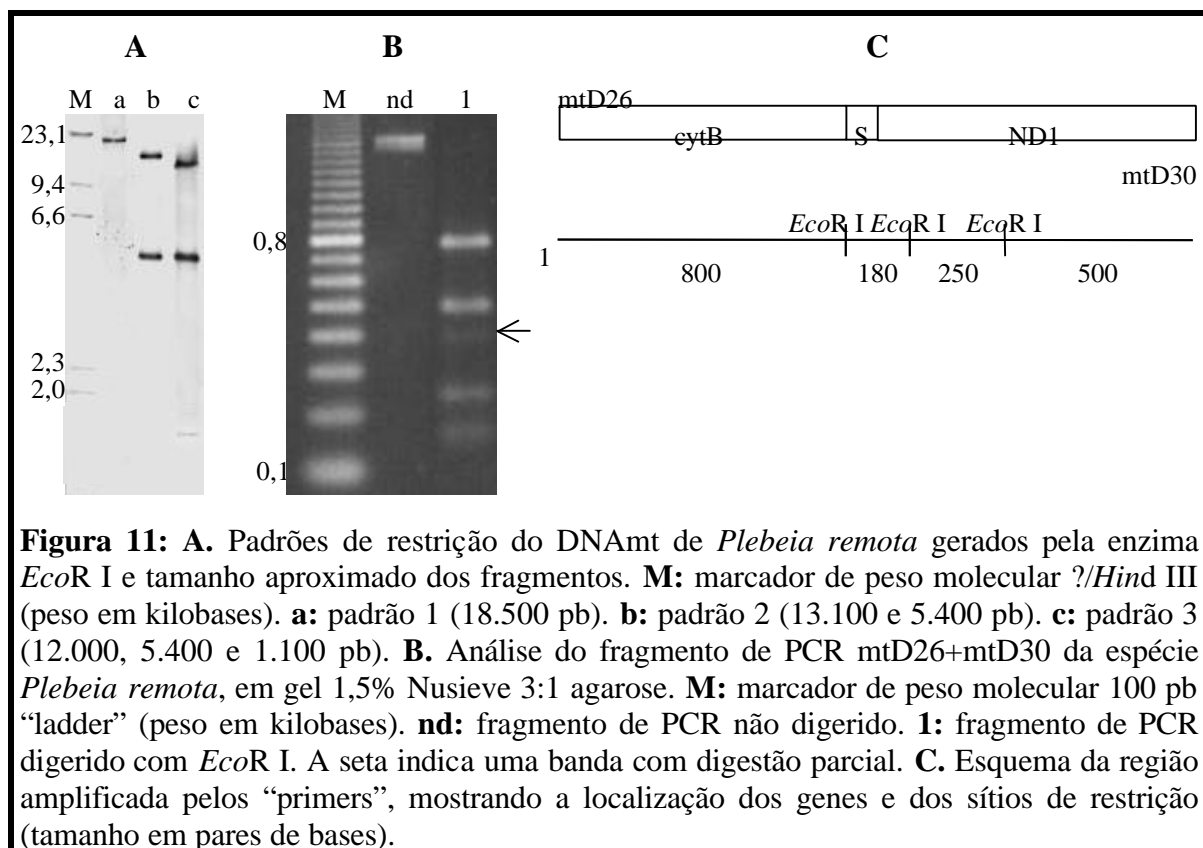
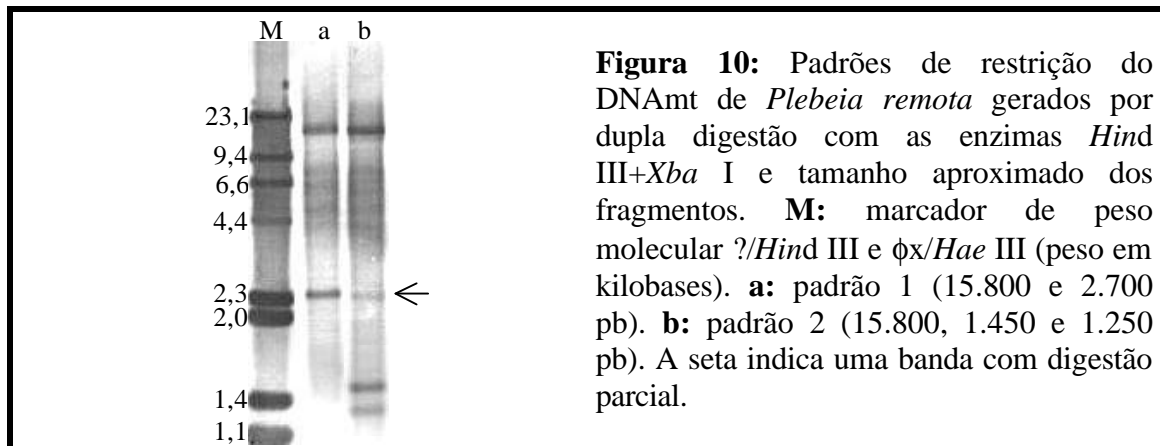
Das 15 enzimas utilizadas, apenas duas (*Cfo* I e *Pvu* II) não cortaram o DNAm de nenhuma das amostras. Essas duas enzimas também não clivam o DNAm de outras quatro espécies de *Plebeia* (FRANCISCO *et al.*, 2001). Todas as enzimas que clivaram o DNAm de *P. remota* apresentaram dois ou três padrões de restrição distintos. No trabalho de INFANTE E AZEREDO-ESPIN (1995), apenas 27% das enzimas utilizadas geraram sítios polimórficos nas quatro populações estudadas de *Cochliomyia hominivorax*.

Foram encontrados no total, 27 sítios de restrição nas amostras de *P. remota*. As mesmas 15 enzimas geram 31 sítios de restrição em *Apis mellifera ligustica* (CROZIER E CROZIER, 1993) e 28 em quatro outras espécies do gênero *Plebeia* (FRANCISCO *et al.*, 2001).

Dos 27 sítios de restrição encontrados em *P. remota*, 24 são de enzimas que reconhecem sítios de seis pares de bases e três de enzimas que reconhecem sítios de quatro pares de bases. Isso corresponde a 156 pb analisados, ou aproximadamente a 0,84% do genoma mitocondrial, cujo tamanho total foi estimado em cerca de 18.500 pb em todas amostras. Tal tamanho é concordante com o estimado em outros animais (BROWN, 1985) e meliponíneos (FRANCISCO *et al.*, 2001; WEINLICH *et al.*, 1999).

Os padrões de restrição gerados pelas 13 enzimas, detectados diretamente por “Southern blot”, ou por PCR+RFLP, estão apresentados nas **Figuras 5 a 17**. Três exemplos, descritos a seguir, ilustram a importância do PCR+RFLP e da dupla digestão para o detalhamento dos resultados.





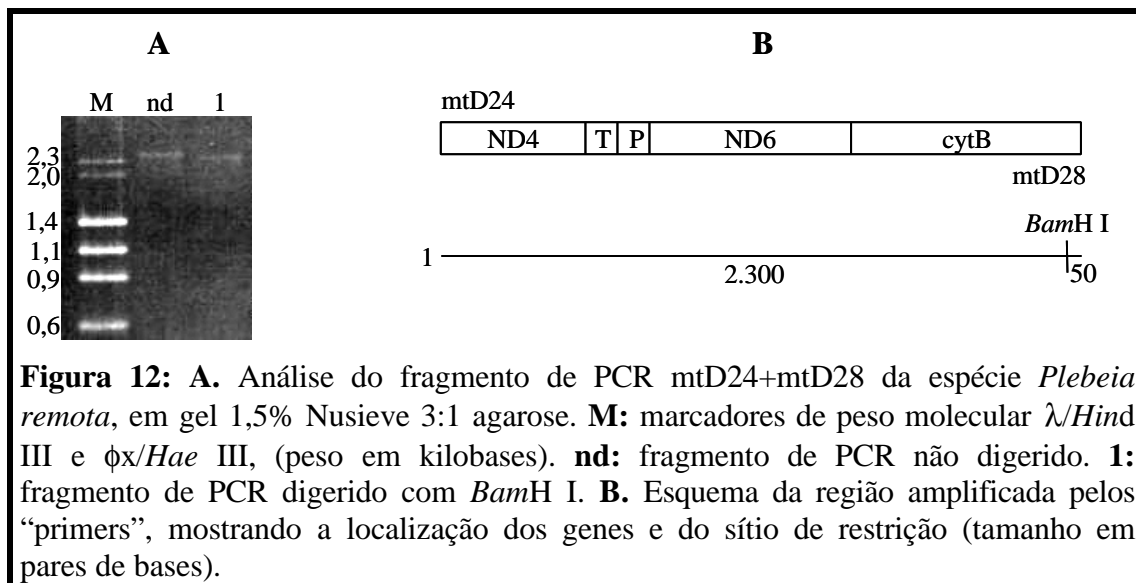


Figura 12: **A.** Análise do fragmento de PCR mtD24+mtD28 da espécie *Plebeia remota*, em gel 1,5% Nusieve 3:1 agarose. **M:** marcadores de peso molecular λ /*Hind* III e ϕ x/*Hae* III, (peso em kilobases). **nd:** fragmento de PCR não digerido. **1:** fragmento de PCR digerido com *Bam*H I. **B.** Esquema da região amplificada pelos “primers”, mostrando a localização dos genes e do sítio de restrição (tamanho em pares de bases).

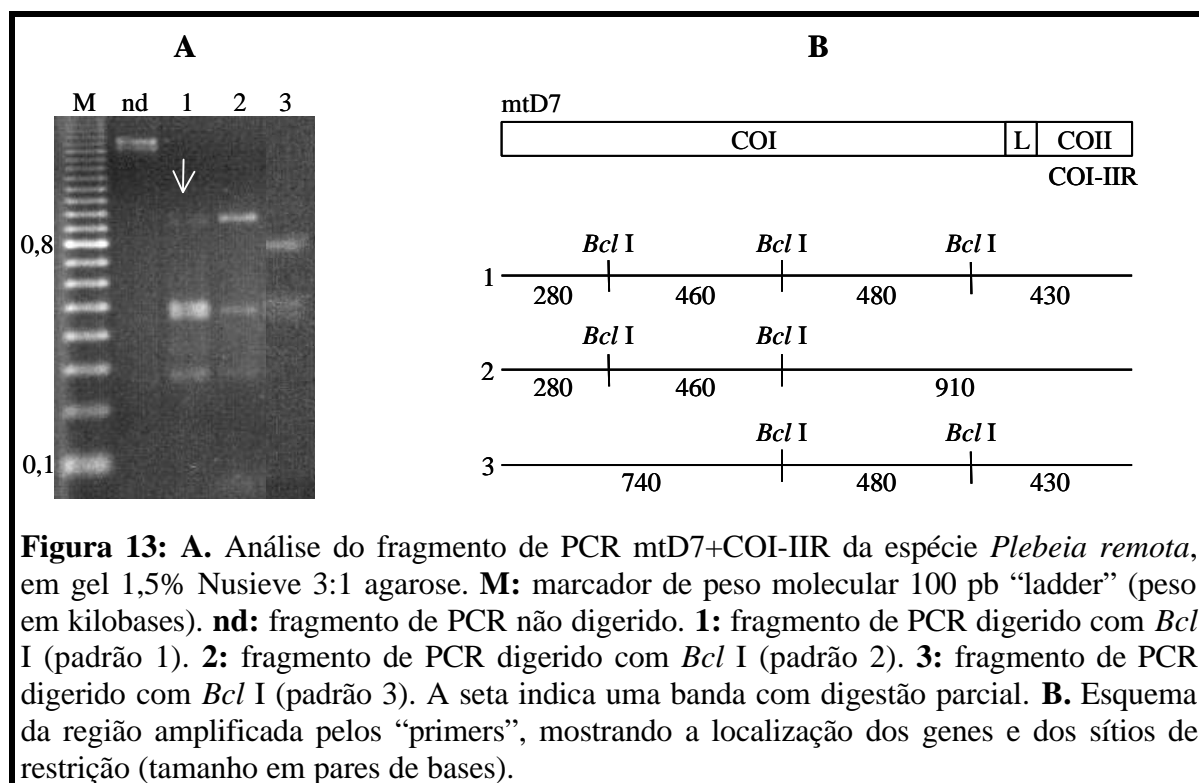
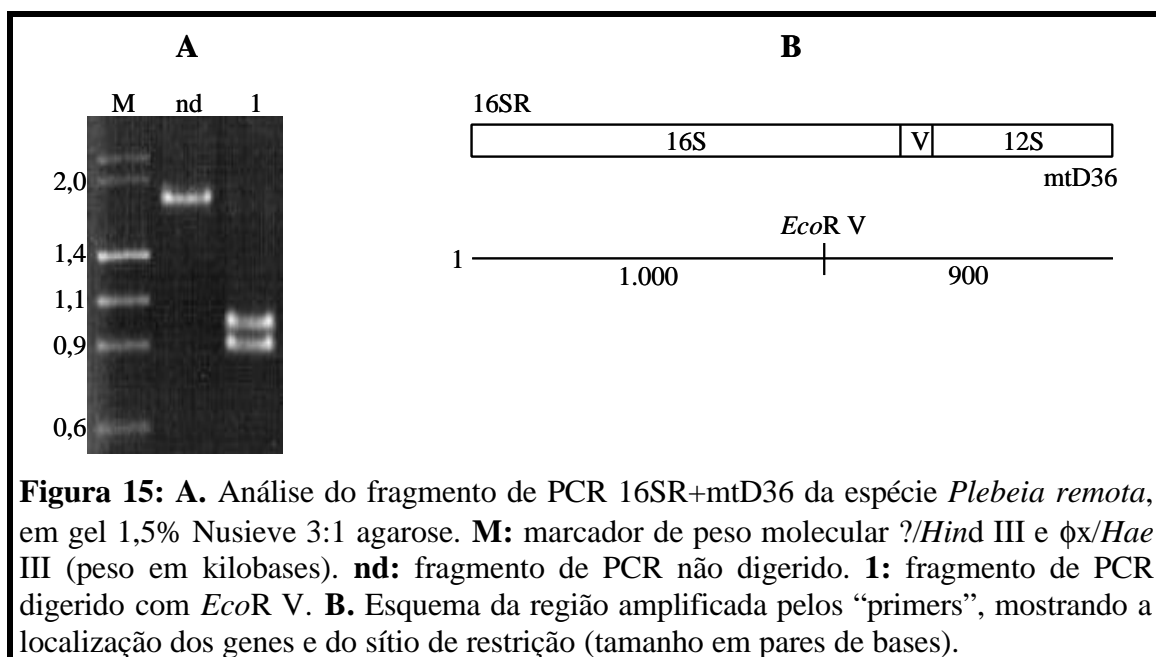
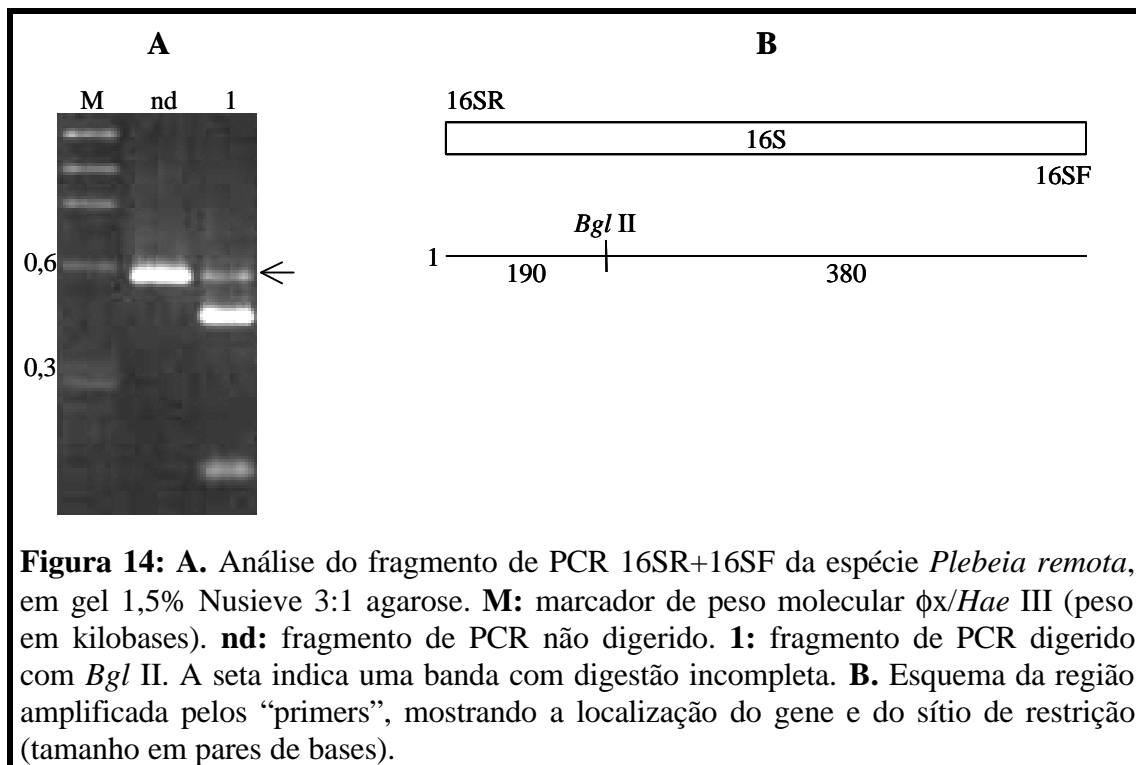
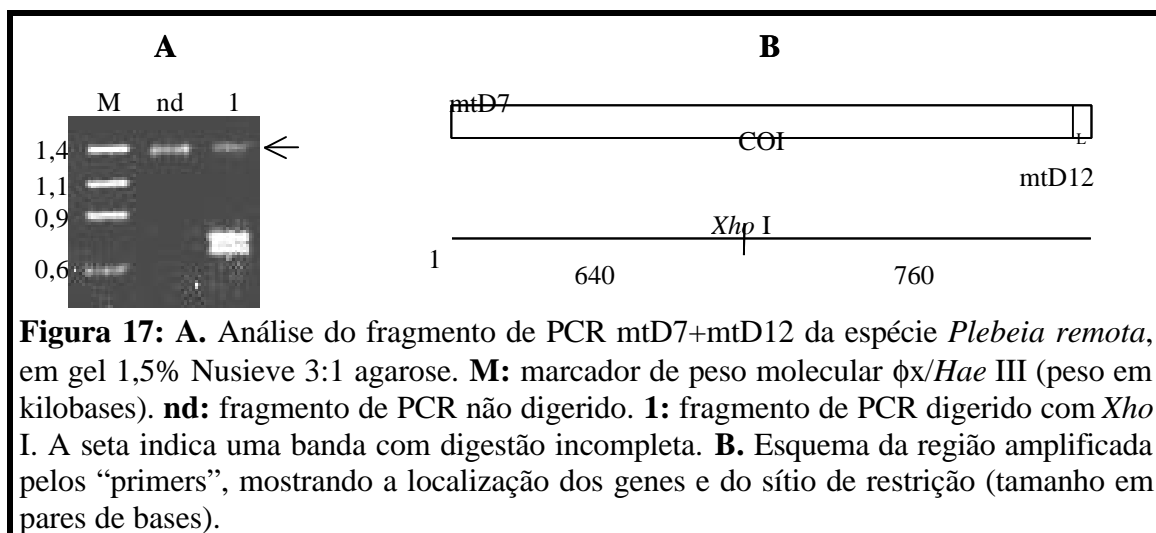
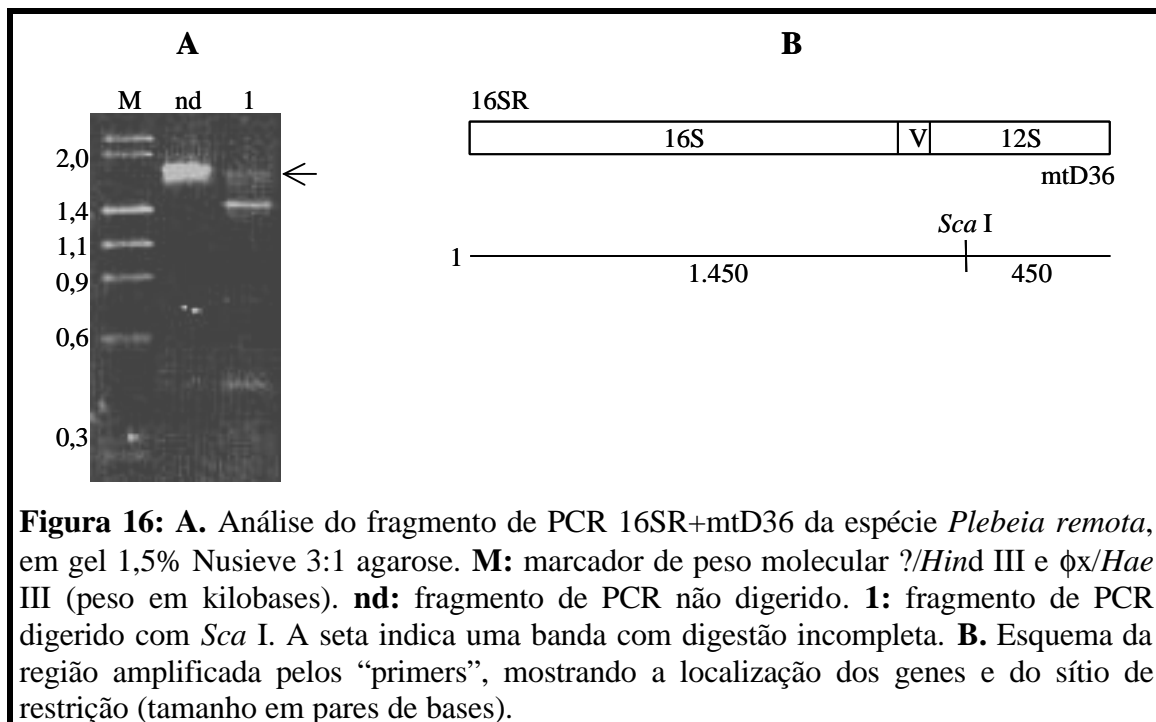


Figura 13: **A.** Análise do fragmento de PCR mtD7+COI-IIR da espécie *Plebeia remota*, em gel 1,5% Nusieve 3:1 agarose. **M:** marcador de peso molecular 100 pb “ladder” (peso em kilobases). **nd:** fragmento de PCR não digerido. **1:** fragmento de PCR digerido com *Bcl* I (padrão 1). **2:** fragmento de PCR digerido com *Bcl* I (padrão 2). **3:** fragmento de PCR digerido com *Bcl* I (padrão 3). A seta indica uma banda com digestão parcial. **B.** Esquema da região amplificada pelos “primers”, mostrando a localização dos genes e dos sítios de restrição (tamanho em pares de bases).





A enzima *Xba* I possui um único sítio de restrição em uma região não amplificada via PCR e, por isso, a localização desse sítio só foi possível através da dupla digestão com a enzima *Hind* III (**Figura 10**).

A enzima que mais apresentou sítios de restrição foi a *EcoR* I, num total de cinco. Três destes só foram detectados por PCR+RFLP em um fragmento amplificado pelos “primers” mtD26+mtD30, cujo produto tem cerca de 1.700 pb. Quando digerido com *EcoR* I, quatro fragmentos foram gerados, com 800, 500, 250 e 180 pb. A **Figura 11**, além da membrana de “Southern blot”, mostra um gel Nusieve 3:1 agarose com a digestão de um fragmento de PCR e a localização dos três sítios muito próximos. Um esquema mostra em detalhe a posição desses sítios e os genes contidos no fragmento de PCR amplificado.

O DNAm de *P. remota*, quando digerido com *Bcl* I apresentou uma banda de cerca 16.000 pares de bases e algumas bandas pequenas, cujos tamanhos não puderam ser estimados. De acordo com os mapas de restrição determinados para *Plebeia* (FRANCISCO *et al.*, 2001), existem quatro sítios *Bcl* I próximos uns dos outros. Para verificar a existência desses sítios nas nossas amostras, decidiu-se amplificar via PCR as regiões que possuem esses sítios: mtD2+mtD9 (dois sítios) e mtD7+COI-IIR (três sítios, sendo que um deles é o mesmo presente na região amplificada pelos “primers” mtD2+mtD9). Infelizmente o primeiro par de “primers” não amplificou nenhum produto na grande maioria das amostras analisadas. Portanto, a localização dos sítios *Bcl* I ficou restrita a uma região de aproximadamente 1.650 pb, amplificada pelo par mtD7+COI-IIR. Com a digestão desse fragmento em todas as amostras, observaram-se três sítios de restrição em três padrões distintos (**Figura 13**).

No total, foram analisadas amostras de 70 colméias, pertencentes a quatro populações, e foram detectados 15 haplótipos distintos. O número de sítios de restrição gerados por enzima em cada haplótipo é apresentado na **Tabela 4**. O número total de sítios de restrição por haplótipo variou de 13 (h13) a 22 (h08).

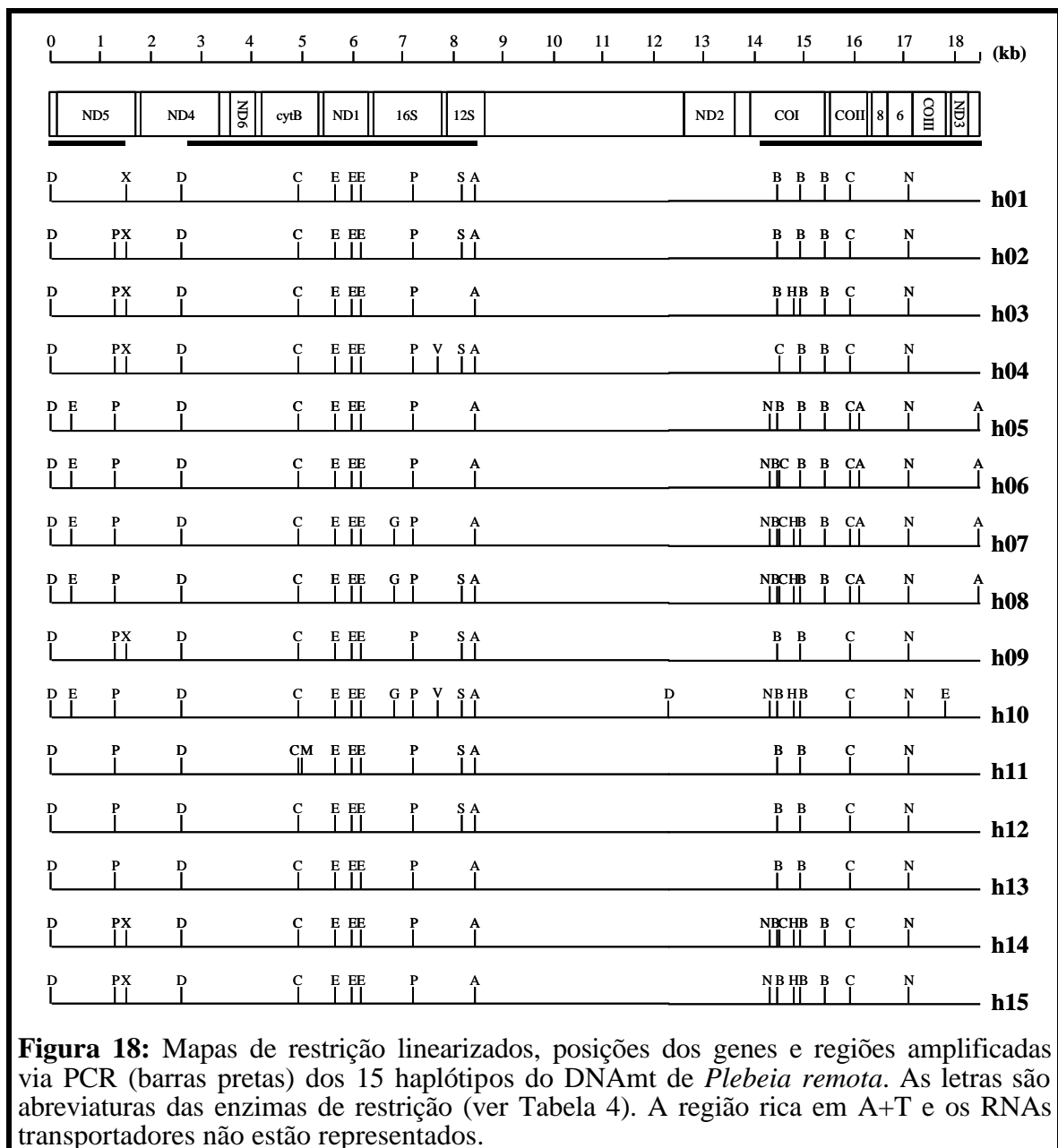
Tabela 4: Número de sítios de restrição gerados por enzima em cada um dos haplótipos detectados nas amostras de *Plebeia remota*.

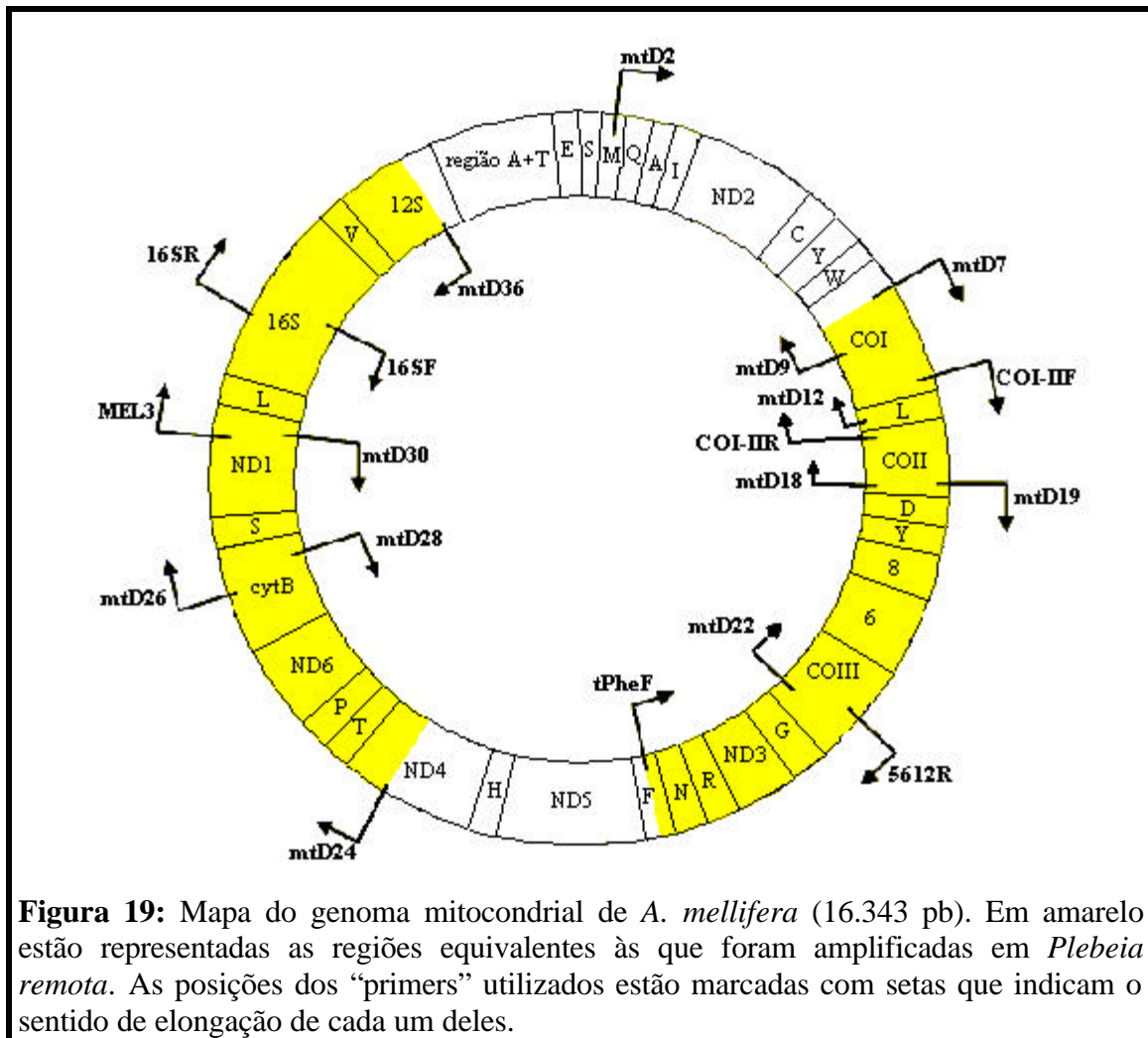
	h01	h02	h03	h04	h05	h06	h07	h08	h09	h10	h11	h12	h13	h14	h15
<i>Bam</i>H I (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Bcl</i> I (B)	3	3	3	2	3	3	3	3	2	2	2	2	2	3	3
<i>Bgl</i> II (G)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
<i>Cfo</i> I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cla</i> I (C)	2	2	2	3	2	3	3	3	2	2	2	2	2	3	2
<i>Eco</i>R I (E)	3	3	3	3	4	4	4	4	3	5	3	3	3	3	3
<i>Eco</i>R V (V)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Hae</i> III (A)	1	1	1	1	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1
<i>Hind</i> III (D)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2
<i>Nde</i> I (N)	1	1	1	1	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2	2
<i>Pst</i> I (P)	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>Pvu</i> II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sca</i> I (S)	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
<i>Xba</i> I (X)	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
<i>Xho</i> I (H)	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1
TOTAL	15	16	16	17	18	19	21	22	15	21	15	14	13	18	17

As letras entre parêntesis são as abreviações usadas para cada enzima.

Usando duplas digestões e a técnica de “Southern blot”, foi possível construir mapas de restrição para cada haplótipo detectado. Ainda para a construção desses mapas e numa tentativa de melhor posicionar os sítios de restrição, “primers” desenhados para o genoma mitocondrial de *A. mellifera* e para o de outros organismos foram combinados de diversas maneiras, amplificando via PCR, pelo menos oito fragmentos do genoma mitocondrial de *P. remota*. Os fragmentos de PCR foram digeridos com enzimas de restrição para o refinamento dos mapas e para a construção de um mapa genômico

parcial, indicando a posição dos principais genes (**Figura 18**). Utilizando como modelo a seqüência do DNAm de *A. mellifera* para o posicionamento dos “primers” (**Figura 19**) e respectivos fragmentos amplificados, verificou-se que aproximadamente 10.650 pb foram amplificados, equivalentes a cerca de 58% do genoma mitocondrial de *P. remota*. FRANCISCO *et al.* (2001) conseguiram amplificar 13.700 pb (75%) do DNAm de cinco espécies de *Plebeia*.

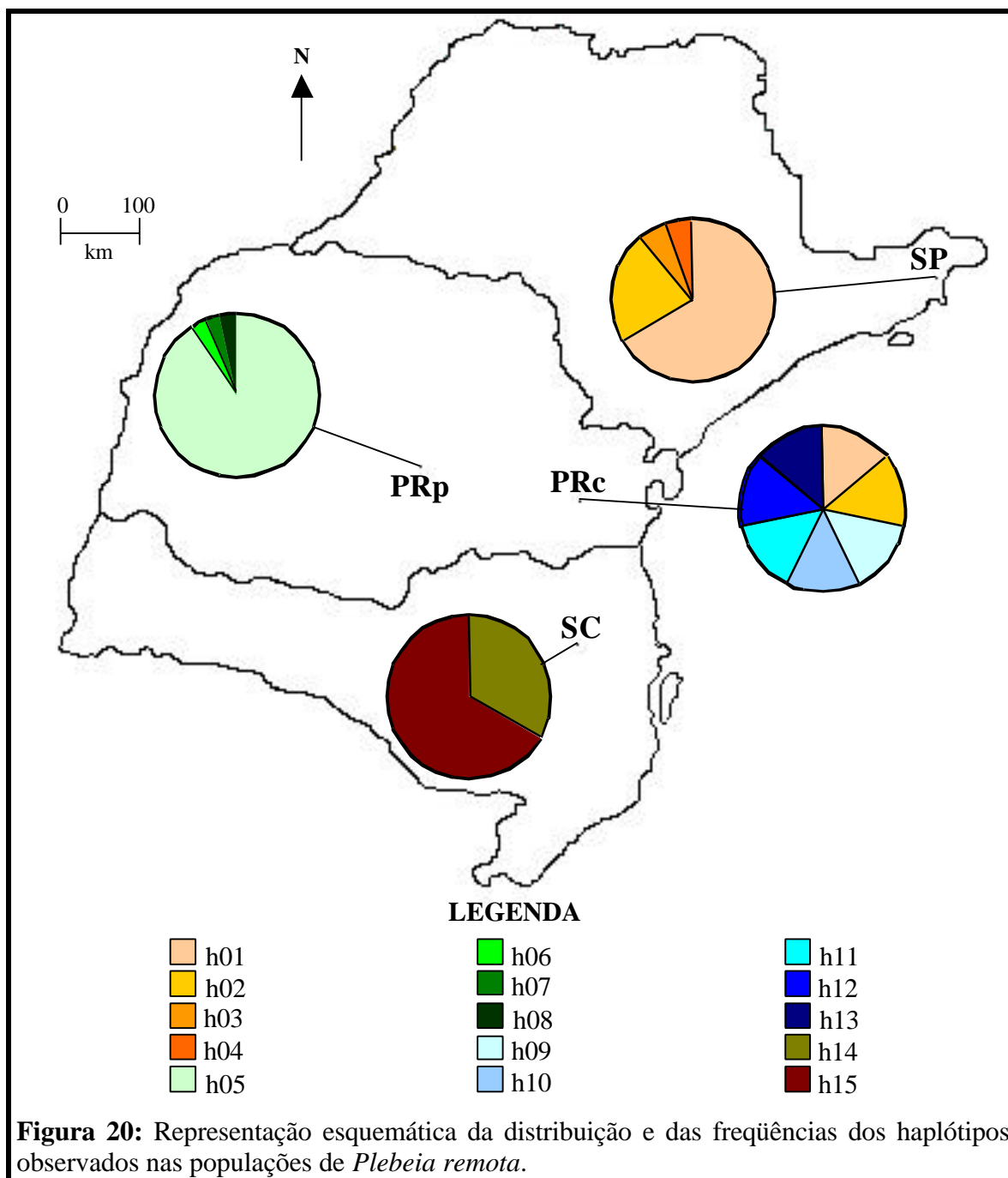




Dos 15 haplótipos detectados, dois são compartilhados pelas populações de SP e PRc. Os outros 13 estão distribuídos da seguinte maneira: dois haplótipos em SP, quatro em PRp, cinco em PRc e dois em SC (**Tabela 5**). A distribuição e frequência dos haplótipos também podem ser vistas na **Figura 20**.

Tabela 5: Distribuição do número de colméias por haplótipos e localidade: SP, PRp, PRc e SC.

Haplótipos	SP	PRp	PRc	SC
h01	12	-	1	-
h02	4	-	1	-
h03	1	-	-	-
h04	1	-	-	-
h05	-	30	-	-
h06	-	1	-	-
h07	-	1	-	-
h08	-	1	-	-
h09	-	-	1	-
h10	-	-	1	-
h11	-	-	1	-
h12	-	-	1	-
h13	-	-	1	-
h14	-	-	-	4
h15	-	-	-	8
TOTAL	18	33	7	12



Do total de 27 sítios de restrição mapeados, 11 estão presentes em todos os 15 haplótipos encontrados, sendo que oito deles também foram detectados no DNAm de *Plebeia droryana*, *P. emerina*, *P. saiqui* e *P. sp.* (FRANCISCO *et al.*, 2001). Tais sítios são: o D no gene ND4; o C no cytB; os três E do ND1; o P do 16S; o A do 12S e o

segundo B do COI. Esses sítios são um indicativo de regiões mais conservadas do genoma mitocondrial entre as cinco espécies de *Plebeia*. Com relação aos outros 16 sítios de restrição, que se mostraram facultativos entre as amostras de *P. remota*, apenas três não foram encontrados em nenhuma das outras quatro espécies de *Plebeia* estudadas por FRANCISCO *et al.* (2001). São eles, o sítio N do gene COI; o A do COII; e o A da região após o ND3 (ver **Figura 18**).

A grande maioria dos sítios de restrição encontrados está localizada em regiões do DNAm que puderam ser amplificadas com sucesso, portanto, os dados obtidos por “Southern blot” puderam ser re-analisados por PCR+RFLP. A única exceção foi o sítio D do haplótipo h10, que está localizado em uma grande região não amplificada, a qual compreende a região rica em A+T, parte do gene 12S, o gene ND2, e alguns genes para RNAt. No entanto, o posicionamento desse sítio, verificado por “Southern blot”, é reforçado pelo fato de *A. mellifera* também possuir um sítio *Hind* III (D) nessa região, mais precisamente no gene para o RNAt da metionina.

Em geral, o número de sítios de restrição diferentes entre os haplótipos de uma mesma população é menor quando comparado com os haplótipos das outras populações (**Tabela 6**). Dentro das amostras de SP, esse número varia de um a cinco sítios. Os haplótipos de PRp diferem de um a quatro sítios e o menor número refere-se aos haplótipos das amostras de SC, que diferem em apenas um sítio de restrição. Entretanto, tal observação não se aplica às amostras de PRc, visto que a diferença de sítios entre os haplótipos dessa região pode variar de um a 10. Comparando-se o número de sítios distintos entre as amostras de regiões diferentes, observou-se uma variação de seis a 10

entre SP e PRp, zero a 10 entre SP e PRc, um a seis entre SP e SC, cinco a 10 entre PRp e PRc, cinco a sete entre PRp e SC e finalmente, três a nove entre PRc e SC.

A **Tabela 6** mostra os valores de divergência de seqüência de nucleotídeos (d), estimados com base na matriz intraespecífica de ausência/presença de sítios de restrição. Os valores variam de 0,41 ($\pm 0,46$) a 4,60% ($\pm 1,93$) entre os haplótipos da mesma população, e de 0,52 ($\pm 0,56$) a 5,76% ($\pm 1,92$) entre haplótipos de populações diferentes. No trabalho de SIHANUNTAVONG *et al.* (1999) sobre estrutura de populações de *A. cerana*, os valores de d entre pares de haplótipos variaram de 0,37 a 4,79%; e quando essa espécie foi comparada com *A. mellifera*, os valores foram maiores, variando de 6,76 a 10,48%. Os valores de d intraespecíficos de *A. cerana* foram, portanto, muito parecidos com os obtidos para *P. remota* ($0,41 \pm 0,46$ a $5,76 \pm 1,92$).

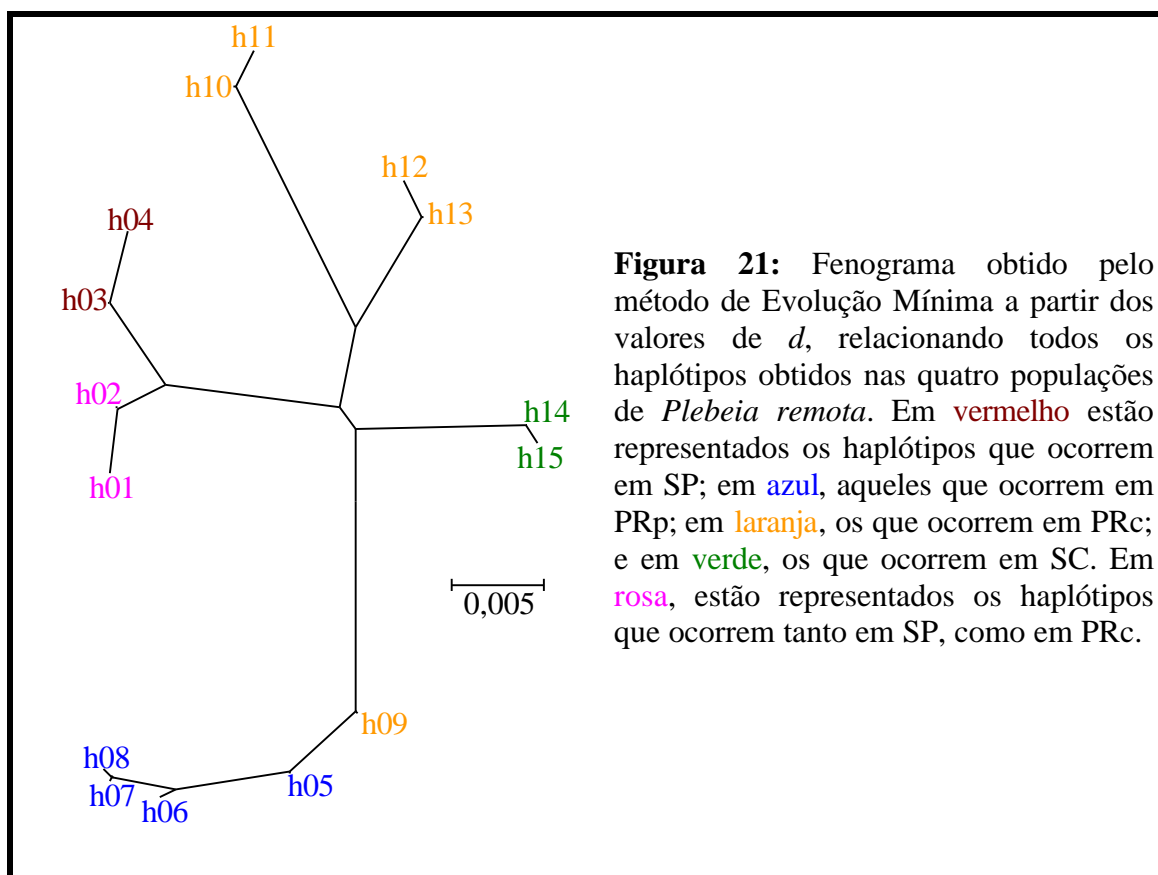
Tabela 6: Porcentagem da divergência de seqüência de nucleotídeos entre pares de haplótipos (*d*) (acima da diagonal) e número de sítios de restrição diferentes entre cada par de haplótipos (abaixo da diagonal) em *Plebeia remota*. Em **vermelho** estão representados os haplótipos que ocorrem em SP; em **azul**, aqueles que ocorrem em PRp; em **laranja**, os que ocorrem em PRc; e em **verde**, os que ocorrem em SC. Em **rosa**, estão representados os haplótipos que ocorrem tanto em SP como em PRc.

	h01	h02	h03	h04	h05	h06	h07	h08	h09	h10	h11	h12	h13	h14	h15
h01	-	0,56 (0,59)	1,74 (1,11)	2,28 (1,28)	4,35 (1,54)	4,83 (1,68)	5,76 (1,92)	4,97 (1,67)	1,18 (0,91)	5,59 (2,14)	2,45 (1,39)	1,87 (1,20)	2,65 (1,51)	2,81 (1,43)	2,28 (1,23)
h02	1	-	1,10 (0,84)	1,63 (1,03)	3,60 (1,28)	4,07 (1,42)	4,97 (1,67)	4,26 (1,45)	0,56 (0,60)	4,77 (1,89)	1,74 (1,11)	1,18 (0,91)	1,87 (1,20)	2,14 (1,19)	1,63 (1,03)
h03	3	2	-	2,81 (1,43)	3,60 (1,28)	4,07 (1,42)	3,83 (1,32)	4,26 (1,45)	1,74 (1,11)	4,77 (1,89)	3,02 (1,55)	2,45 (1,39)	1,87 (1,20)	1,03 (0,79)	0,52 (0,56)
h04	4	3	5	-	5,30 (1,81)	4,53 (1,55)	5,41 (1,78)	4,68 (1,56)	2,28 (1,28)	5,23 (1,98)	3,56 (1,69)	3,02 (1,55)	3,84 (1,84)	2,63 (1,33)	3,32 (1,56)
h05	7	6	6	9	-	0,48 (0,56)	1,42 (0,96)	1,87 (1,11)	4,35 (1,54)	4,68 (1,56)	4,35 (1,54)	3,85 (1,38)	3,34 (1,20)	3,39 (1,19)	2,93 (1,03)
h06	8	7	7	8	1	-	0,90 (0,74)	1,34 (0,90)	4,83 (1,68)	5,09 (1,66)	4,83 (1,68)	4,35 (1,54)	3,85 (1,38)	2,77 (0,96)	3,39 (1,19)
h07	10	9	7	10	3	2	-	0,41 (0,46)	5,76 (1,92)	3,81 (1,27)	5,76 (1,92)	5,30 (1,81)	4,83 (1,68)	2,61 (0,90)	3,19 (1,11)
h08	9	8	8	9	4	3	1	-	4,97 (1,67)	3,25 (1,09)	4,97 (1,67)	4,53 (1,55)	5,30 (1,81)	3,02 (1,04)	3,61 (1,24)
h09	2	1	3	4	7	8	10	9	-	4,30 (1,79)	1,18 (0,91)	0,60 (0,64)	1,27 (0,98)	2,81 (1,43)	2,28 (1,28)
h10	10	9	9	10	9	9	8	7	8	-	4,30 (1,79)	3,82 (1,68)	4,60 (1,93)	4,48 (1,76)	4,04 (1,67)
h11	4	3	5	6	7	8	10	9	2	8	-	0,60 (0,64)	1,27 (0,98)	4,09 (1,82)	3,56 (1,69)
h12	3	2	4	5	6	7	9	8	1	7	1	-	0,66 (0,70)	3,56 (1,69)	3,02 (1,55)
h13	4	3	3	6	5	6	8	9	2	8	2	1	-	3,02 (1,55)	2,45 (1,39)
h14	5	4	2	5	6	5	5	6	5	9	7	6	5	-	0,49 (0,52)
h15	4	3	1	6	5	6	6	7	4	8	6	5	4	1	-

Valores entre parêntesis são erros padrão.

Nota-se que os valores dos erros padrão são relativamente altos. Alguns chegam a ser maiores que o valor de d , mas quanto maior foi esse valor, menor foi o seu erro padrão, relativamente. Por causa disso, d serviu para distinguir os haplótipos distantemente relacionados, isto é, aqueles com maiores valores. Os haplótipos com menores valores não podem ser diferenciados, pois possuem erros padrão relativamente altos.

Os valores de d também serviram para a construção de um fenograma segundo o método de Evolução Mínima (**Figura 21**).



É possível notar que os haplótipos encontrados em SP estão num mesmo ramo (h01 a h04). O mesmo acontece com os haplótipos encontrados em PRp (h05 a h08) e em SC (h14 e h15). Os haplótipos encontrados em PRc estão dispersos, embora haja uma concentração de quatro deles (h10 a h13) em um único ramo.

Os valores de diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) estão expressos na

Tabela 7.

Tabela 7: Número de haplótipos encontrados e valores de diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (p) para cada uma das populações de *Plebeia remota*.

População	Nº de haplótipos	h	p
SP	4	0,5294 (0,1170)	0,005807
PRp	4	0,1761 (0,0881)	0,002191
PRc	7	1,0000 (0,0764)	0,022383
SC	2	0,4848 (0,1059)	0,002390
MÉDIA	4,25	0,5476 (0,0289)	0,008193 (0,000023)

Valores entre parêntesis são erros padrão.

Verificou-se a presença de aproximadamente quatro haplótipos distintos, em média, por população estudada. Os valores de h variaram de 0,1761 (\pm 0,0881) a 1,0000 (\pm 0,0764), com uma média de 0,5476 (\pm 0,0289). A população de PRc foi a que apresentou o maior valor de h . Isso significa que todas as colméias analisadas possuem haplótipos distintos, e que, ao se retirar duas colméias ao acaso dessa população, a probabilidade de que elas possuam haplótipos diferentes é de 100%. Curiosamente, PRc foi o local com o menor número amostral (sete) e com o maior número de haplótipos (sete), dentre todas as populações estudadas. Os valores de h encontrados em

populações de *A. cerana* (SIHANUNTAVONG *et al.*, 1999) foram menores, variando de 0,0000 ($\pm 0,0000$) a 0,5970 ($\pm 0,0330$), com uma média de 0,2850 ($\pm 0,0150$), isto é, cerca da metade do que foi encontrada em *P. remota* ($0,5476 \pm 0,0289$).

Em relação a π , índice que representa o número médio de diferenças de nucleotídeos por sítio entre dois haplótipos, os valores obtidos estão num intervalo de 0,002191 a 0,022383, com uma média de 0,008193 ($\pm 0,000023$). Assim como h , o maior valor de π foi observado em PRc, seguido de SP e SC, que apresentaram, respectivamente, valores quatro e nove vezes menores do que PRc. A população de PRp foi a que apresentou menor diversidade, tanto haplotípica quanto nucleotídica. Portanto, a população de PRc possui os haplótipos mais distintos, enquanto que PRp apresenta os mais similares. Os valores de π obtidos nas populações de *P. remota* foram maiores do que os obtidos para *A. cerana*, cujo valor máximo foi 0,003840 (SIHANUNTAVONG *et al.*, 1999), ou seja, cerca de sete vezes menor do que o obtido em PRc (0,022383). A média de π em *A. cerana* ($0,002180 \pm 0,000000$) (SIHANUNTAVONG *et al.*, 1999) foi cerca de quatro vezes menor do valor obtido para *P. remota* ($0,008193 \pm 0,000023$).

Os valores de h e π indicam que as populações de *P. remota* analisadas neste trabalho são mais heterogêneas do que as populações de *A. cerana* estudadas por SIHANUNTAVONG *et al.* (1999).

Tanto a medida de h , quanto de π foram comparadas apenas com os valores obtidos no estudo de populações de *A. cerana* (SIHANUNTAVONG *et al.*, 1999) porque em trabalhos similares realizados com outras espécies de abelhas, esses parâmetros não foram utilizados ou publicados.

É importante salientar que os valores de π podem estar subestimados, pois o fato de dois haplótipos diferirem por um único sítio de restrição não implica necessariamente que eles possuam apenas um nucleotídeo mutado, ainda que essa seja a maior probabilidade. Como a maioria das enzimas utilizadas reconheciam sítios de seis pares de bases, é possível que a mudança de um sítio seja decorrente de mutação em mais de um nucleotídeo. Desse modo, em se tratando de dados de RFLP, dados probabilísticos como os de π devem ser encarados com ressalva.

Estimativas de divergência de seqüência de nucleotídeos entre os pares de populações (δ) estão representadas na **Tabela 8**, cujos dados revelam uma proximidade genética entre as populações de SP e PRc (0,0060). Os maiores valores de divergência são encontrados quando se compara a população de PRp com as outras (0,0287 a 0,0386). Na **Tabela 8** também se encontram os valores de F_{ST} calculados entre pares de populações. Os dados mostraram estruturação genética populacional em todos os casos (0,1659 a 0,7266). Todos os valores de P são significativos, para $\alpha = 0,05$, isso significa que todos os valores de P que forem menores que 0,05, são significativos, ou seja, diferentes de zero.

Tabela 8: 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 *Plebeia remota*.

	SP	PRp	PRc	SC
SP	-	0,0386	0,0060	0,0184
PRp	0,6857*	-	0,0291	0,0287
PRc	0,1659 ⁺	0,6001*	-	0,0169
SC	0,4902*	0,7266*	0,2911 ^{&}	-

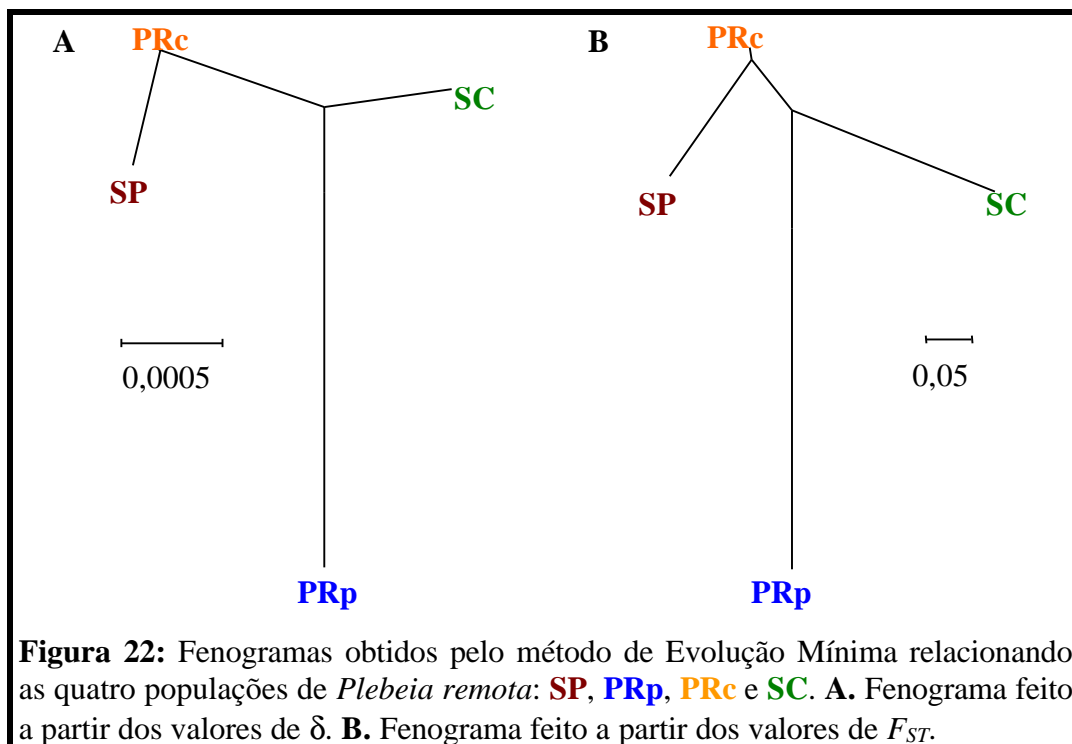
Número de permutações: 3.024; $\alpha = 0,05$;

*: $P = 0,0000 \pm 0,0000$;

⁺: $P = 0,0258 \pm 0,0028$;

[&]: $P = 0,0003 \pm 0,0003$.

Os valores da **Tabela 8** foram usados separadamente na construção de matrizes de distância genética entre as populações, e essas matrizes foram usadas na construção de fenogramas pelo método de Evolução Mínima (**Figura 22**). Embora apresentem escalas distintas, é possível observar que as topologias dos dois fenogramas são semelhantes, agrupando as populações de SP e PRc e distanciando a população de PRp das outras.



As comparações entre pares de populações segundo a distribuição de Monte Carlo indicaram heterogeneidade significativa das frequências de haplótipos ($P = 0,0000$), confirmando os dados obtidos por F_{ST} .

Outro cálculo de diferenciação entre os pares de populações empregado foi o teste exato baseado nas frequências haplotípicas (**Tabela 9**). Novamente, todos os pares de populações se mostraram diferenciados, com valores de $P < 0,05$.

Tabela 9: Valores de P de acordo com o teste exato de diferenciação entre os pares de populações de *Plebeia remota*.

População	SP	PRp	PRc
PRp	0,0000 (0,0000)		
PRc	0,0114 (0,0047)	0,0000 (0,0000)	
SC	0,0000 (0,0000)	0,0000 (0,0000)	0,0005 (0,0006)

Valores entre parêntesis são erros padrão.

Os resultados referentes à análise de estrutura genética de populações, empregando-se a análise de variância molecular (AMOVA), são apresentados na **Tabela 10**. Esse tipo de análise tem como objetivo demonstrar como delinear a extensão da diferenciação genética dentro e entre grupos (EXCOFFIER *et al.*, 1992). Foi observado que grande parte da diversidade haplotípica é encontrada entre as populações (58,35%), mas uma quantidade razoável pode ser encontrada dentro de cada população (41,65%). Uma grande vantagem da AMOVA, é a utilização de qualquer medida de distância genética, visto que as várias medidas disponíveis parecem não alterar significativamente as estimativas dos componentes da variância (EXCOFFIER *et al.*, 1992). Com relação ao valor obtido para Φ_{ST} (0,5835), assim como o valor de P , conclui-se que a probabilidade de que dois haplótipos, tirados ao acaso de uma população, sejam correlacionados, não é maior que 0,5835.

Tabela 10: Resultados da análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) em *Plebeia remota*. *P*: probabilidade de se obter um valor de Φ maior do que o observado.

Componente da Variância	Variância	% do total	<i>P</i>	F
Interpopulacional	0,2756	58,35	-	-
Intrapopulacional	0,1967	41,65	0,0000	$\Phi_{ST} = 0,5835$

Número de permutações: 1.023; $\alpha = 0,05$.

Os valores de divergência haplotípica intrapopulacional calculados por dois métodos estatísticos foram diferentes: 54,76% (valor médio, **Tabela 7**) e 41,65% (**Tabela 10**). Isso decorre do fato de que o valor médio de h , é uma média aritmética simples dos valores de h encontrados nas populações, enquanto que o valor obtido pela AMOVA leva em consideração o tamanho amostral das populações, e como PRp possui o menor valor de h e o maior número de indivíduos analisados, ela desvia o valor de divergência haplotípica intrapopulacional para baixo.

Tendo em vista a exclusividade da grande maioria dos haplótipos (dos 15 encontrados, apenas dois são compartilhados por duas populações), os valores de F_{ST} entre os pares de populações, assim como o teste de Monte Carlo, o teste exato e a análise por AMOVA, não há dúvidas de que essas populações estão diferenciadas umas das outras, no que se refere ao DNAm_t.

Sabe-se que os meliponíneos possuem dispersão muito limitada (KERR, comunicação pessoal), portanto, esse isolamento poderia ser um reflexo da distância geográfica entre as populações. De acordo com WRIGHT (1943), na ausência de fatores de distúrbio, populações, pequenas ou grandes, podem estar diferenciadas mesmo na presença de uma baixa dispersão.

Como já mencionado, SP e PRc compartilham dois haplótipos, h01 e h02. Estes, são os mais frequentes em SP. Em PRc, todos os haplótipos encontrados possuem a mesma frequência. Essas duas populações também sempre apresentaram os menores valores de F_{ST} e de δ , o que pode ser visualizado nos fenogramas. Uma possível explicação para esse compartilhamento de haplótipos é a existência de fluxo gênico via fêmea entre essas duas populações, decorrente de eventos de migração através de populações intermediárias. Isso significaria supor uma distribuição relativamente contínua entre SP e PRc, já que deve ser considerada a pequena capacidade de dispersão dessas abelhas. Tal hipótese deve ser refutada porque, se realmente houvesse fluxo gênico significativo entre essas duas populações, elas não estariam diferenciadas como os testes acima indicaram.

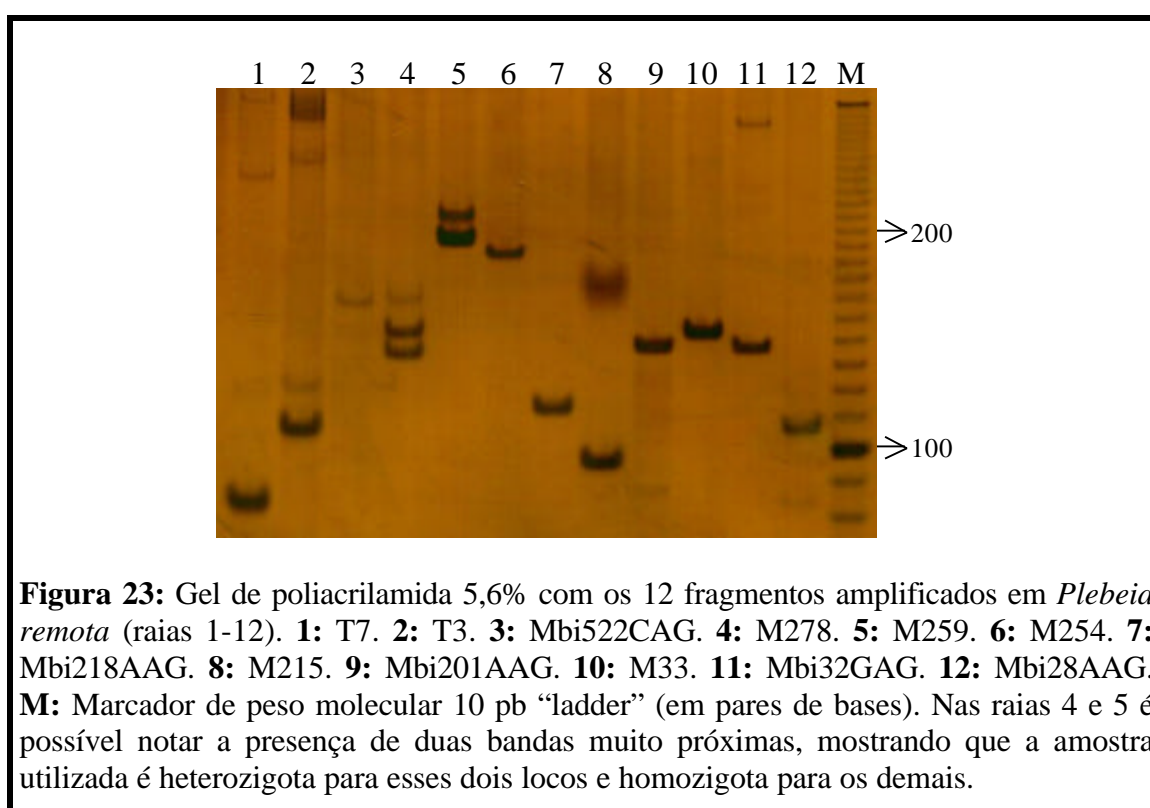
O transporte de colméias diretamente entre essas duas regiões, através de migração mediada pelo homem, também poderia explicar a presença desse dois haplótipos comuns entre SP e PRc.

Outra explicação plausível seria a ocorrência de um isolamento recente entre essas duas populações, que deveriam pertencer a uma mesma população ancestral, onde os haplótipos compartilhados seriam os mais frequentes. Os dois fenogramas construídos corroboram a hipótese de um ancestral comum entre SP e PRc.

2. Microssatélites

2.1. TESTES INICIAIS

Dos 25 pares de “primers” testados, 12 apresentaram resultados satisfatórios, isto é, amplificaram uma ou duas bandas de tamanho esperado para regiões de microssatélite (**Figura 23**).



Destes, 10 pares foram derivados de *M. bicolor* e dois de *S. postica*, abelhas que também pertencem à tribo Meliponini; ao contrário, os “primers” derivados de *A. mellifera* (Apini) e *B. terrestris* (Bombini) não amplificaram nenhum produto ou apresentaram bandas múltiplas mesmo após várias alterações nas condições de PCR. Tais resultados indicam uma maior similaridade dos genomas entre espécies (*P. remota*,

M. bicolor e *S. postica*) de uma mesma tribo (Meliponini). Observa-se ainda que a amostra inicialmente utilizada mostrou-se heterozigota para apenas dois locos (M259 e M278) (**Figura 23**, raias 4 e 5).

Algumas modificações nas condições de PCR foram necessárias para a obtenção dos resultados apresentados na **Figura 23**. Essas alterações estão sumarizadas na **Tabela 11**. Foram observadas diferenças de tamanho em relação ao esperado.

Tabela 11: Condições de amplificação dos 12 fragmentos de microsatélite de *P. remota*. **Ta:** Temperatura de anelamento. **To:** Tamanho observado aproximado em pares de bases. **Te:** Tamanho esperado em pares de bases.

Loco	Número de Ciclos	Ta (°C)	To	Te
T7*	30	65,0	85	76-104
T3*	35	62,5	105	109-131
Mbi522CAG	30	60,0	155	136
M278*	30	65,0	135/145	113
M259*	35	63,0	190/210	183
M254*	30	55,0	185	213
Mbi218AAG	30	61,0	115	131
M215*	30	65,0	95	92
Mbi201AAG	35	60,0	140	152
M33*	30	64,0	145	140
Mbi32GAG	30	63,0	140	154
Mbi28AAG	35	62,0	105	108

*: locos selecionados para a análise populacional.

Como mencionado nos Materiais e Métodos, somente os locos T7, T3, M278, M259, M254, M215 e M33 foram utilizados nas análises populacionais.

2.2. SEQUENCIAMENTO

Um indivíduo foi eleito para ter seus sete locos de microsatélites seqüenciados. No entanto, conseguimos seqüenciar apenas quatro locos: T3, M215, M259 e M278. A seqüência desses quatro produtos amplificados por PCR, mostrou que tratavam-se das

regiões de microsatélites, descritas para outras espécies (PETERS *et al.*, 1998; PAXTON *et al.*, 1999a).

De acordo com PAXTON *et al.* (1999a), o loco T3 é constituído por repetições (CT)₂₁ em *S. postica*. Em *P. remota*, a repetição CT não é perfeita, podendo ser caracterizada como imperfeita e interrompida (**Tabela 12**).

Tabela 12: Seqüência e tamanho do loco do microsatélite T3 de *Plebeia remota*. Em negrito estão as seqüências dos “primers” utilizados.

Loco	Seqüência 5'®3'	Tamanho
T3	GCGGGAGGGAAAGTCCTCTCGCTGACGTCTCTCTATCTCTCTC TTTCTCTCTGTGATCCCGCCTCACGTCCTTCCC GCACGCCTGACG AAGACG	96 pb

O loco M215, constituído pela repetição (TTC)₆ em *M. bicolor* (PETERS *et al.*, 1998), demonstrou ser idêntico em *P. remota* (**Tabela 13**).

Tabela 13: Seqüência e tamanho do loco do microsatélite M215 de *Plebeia remota*. Em negrito estão as seqüências dos “primers” utilizados.

Loco	Seqüência 5'®3'	Tamanho
M215	AGAGACGAAAAGTGGCGGCGGTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCA CACGAAGTGGTAAACCACCCCGCCACAAATCTCTTCCGCGCT ATC	91 pb

O loco M259 é um microsatélite do tipo composto e imperfeito em *M. bicolor* (PETERS *et al.*, 1998), sendo constituído pelas repetições (AGG)(AGA)₅(GGA)₂GAA(GGA)₂. Em *P. remota* foi observado a presença de repetições (AGG)(AGA)₇(GGA)₇, ou seja, com algumas diferenças em relação à *M. bicolor* (**Tabela 14**).

2.3. PRÉ-ANÁLISE: COLMÉIAS DE SP (C E C-SP) E PRP (P-SP E P)

Os dados de distribuição genotípica que permitiram a realização das análises dos itens 2.3.1. e 2.3.2., podem ser visualizados na **Tabela 38** e **39**, respectivamente, localizadas no **Apêndice** (item **IX**).

2.3.1. Cinco indivíduos

O primeiro teste realizado foi para verificar se essas quatro sub-populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. (Tabela 16). A hipótese nula considerada foi: ‘união aleatória dos gametas’, e $\alpha = 0,05$.

Tabela 16: Teste de probabilidade para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg nos locos e sub-populações. **N:** número de indivíduos amostrados por sub-população. **g.l.:** graus de liberdade.

	C (N = 45)	C-sp (N = 45)	P-sp (N = 30)	P (N = 145)	c^2	g.l.	P
M33	0,0112* (0,0000)	-	-	-			
M215	1,0000 (0,0000)	0,3331 (0,0000)	-	0,0118* (0,0000)	11,1	6	0,0858
M259	0,0029* (0,0005)	0,0000* (0,0000)	0,0062* (0,0000)	0,0000* (0,0000)	70,1	8	0,0000*
M278	0,0008* (0,0004)	0,0036* (0,0000)	-	1,0000 (0,0000)	25,4	6	0,0003*
T3	1,0000 (0,0000)	0,0719* (0,0000)	0,0124* (0,0000)	0,2488 (0,0000)	16,8	8	0,0320*
c^2	34,8	39,0	19,0	39,6			
g.l.	10	8	4	8			
P	0,0001*	0,0000*	0,0008*	0,0000*			

Valores entre parêntesis são erros padrão;

-: Loco com apenas um alelo;

*: $P < 0,05$.

Quando todas as colméias foram analisadas em conjunto, foi possível observar que todos os locos, com exceção do M215 (0,0858), apresentaram $P < 0,05$, mostrando então, que eles não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O mesmo aconteceu quando analisamos todos os locos em conjunto. Notou-se que as colméias mantidas nos quatro locais apresentaram $P < 0,05$ (**Tabela 16**).

O único cálculo de diferenciação populacional possível de ser realizado quando as populações e os locos não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg é o cálculo de diferenciação genotípica (WEIR, 1996). A hipótese nula assumida foi: ‘a distribuição genotípica é idêntica entre as populações’. Esse cálculo considerou cada par de populações separadamente e os locos como um conjunto (**Tabela 17**). Observou-se que todos os pares apresentaram uma distribuição genotípica distinta, com $P = 0$.

Tabela 17: Teste de diferenciação genotípica para cada par de população envolvendo todos os locos. **g.l.:** graus de liberdade.

Par de Sub-população	c^2	g.l.	P
C + C-sp	∞	10	0,0000
C + P-sp	∞	10	0,0000
C + P	∞	10	0,0000
C-sp + P-sp	∞	8	0,0000
C-sp + P	∞	8	0,0000
P-sp + P	∞	8	0,0000

Por esses resultados, podemos inferir que as quatro sub-populações estão diferenciadas umas das outras, não existindo então, fluxo gênico entre as colônias mantidas por vários anos no Laboratório de Abelhas do Departamento de Ecologia do IB/USP, originárias de Cunha e Prudentópolis. Um outro fator interessante foi que as

colméias que compartilham o lugar de origem estão tão diferenciadas quanto as que são de locais distintos.

2.3.2. Um indivíduo

A **Tabela 18** apresenta os valores de P para o teste de probabilidade de equilíbrio de Hardy-Weinberg para os locos e para as sub-populações. A hipótese nula considerada foi: ‘união aleatória dos gametas’, e $\alpha = 0,05$.

Tabela 18: Teste de probabilidade para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg nos locos e sub-populações. **N:** número de indivíduos amostrados por sub-população. **g.l.:** graus de liberdade.

	C (N = 9)	C-sp (N = 9)	P-sp (N = 6)	P (N = 29)	c²	g.l.	P
M215	1,0000 (0,0000)	1,0000 (0,0000)	-	0,1647 (0,0000)	3,6	6	0,7297
M259	0,2198 (0,0044)	0,5762 (0,0045)	0,6364 (0,0000)	0,5378 (0,0000)	6,3	8	0,6162
M278	0,0154* (0,0015)	1,0000 (0,0000)	-	-	8,3	4	0,0799
T3	-	1,0000 (0,0000)	0,2727 (0,0000)	0,2871 (0,0000)	5,1	6	0,5318
c²	11,4	1,1	3,5	7,3			
g.l.	6	8	4	6			
P	0,0776	0,9975	0,4775	0,2902			

Valores entre parêntesis são erros padrão;

-: Loco com apenas um alelo;

*: $P < 0,05$.

Foi possível observar que todos os valores de P foram maiores que 0,05 (mostrando que todos os locos em todas as sub-populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg), com exceção do loco M278 nas colméias de **C** ($0,0154 \pm 0,0015$). Quando todas as colméias foram analisadas em conjunto, foi possível observar que todos os locos apresentaram $P > 0,05$. O mesmo aconteceu quando analisamos todos os

locos em conjunto. Notou-se que as colméias mantidas nos quatro locais apresentaram $P > 0,05$.

Como os locos e as sub-populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, pôde-se realizar os cálculos de diferenciação genotípica e alélica.

Para o cálculo de diferenciação genotípica, a hipótese nula assumida foi: ‘a distribuição genotípica é idêntica entre as populações’. Esse cálculo considerou cada par de sub-populações separadamente e os locos como um conjunto (**Tabela 19**). Observou-se que os pares **C + C-sp** e **P-sp + P** apresentaram, cada um, distribuição genotípica idêntica ($P > 0,05$).

Tabela 19: Teste de diferenciação genotípica para cada par de sub-populações envolvendo todos os locos. **g.l.:** graus de liberdade.

Par de Sub-população	χ^2	g.l.	P
C + C-sp	12,166	8	0,1440
C + P-sp	21,146	8	0,0068*
C + P	∞	8	0,0000*
C-sp + P-sp	19,508	8	0,0124*
C-sp + P	37,312	8	0,0000*
P-sp + P	4,777	8	0,7811

*: $P < 0,05$.

Além da diferenciação genotípica, calculou-se também a diferenciação alélica interpopulacional, assumindo como hipótese nula: ‘a distribuição alélica é idêntica entre as populações’. Esse cálculo considerou cada par de sub-populações separadamente e os locos como um conjunto (**Tabela 20**). Observou-se que os pares **C + C-sp** e **P-sp + P** apresentaram, cada um, distribuição alélica idêntica ($P > 0,05$), do mesmo modo que a distribuição genotípica realizada acima.

Tabela 20: Teste de diferenciação alélica para cada par de sub-populações envolvendo todos os locos. **g.l.:** graus de liberdade.

Par de sub-populações	c^2	g.l.	P
C + C-sp	11,666	8	0,1667
C + P-sp	27,264	8	0,0006*
C + P	∞	8	0,0000*
C-sp + P-sp	17,971	8	0,0214*
C-sp + P	39,289	8	0,0000*
P-sp + P	5,562	8	0,6962

*: $P < 0,05$.

Todos esses resultados mostraram isolamento entre as sub-populações provenientes de locais distintos. Pode-se, portanto, considerar todas as colméias provenientes de Cunha como uma única população (SP); e todas as colméias provenientes de Prudentópolis como uma única população (PRp), independentemente do local em que elas estavam sendo mantidas.

2.3.3. Conclusões da pré-análise

Os dois tipos de análises anteriores geraram resultados diferentes. Enquanto que a análise com cinco indivíduos detectou diferenciação entre as quatro sub-populações, a análise com um indivíduo refletiu o que era teoricamente esperado, ou seja, não diferenciação entre sub-populações que compartilham o mesmo local de origem.

Se os cálculos realizados com um indivíduo realmente refletirem a realidade, é interessante observar a ausência de fluxo gênico entre as colméias provenientes de Cunha e Prudentópolis, sendo que tal ausência não é devida à distância geográfica, visto que elas estão sendo mantidas no mesmo local há vários anos. Talvez exista alguma barreira fisiológica ou morfológica impedindo o cruzamento entre rainhas e zangões provenientes de locais diferentes.

No entanto, uma questão pode ser levantada. Suponha que as colméias estejam sendo mantidas em São Paulo há 20 anos. Considerando que houvesse fluxo gênico entre as colméias provenientes dos dois locais distintos, será que esse tempo (20 anos), seria o suficiente para uma homogeneização do genoma nuclear dessas abelhas, ou melhor, da frequência dos alelos dos locos de microssatélites utilizados? Para responder essa questão é necessário que conheçamos mais sobre a biologia e comportamento dessa espécie.

2.4. ANÁLISE TOTAL (SP, PRP, PRC E SC)

Devido aos resultados obtidos na pré-análise, serão apresentados, com maiores detalhes, somente os resultados obtidos na análise com um indivíduo das populações de SP, PRp, PRc e SC. As tabelas com os resultados das análises estatísticas realizadas com cinco indivíduos de cada colméia estão no **Apêndice (Tabelas 40 a 48)**.

- Distribuição genotípica e alélica:

Sete locos de microssatélite foram utilizados na análise total de 72 indivíduos divididos em quatro populações: SP (18), PRp (35), PRc (sete) e SC (12). A **Tabela 21** apresenta todos os genótipos encontrados.

Dois locos (M254 e T7) apresentaram somente um genótipo (AA) em todas as populações. Por outro lado, sete genótipos foram encontrados para o loco M259, dos quais cinco estão representados em heterozigose.

Tabela 21: Genótipos encontrados por loco analisado e respectivo número de indivíduos a eles relacionados, distribuídos por localidade. **N:** número total de indivíduos analisados por localidade.

Loco	Genótipo	SP (N = 18)	PRp (N = 35)	PRc (N = 7)	SC (N = 12)
M33	AA			1	
	BB	18	35	6	12
M215	AA	8	27	1	3
	AB	8	6	6	9
	BB	2	2		
M254	AA	18	35	7	12
M259	AA			3	
	AB	6	12	2	6
	AC	5			
	AE	2			
	BB	1	16	1	5
	BD	3	7	1	1
	BF	1			
M278	AB	1		2	
	AC	2			
	BB	9	34	5	12
	BC	3	1		
	BF	2			
	DD	1			
T3	AA	10	1	4	3
	AB	6	14	2	8
	BB	1	20		1
	<i>nd</i>	1		1	
T7	AA	18	35	7	12

nd: não diagnosticado.

A população de SP apresentou o maior número de genótipos diferentes entre os sete locos utilizados, totalizando 21. Destes, 11 são genótipos compostos por dois alelos distintos (heterozigose). Em seguida aparece a população de PRc, com 15 genótipos, sendo cinco em heterozigose. A população de PRp apresentou 14 genótipos, sendo que cinco são compostos por dois alelos distintos. Por último ficou a população de SC, com

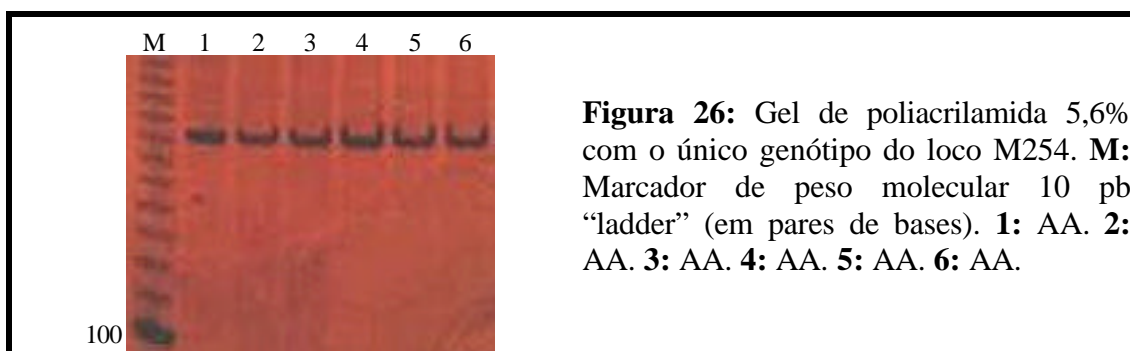
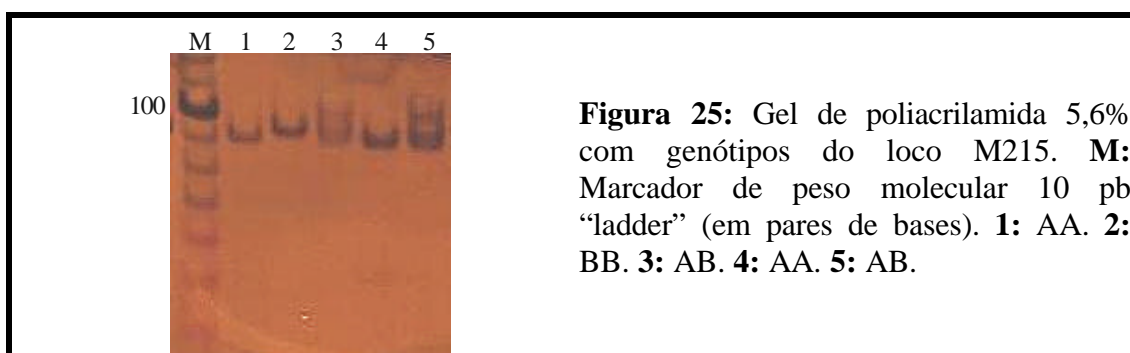
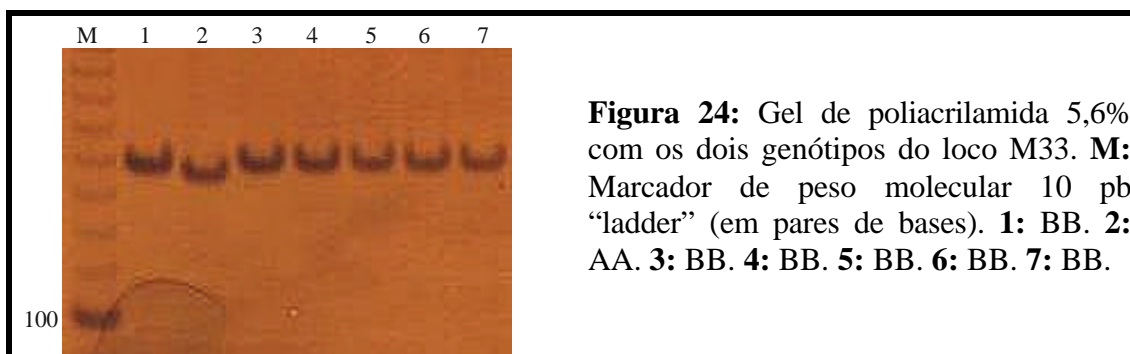
12 genótipos, dos quais apenas quatro estão em heterozigose. Um indivíduo da população de SP e um de PRc não puderam ser diagnosticados para o loco T3, pois não ocorreu a amplificação do produto de PCR nessas amostras, e portanto, não foram considerados em nenhum dos cálculos realizados.

Assim como no número de genótipos, o loco M259 foi o que apresentou o maior número de alelos (seis), seguido pelo loco M278, que apresentou cinco alelos. Os locos M254 e T7 apresentaram somente um único alelo. Os três locos restantes apresentaram dois alelos cada. A população de SP também apresentou o maior número de alelos (18), enquanto que SC apresentou o menor (11). Todos esses dados estão sumarizados na **Tabela 22**.

Tabela 22: Número de alelos por loco em cada uma das quatro populações estudadas de *Plebeia remota*.

Loco	SP	PRp	PRc	SC
M33	1	1	2	1
M215	2	2	2	2
M254	1	1	1	1
M259	6	3	3	3
M278	5	2	2	1
T3	2	2	2	2
T7	1	1	1	1
TOTAL	18	12	13	11

As **Figuras 24 a 29** mostram alguns dos genótipos e alelos encontrados em *P. remota*, e a **Tabela 23** apresenta a frequência dos alelos nos locos polimórficos (isto é, desconsiderando os locos M254 e T7) e três diferentes medidas de taxa de heterozigose: a observada (H_O), a esperada sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_E) e a não-tendenciosa (H_N).



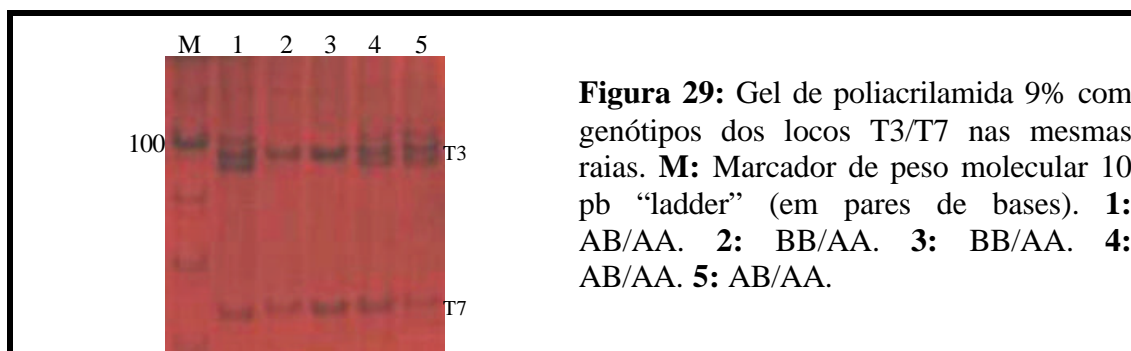
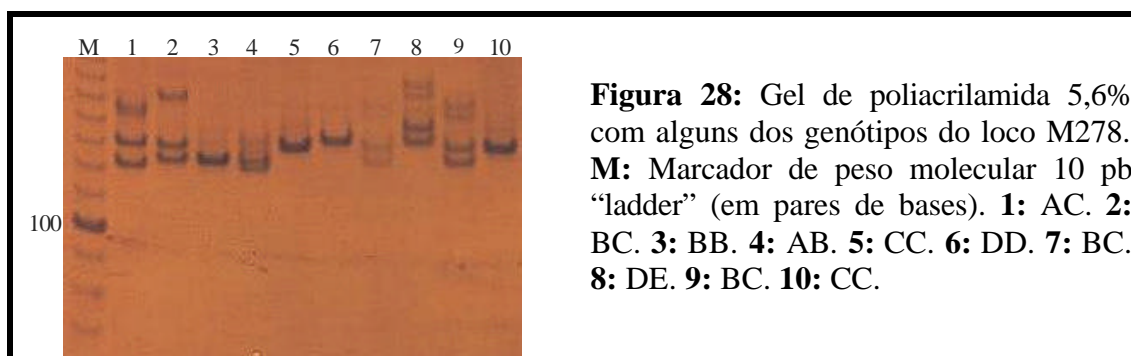
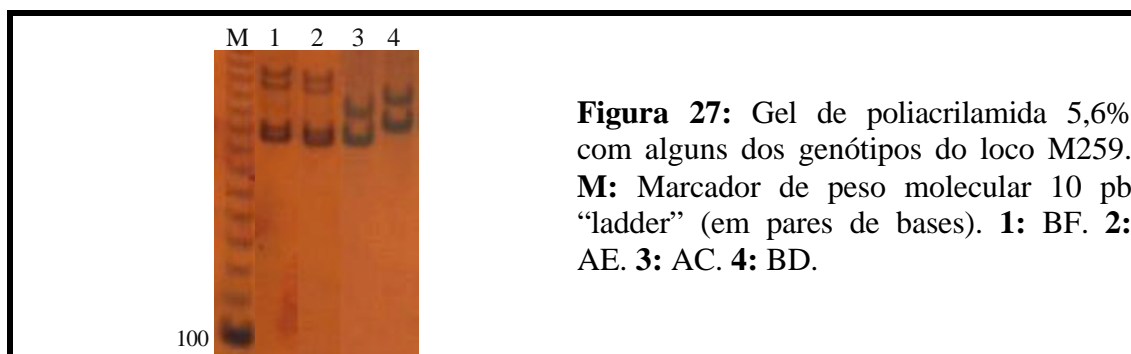


Tabela 23: Frequências alélicas, taxa de heterozigose observada (H_O), taxa de heterozigose esperada sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_E) e taxa de heterozigose não-tendenciosa (H_N) por loco e por localidade em populações de *Plebeia remota*. n : número de alelos amostrados por loco e população.

Loco	Alelo (pb)	SP	PRp	PRc	SC
M33		(n = 36)	(n = 70)	(n = 14)	(n = 24)
	A (135)			0,1429	
	B (140)	1,0000	1,0000	0,8571	1,0000
	H_O	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	H_E	0,0000	0,0000	0,2449	0,0000
	H_N	0,0000	0,0000	0,2637	0,0000
M215		(n = 36)	(n = 70)	(n = 14)	(n = 24)
	*A (91)	0,6667	0,8571	0,5714	0,6250
	B (97)	0,3333	0,1429	0,4286	0,3750
	H_O	0,3889	0,2000	0,8571	0,7500
	H_E	0,4244	0,2649	0,4898	0,4688
	H_N	0,4365	0,2687	0,5275	0,4891
M259		(n = 36)	(n = 70)	(n = 14)	(n = 24)
	A (185)	0,3611	0,1714	0,5714	0,2500
	*B (195)	0,3333	0,7286	0,3572	0,7083
	C (205)	0,1389			
	D (215)	0,0833	0,1000	0,0714	0,0417
	E (193)	0,0556			
	F (190)	0,0278			
	H_O	0,9444	0,5429	0,4286	0,5833
	H_E	0,7284	0,4298	0,5408	0,4340
	H_N	0,7492	0,4360	0,5824	0,4529
M278		(n = 36)	(n = 70)	(n = 14)	(n = 24)
	A (125)	0,0833		0,1429	
	*B (128)	0,6666	0,9857	0,8571	1,0000
	C (135)	0,1389	0,0143		
	D (138)	0,0556			
	F (120)	0,0556			
	H_O	0,4444	0,0286	0,2857	0,0000
	H_E	0,5231	0,0282	0,2449	0,0000
	H_N	0,5381	0,0286	0,2637	0,0000
T3		(n = 34)	(n = 70)	(n = 12)	(n = 24)
	*A (96)	0,7647	0,2286	0,8333	0,5833
	B (98)	0,2353	0,7714	0,1667	0,4167
	H_O	0,3529	0,4000	0,3333	0,6667
	H_E	0,3599	0,3527	0,2778	0,4861
	H_N	0,3708	0,3578	0,3030	0,5072

*: Alelos sequenciados.

O alelo 'A' do loco M33 aparece somente na população de PRc, numa frequência de 14,29%. Esse alelo apareceu em homozigose em um único indivíduo e sua frequência relativamente alta deve-se ao pequeno número amostral dessa população (7 indivíduos). O loco M215 apresentou dois alelos, sendo que o alelo 'A' foi o mais frequente em todas populações, variando de 57,14% em PRc a 85,71% em PRp. Como já mencionado, o loco M259 apresentou seis alelos. O alelo 'A' foi o mais frequente nas populações de SP e PRc (36,11 e 57,14%), enquanto que o alelo 'B' foi o mais frequente nas populações de PRp e SC (72,86 e 70,83%). Três alelos (A, B e D) são compartilhados por todas populações, ao passo que os outros três alelos (C, E e F) são exclusivos da população de SP. Em relação ao loco M278, o alelo 'B' foi o mais frequente em todas as populações, variando de 66,66% em SP a 100% em SC. O alelo 'A' é compartilhado pelas populações de SP e PRc, o alelo 'C' pelas populações de SP e PRp e os alelos 'D' e 'F' são exclusivos da população de SP. O alelo mais frequente do loco T3 nas populações de SP, PRc e SC foi o 'A' (76,47%, 83,33% e 58,33, respectivamente), enquanto que em PRp, foi o alelo 'B' que apareceu com maior frequência (77,14%).

O número de genótipos/alelos, no total, não diferiu muito nas análises realizadas com um e cinco indivíduos (23/19 *versus* 26/20, respectivamente) nas quatro populações de *P. remota*. É interessante notar que as frequências alélicas observadas também não diferiram muito nas duas análises. A exceção foi encontrada na população de PRc para os locos M215 (alelos A e B) e M259 (alelos A e B). No estudo com cinco indivíduos as frequências desses alelos foram as mesmas, enquanto que no estudo com

um indivíduo, os alelos 'A' foram os mais freqüentes. Tal desvio deve ter ocorrido pelo pequeno número amostral (sete abelhas) na análise com um indivíduo.

O loco M259 apresentou os maiores valores de taxa de heterozigose segundo as três medidas realizadas. Em ordem decrescente, seguem-se os locos M215, T3, M278 e M33, sendo que este último foi o único loco com mais de um alelo que não apresentou nenhum heterozigoto ($H_O = 0$) em todas as populações. Para o loco M259, a população de PRc foi a que apresentou o menor valor de H_O (0,4286), enquanto que a de SP foi a que apresentou o maior valor ($H_O = 0,9444$). O menor valor para a população de PRc pode ser devido ao pequeno número amostral (sete indivíduos).

Embora possa ser pensado que quanto mais indivíduos analisados, maior será a taxa de heterozigose observada, tal fato não ocorreu. Das 20 comparações possíveis (4 populações *versus* 5 locos), H_O na análise com um indivíduo foi maior em nove, sendo que em seis casos, os valores foram iguais.

- Diversidade gênica:

A **Tabela 24** apresenta um resumo da variação genética encontrada para cada população estudada de *P. remota*.

A população de SP apresentou o maior valor de A ($2,6 \pm 0,8$). O menor valor foi encontrado em SC ($1,9 \pm 0,3$). No entanto, as populações ficam com os valores de A muito parecidos quando considerados os erros padrão dessas estimativas.

Tabela 24: Resumo da variação genética para cada população de *Plebeia remota*. **N:** tamanho amostral médio; **A:** número médio de alelos por loco; **PLP:** porcentagem de locos polimórficos.

	SP	PRp	PRc	SC
N	17,9 (0,1)	35,0 (0,0)	6,9 (0,1)	12,0 (0,0)
A	2,6 (0,8)	1,7 (0,3)	1,9 (0,3)	1,6 (0,3)
PLP (95% de critério)	57,14	42,86	71,43	42,86
PLP (99% de critério)	57,14	57,14	71,43	42,86
H_O média	0,312 (0,132)	0,163 (0,084)	0,272 (0,119)	0,286 (0,136)
H_E média	0,294 (0,112)	0,151 (0,071)	0,257 (0,080)	0,198 (0,094)
H_N média	0,302 (0,115)	0,153 (0,072)	0,277 (0,086)	0,207 (0,098)

Valores entre parêntesis são erros padrão.

O número médio de alelos por loco também foi muito parecido nas análises com um e cinco indivíduos. No entanto, o alelo 'E' do loco M278 só foi identificado no estudo baseado em cinco indivíduos. O valor de *A* em populações de abelhas do gênero *Bombus* variou de $1,5 \pm 0,4$ a $7,0 \pm 2,0$ (ESTOUP *et al.*, 1996; WIDMER *et al.*, 1998; WIDMER E SCHMID-HEMPEL, 1999). Maiores valores de *A* foram observados em populações de *A. cerana*, variando de $5,0 \pm 2,2$ a $9,3 \pm 1,9$ (SITTIPRANEED *et al.*, 2001). Para NEI (1987) o número médio de alelos por loco não é uma boa medida de diversidade por ser totalmente dependente do tamanho amostral, sendo que os maiores valores de *A* são encontrados em trabalhos cujo número de indivíduos analisados é grande. No trabalho de SITTIPRANEED *et al.* (2001), o número de abelhas *A. cerana* analisadas (38 a 68) foi maior do que o número de *Bombus* (18 a 62) (ESTOUP *et al.*, 1996; WIDMER *et al.*, 1998; WIDMER E SCHMID-HEMPEL, 1999) e de *P. remota* (na análise com um indivíduo).

A população de PRp foi a única que apresentou variação na porcentagem de locos polimórficos, quando comparados os critérios de 95 e 99% (42,86 e 57,14, respectivamente). A população que apresentou a maior porcentagem de locos polimórficos, foi a de PRc (71,43). Isso significa que nessa população, cinco dos sete locos utilizados, foram polimórficos.

A porcentagem de locos polimórficos foi idêntica em ambos tipos de análises efetuadas (um indivíduo *versus* cinco). A única exceção foi encontrada em SP, adotando-se o critério de 99%. Esse valor refere-se ao loco M33, cuja análise com cinco indivíduos revelou um alelo (A) que a análise com um indivíduo não revelou. WIDMER *et al.* (1998) trabalharam com abelhas do gênero *Bombus*, utilizando “primers” de microsatélites desenhados para *B. terrestris*. Os autores obtiveram valores similares aos obtidos neste trabalho. Entretanto, em outros trabalhos envolvendo o mesmo gênero e os mesmos “primers”, esses valores se mostraram maiores do que os obtidos em *P. remota* (ESTOUP *et al.*, 1996; WIDMER E SCHMID-HEMPEL, 1999).

A taxa de heterozigose observada na população de PRp ($0,163 \pm 0,084$) foi a menor de todas as populações. A população de SP apresentou a maior taxa ($0,312 \pm 0,132$), embora seja um valor muito próximo do encontrado em SC ($0,286 \pm 0,119$) e PRc ($0,272 \pm 0,136$). Considerando os valores dos erros padrão dessas estimativas, H_O entre as populações é relativamente homogêneo. Os valores de H_E foram os menores das três estimativas de taxa de heterozigose observadas. Mas novamente, em todas as populações, essas taxas foram similares quando considerados os valores dos erros padrão.

Levando em consideração os valores dos erros padrão, a taxa de heterozigose média observada também foi similar nos dois tipos de análises (um indivíduo *versus* cinco). O valor de H_O em *A. cerana* (SITTIPRANEED *et al.*, 2001) foi similar ao valor obtido em *P. remota*. Os “primers” utilizados em *A. cerana* foram desenhados para outra espécie do mesmo gênero, *A. mellifera*. Os “primers” utilizados em *P. remota* foram desenhados para abelhas de outros gêneros (*M. bicolor* e *S. postica*). Portanto, seria esperado que o valor de H_O fosse menor em *P. remota*, quando comparado com *A. cerana*. FRANCK *et al.* (2001) utilizando “primers” de microsatélites homoespecíficos em populações de *A. mellifera*, obtiveram valores de H_O altos ($0,896 \pm 0,029$), indicando que a utilização de “primers” homoespecíficos pode estar relacionada com H_O .

A taxa de heterozigose (H) é a proporção média de heterozigotos por loco em uma população, cruzando aleatoriamente, ou a proporção esperada de locos heterozigotos em um indivíduo escolhido aleatoriamente (NEI, 1987). Se as frequências genotípicas não estiverem nas proporções de Hardy-Weinberg, H não é igual à proporção média de heterozigotos (NEI, 1987). As análises com cinco indivíduos revelaram desvio do equilíbrio Hardy-Weinberg, sugerindo que os valores de H dessa análise não equivalem à proporção média de heterozigotos por loco. Na realidade, a menos que um grande número de locos seja estudado, H não é uma medida recomendada (NEI, 1987). De acordo com NEI (1978), se o número de indivíduos analisados for pequeno, o número de locos estudados tem de ser grande (idealmente, mais de 50 locos deveriam ser usados para se obter uma estimativa confiável da taxa de heterozigose média de todo o genoma). Portanto, o autor criou a taxa de heterozigose

não-tendenciosa (NEI, 1978), que é a melhor estimativa de H quando o número de indivíduos analisados por população for menor que 50 (NEI, 1987). No estudo feito com um indivíduo, as quatro populações de *P. remota* possuíam um número de abelhas analisadas menor que 50, e nesse caso, o uso de H_N seria mais apropriada. Entretanto, todos os valores de H foram semelhantes.

- Equilíbrio de Hardy-Weinberg:

Para verificar se os locos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, foram realizados ‘testes exatos’ (Tabela 25). A hipótese nula considerada foi: ‘união aleatória dos gametas’, e $\alpha = 0,05$. Isso significa que para essa hipótese ser aceita, a probabilidade de que ela ocorra tem que ser maior que 0,05.

Tabela 25: Teste de probabilidade para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg nos locos e populações. **g.l.:** graus de liberdade.

	SP	PRp	PRc	SC	c^2	g.l.	P
M33	-	-	0,0769 (0,0000)	-			
M215	1,0000 (0,0000)	0,1161 (0,0000)	0,1608 (0,0000)	0,0922 (0,0000)	12,7	8	0,1215
M259	0,0218* (0,0004)	0,3366 (0,0000)	0,6270 (0,0000)	0,6339 (0,0000)	11,7	8	0,1665
M278	0,0736 (0,0006)	-	1,0000 (0,0000)	-	5,2	4	0,2657
T3	1,0000 (0,0000)	0,6513 (0,0000)	1,0000 (0,0000)	0,5477 (0,0000)	2,1	8	0,9791
c^2	12,9	7,3	9,7	6,9			
g.l.	8	6	10	6			
P	0,1165	0,2903	0,4656	0,3318			

Valores entre parêntesis são erros padrão;

-: Loco com apenas um alelo;

*: $P < 0,05$.

Foi possível observar que todos os valores de P foram maiores que 0,05, mostrando que todos os locos em todas as populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com exceção do loco M259 em SP, cujo P foi menor que 0,05 ($0,0218 \pm 0,0004$).

Quando as populações foram analisadas em conjunto, foi possível observar que todos os locos apresentaram $P > 0,05$, mostrando então, que eles estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O mesmo aconteceu quando analisamos todos os locos em conjunto. Notou-se que as quatro populações apresentaram $P > 0,05$. Cada população também estava, portanto, em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Do mesmo modo, quando todas as populações foram consideradas como sendo apenas uma única grande população, e todos os locos foram analisados em conjunto, o valor de χ^2 foi igual a 36,8; com 22 graus de liberdade, $P = 0,0248$, ou seja, $P < 0,05$. Isso significa que as quatro populações estudadas não se comportam como uma única população panmítica.

Para saber se o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg do loco M259 na população de SP era devido a uma deficiência ou um excesso de heterozigotos, foi realizado o 'teste U'. A hipótese nula considerada foi a mesma do teste anterior, portanto $P < 0,05$ significa deficiência ou excesso de heterozigotos (**Tabela 26**).

Tabela 26: Teste para verificar desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, por deficiência ou excesso de heterozigotos.

Deficiência	SP	PRp	PRc	SC
M33	-	-	0,0769 (0,0000)	-
M215	0,6529 (0,0000)	0,1161 (0,0000)	1,0000 (0,0000)	1,0000 (0,0000)
M259	0,9811 (0,0003)	1,0000 (0,0000)	0,2914 (0,0000)	1,0000 (0,0000)
M278	0,0455* (0,0004)	-	1,0000 (0,0000)	-
T3	0,6572 (0,0000)	0,8927 (0,0000)	1,0000 (0,0000)	0,9655 (0,0000)
Excesso	SP	PRp	PRc	SC
M33	-	-	1,0000 (0,0000)	-
M215	0,7499 (0,0000)	0,9903 (0,0000)	0,1492 (0,0000)	0,0861 (0,0000)
M259	0,0287* (0,0004)	0,0335* (0,0000)	0,8951 (0,0000)	0,2929 (0,0000)
M278	0,9632 (0,0004)	-	0,9231 (0,0000)	-
T3	0,8226 (0,0000)	0,4291 (0,0000)	0,9091 (0,0000)	0,2929 (0,0000)

Valores entre parêntesis são erros padrão;

-: Loco com apenas um alelo;

*: $P < 0,05$.

De acordo com esse teste foi possível verificar que o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg do loco M259 em SP foi devido a um excesso de heterozigotos ($0,0287 \pm 0,0004$). Entretanto, resultados contraditórios também foram observados. O loco M278 em SP, que pelo teste anterior mostrou-se estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($0,0736 \pm 0,0006$), parece apresentar uma deficiência de heterozigotos nessa região ($0,0455 \pm 0,0004$). O mesmo acontece com o loco M259 em PRp, que parece apresentar um excesso de heterozigotos ($0,0335 \pm 0,0000$) que não foi detectado no teste anterior.

Até o momento observam-se mais similaridades do que diferenças na comparação dos dois tipos de análises (um indivíduo *versus* cinco). Apesar disso, uma

das principais diferenças encontradas referiu-se ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, pois nem as populações e nem os locos estavam em equilíbrio na análise com cinco indivíduos, ao passo que a situação totalmente oposta ocorreu na análise com um indivíduo.

Verificar se uma população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg simplifica cálculos posteriores, mas deve-se considerar também as implicações biológicas disso. A ausência de equilíbrio pode ser explicada pelo tamanho pequeno da população, cruzamentos não aleatórios, ou efeitos de seleção e/ou migração (WEIR, 1996), embora existam casos de padrões de seleção (LEWONTIN E COCKERHAM, 1959) e cruzamentos não aleatórios (LI, 1988) que podem levar ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Vamos analisar cada possibilidade, numa tentativa de explicar os resultados obtidos com cinco indivíduos:

- *Pequeno tamanho da população*: no nosso caso essa não parece ser a melhor explicação, pois o estudo realizado com um indivíduo, isto é, com um tamanho populacional cinco vezes menor, revelou que as populações estavam em equilíbrio Hardy-Weinberg;
- *Cruzamento não aleatório*: se estivesse ocorrendo endocruzamento, ou cruzamento preferencial em *P. remota*, esses fenômenos também deveriam ser detectados no estudo feito com um indivíduo, o que não aconteceu;
- *Seleção*: estamos lidando teoricamente com um marcador seletivamente neutro. Sabe-se que os microsatélites podem estar ligados a genes que estão sob ação da seleção natural, e assim, sofrer um efeito indireto desta. De qualquer modo, o efeito deveria ser percebido na análise com um e cinco indivíduos;

- *Migração*: se esse fenômeno estivesse ocorrendo, não deveria ser detectada a grande estruturação existente entre as populações.

No entanto, essa contradição de resultados nas análises com um indivíduo *versus* cinco pode ser explicada da seguinte maneira: em abelhas, os machos são haplóides e as fêmeas diplóides; acredita-se que em meliponíneos, as rainhas sejam fecundadas por apenas um macho, na grande maioria das vezes (PETERS *et al.*, 1999). Isso significa que o número máximo de alelos que pode ser encontrado para um loco em uma colméia, é três, sendo um alelo do macho (que deve estar presente em todas as filhas), e dois da rainha (se ela for heterozigota, e esses alelos forem diferentes do alelo do macho). Se a rainha for homozigota, todas as filhas terão o mesmo genótipo. Ou seja, o grau de parentesco existente dentro de uma colméia é muito alto. Por isso, provavelmente esse grande número de genótipos relacionados faça com que a análise com cinco indivíduos resulte em desvio das proporções de Hardy-Weinberg. Seria, de certo modo, similar ao fenômeno de endocruzamento e/ou cruzamento preferencial, nos quais o grau de genótipos relacionados seriam muito altos.

Contudo, já foram encontradas evidências de cruzamentos múltiplos em *S. postica* e *M. beecheii* (PAXTON *et al.*, 1999b), como por exemplo: mais de três alelos de determinado loco entre as abelhas de uma colméia; e baixo grau de parentesco entre operárias, observado através de cálculos estatísticos (QUELLER E GOODNIGHT, 1989). Alguns genótipos anômalos (indicando cruzamentos múltiplos) foram encontrados em nosso estudo com *P. remota*. Segundo PETERS *et al.* (1999), alguns casos de genótipos anômalos podem ser explicados, sem se considerar a possibilidade da rainha ser fecundada por mais de um macho. Por exemplo:

- Abelhas campeiras podem entrar em colméias diferentes. Isso acontece quando as colméias estão artificialmente próximas, como em meliponários. Portanto, no momento da coleta pode-se obter uma abelha que não é originalmente daquela colméia;
- Recente substituição de rainha em uma colméia. Conseqüentemente, no momento da coleta poderão ser obtidas operárias, filhas de rainhas diferentes, que estão coexistindo por algum tempo nessa colméia. Se as rainhas possuírem genótipos diferentes para determinado loco, suas filhas também o terão, e tal fato indicará erroneamente a possibilidade de cruzamento múltiplo;
- Considere o seguinte exemplo: cinco abelhas irmãs genotipadas para um loco da seguinte maneira: AB, AB, AB, AB e CC. Esses genótipos indicam que a rainha (heterozigota) foi fecundada por mais de um macho, caso contrário, deveria haver um alelo comum entre todas as irmãs. No entanto, o genótipo CC pode ser explicado pela presença de um alelo nulo (não amplificação do alelo 'A' ou 'B', se a abelha fosse heterozigota AC ou BC), ou pela inclusão acidental de um macho na amostra (supondo, por exemplo, que a rainha fosse AC e o macho que a fecundou, B; nesse caso, as filhas seriam AB, ou BC, e os zangões poderiam ser A ou C, como no exemplo acima).

De todas estas possibilidades que explicam a presença de genótipos anômalos em *P. remota*, só excluimos a possibilidade de inclusão acidental de machos na amostra, pois abelhas que possuíam um genótipo anômalo (em homozigose) para um loco, foram heterozigotas para outros locos.

- Desequilíbrio de ligação:

‘Testes exatos’ para desequilíbrio de ligação (locos “ligados”) foram realizados entre pares de locos em todas as populações (**Tabela 27**). Para esses testes a hipótese nula foi: ‘genótipos de um loco são independentes dos genótipos de outros locos’. Portanto, valores de $P < 0,05$ significam que os locos estão “ligados”.

Tabela 27: Teste para verificar desequilíbrio de ligação entre os pares de locos nas populações.

Par de locos	SP	PRp	PRc	SC
M33 + M215	-	-	0,1427 (0,0002)	-
M33 + M259	-	-	1,0000 (0,0000)	-
M33 + M278	-	-	0,2861 (0,0002)	-
M215 + M259	0,0668 (0,0004)	0,5311 (0,0005)	1,0000 (0,0000)	0,3862 (0,0003)
M215 + M278	0,1883 (0,0007)	1,0000 (0,0000)	0,2854 (0,0002)	
M215 + T3	1,0000 (0,0000)	0,7541 (0,0004)	-	1,0000 (0,0000)
M259 + M278	0,8145 (0,0011)	0,5423 (0,0003)	0,7143 (0,0003)	-
M259 + T3	0,0363* (0,0003)	0,9178 (0,0002)	0,7341 (0,0003)	1,0000 (0,0000)
M278 + T3	0,7187 (0,0007)	0,4284 (0,0004)	0,3333 (0,0002)	-

Valores entre parêntesis são erros padrão;

-: Loco com apenas um alelo;

*: $P < 0,05$.

Tal situação só foi encontrada em SP, com o par de locos M259 + T3 ($0,0363 \pm 0,0003$). Em outras populações esses valores se mostraram muito altos, variando de $0,7341 \pm 0,0003$ em PRc a $1,0000 \pm 0,0000$ em SC.

Testes de probabilidade múltipla por pares de locos considerando todas as populações em conjunto (método de Fischer) não detectou nenhum desequilíbrio de ligação (**Tabela 28**). Todos os valores de P foram maiores que 0,05, sendo que o menor valor (0,1427) encontrado foi no par de locos M33 + M215, e o maior (1,0000) no par M259 + M33.

Tabela 28: Teste para verificar desequilíbrio de ligação. Valor de P para cada par de loco entre todas as populações (método de Fischer). **g.l.:** graus de liberdade.

Par de locos	c^2	g.l.	P
M33 + M215	3,894	2	0,1427
M33 + M259	0,000	2	1,0000
M33 + M278	2,503	2	0,2861
M215 + M259	8,579	8	0,3790
M215 + M278	5,847	6	0,4405
M215 + T3	0,564	6	0,9970
M259 + M278	2,307	6	0,8894
M259 + T3	7,420	8	0,4921
M278 + T3	4,554	6	0,6022

Diferenças também foram encontradas nos valores de desequilíbrio de ligação dos locos. Na análise com cinco indivíduos, apenas dois pares de locos mostraram ser independentes, enquanto que na análise com um indivíduo, todos os pares de locos estavam em equilíbrio de ligação. Certamente os locos permaneceram nas mesmas posições nos cromossomos nas análises com um e cinco indivíduos. Novamente, a diferença encontrada entre as duas análises deve ser reflexo do grau de parentesco dos

indivíduos analisados. O caso detectado na população de SP (no estudo com um indivíduo), em que os locos M259 e T3 estão ligados, pode indicar alguma mutação cromossômica exclusiva dessa população.

Uma das grandes vantagens do estudo de microsatélites, é a possibilidade de se estudar locos distribuídos por todo o genoma do organismo. Um tipo de estudo que ajudaria a elucidar essa questão é a hibridação *in situ*, cuja localização dos locos seria observada nos cromossomos. Além de desequilíbrio de ligação, seria possível verificar se os locos estariam próximos às regiões teloméricas ou aos centros de origem de replicação, que são locais onde os microsatélites são mais instáveis e, portanto, mais polimórficos (EISEN, 1999).

O cariótipo de *P. remota* já foi descrito e apresenta $2n = 34$ cromossomos para fêmeas (CAIXEIRO, 1999). Seria interessante aumentar o número de locos analisados, de modo a abranger o maior número de cromossomos possíveis, e assim, ter uma melhor percepção da evolução dos microsatélites no genoma dessa espécie. Além do mais, sabe-se que o uso de um grande número de locos ajuda na redução de erros estocásticos de inferência evolutiva (CHAKRABORTY E KIMMEL, 1999).

- Diferenciação populacional:

Três tipos de cálculos de diferenciação genotípica foram realizados assumindo a mesma hipótese nula: 'a distribuição genotípica é idêntica entre as populações'. O primeiro deles considerou as populações como um todo e cada loco separadamente (**Tabela 29**). O resultado foi que apenas o loco M33 apresentou valor de P ($0,0971 \pm 0,0002$) que confirmasse essa hipótese. Quando todos os locos foram considerados em

conjunto, a probabilidade de que essa hipótese se confirmasse, foi 0,0000 ($\chi^2 = \infty$; g.l. = 10).

Tabela 29: Teste de diferenciação genotípica para cada loco.

Loco	P
M33	0,0971 (0,0002)
M215	0,0186* (0,0002)
M259	0,0001* (0,0000)
M278	0,0002* (0,0000)
T3	0,0000* (0,0000)

Valores entre parêntesis são erros padrão;
*: $P < 0,05$.

O segundo cálculo considerou cada par de populações e cada loco separadamente (**Tabela 30**). Observou-se que o loco M33 foi o único cuja hipótese nula foi confirmada em todos os pares de populações. Os pares SP + PRc e PRc + SC apresentaram distribuição genotípica idêntica em todos os locos ($P > 0,05$).

Tabela 30: Teste de diferenciação genotípica por loco para cada par de população.

Loco	SP + PRp	SP + PRc	SP + SC	PRp + PRc	PRp + SC	PRc + SC
M33	-	0,2802 (0,0002)	-	0,1666 (0,0002)	-	0,3685 (0,0002)
M215	0,0634 (0,0002)	0,7190 (0,0002)	0,7621 (0,0002)	0,0719 (0,0002)	0,0370* (0,0002)	1,0000 (0,0000)
M259	0,0000* (0,0000)	0,3318 (0,0005)	0,0222* (0,0001)	0,0134* (0,0001)	0,4596 (0,0004)	0,1660 (0,0003)
M278	0,0001* (0,0000)	0,4123 (0,0005)	0,0251* (0,0001)	0,0245* (0,0001)	1,0000 (0,0000)	0,1227 (0,0002)
T3	0,0000* (0,0000)	0,7187 (0,0003)	0,1398 (0,0003)	0,0001* (0,0000)	0,0012* (0,0000)	0,1114 (0,0002)

Valores entre parêntesis são erros padrão;

-: Loco com apenas um alelo;

*: $P < 0,05$.

O terceiro cálculo considerou cada par de populações separadamente e os locos como um conjunto (**Tabela 31**). Observou-se que os pares SP + PRc e PRc + SC apresentaram uma distribuição genotípica idêntica ($P > 0,05$), confirmando o que foi mostrado acima.

Tabela 31: Teste de diferenciação genotípica para cada par de população envolvendo todos os locos. **g.l.:** graus de liberdade.

Par de População	c^2	g.l.	P
SP + PRp	∞	8	0,0000*
SP + PRc	7,843	10	0,6442
SP + SC	19,466	8	0,0126*
PRp + PRc	42,496	10	0,0000*
PRp + SC	21,668	8	0,0056*
PRc + SC	14,173	10	0,1652

*: $P < 0,05$.

Três tipos de cálculos de diferenciação alélica foram realizados assumindo a mesma hipótese nula: ‘a distribuição alélica é idêntica entre as populações’. O primeiro deles considerou as populações como um todo e cada loco separadamente (**Tabela 32**).

Tabela 32: Teste de diferenciação alélica para cada loco.

Loco	P
M33	0,0089* (0,0000)
M215	0,0145* (0,0001)
M259	0,0001* (0,0000)
M278	0,0001* (0,0000)
T3	0,0000* (0,0000)

Valores entre parêntesis são erros padrão;

*: $P < 0,05$.

O resultado foi que nenhum apresentou um valor de P que confirmasse essa hipótese, isto é, $P > 0,05$. Quando todos os locos foram considerados em conjunto, a probabilidade de que essa hipótese se confirmasse, foi 0,0000 ($\chi^2 = \infty$; g.l. = 10).

O segundo cálculo considerou cada par de populações e cada loco separadamente (**Tabela 33**). Observou-se que nenhum loco aceitou ou rejeitou essa hipótese em unanimidade, ou seja, variou entre os pares de populações. Os pares SP + PRc e PRc + SC apresentaram distribuição alélica idêntica em todos os locos ($P > 0,05$).

Tabela 33: Teste de diferenciação alélica por loco para cada par de população.

Loco	SP + PRp	SP + PRc	SP + SC	PRp + PRc	PRp + SC	PRc + SC
M33	-	0,0742 (0,0001)	-	0,0261* (0,0001)	-	0,1293 (0,0002)
M215	0,0409* (0,0002)	0,5336 (0,0003)	0,7871 (0,0002)	0,0227* (0,0001)	0,0205* (0,0001)	1,0000 (0,0000)
M259	0,0000* (0,0000)	0,6553 (0,0006)	0,0438* (0,0003)	0,0065* (0,0000)	0,5307 (0,0004)	0,0669 (0,0002)
M278	0,0000* (0,0000)	0,5686 (0,0005)	0,0204* (0,0001)	0,0262* (0,0001)	1,0000 (0,0000)	0,1292 (0,0002)
T3	0,0000* (0,0000)	1,0000 (0,0000)	0,1616 (0,0003)	0,0001* (0,0000)	0,0021* (0,0000)	0,2601 (0,0003)

Valores entre parêntesis são erros padrão;

-: Loco com apenas um alelo;

*: $P < 0,05$.

O terceiro cálculo considerou cada par de populações separadamente e os locos como um conjunto (**Tabela 34**). Observou-se que os pares SP + PRc e PRc + SC apresentaram uma distribuição alélica idêntica ($P > 0,05$), confirmando o que foi mostrado acima.

Tabela 34: Teste de diferenciação alélica para cada par de população envolvendo todos os locos. **g.l.:** graus de liberdade.

Par de População	c^2	g.l.	<i>P</i>
SP + PRp	77,546	8	0,0000*
SP + PRc	8,432	10	0,5867
SP + SC	18,160	8	0,0201*
PRp + PRc	50,575	10	0,0000*
PRp + SC	21,339	8	0,0063*
PRc + SC	16,285	10	0,0917

*: $P < 0,05$.

Os cálculos de diferenciação populacional também revelaram resultados contrastantes. Pela análise com cinco indivíduos, todas as populações são diferenciadas umas das outras. Porém, a análise com um indivíduo não mostrou diferenciação (genotípica e alélica) entre as populações de SP e PRc, e entre PRc e SC.

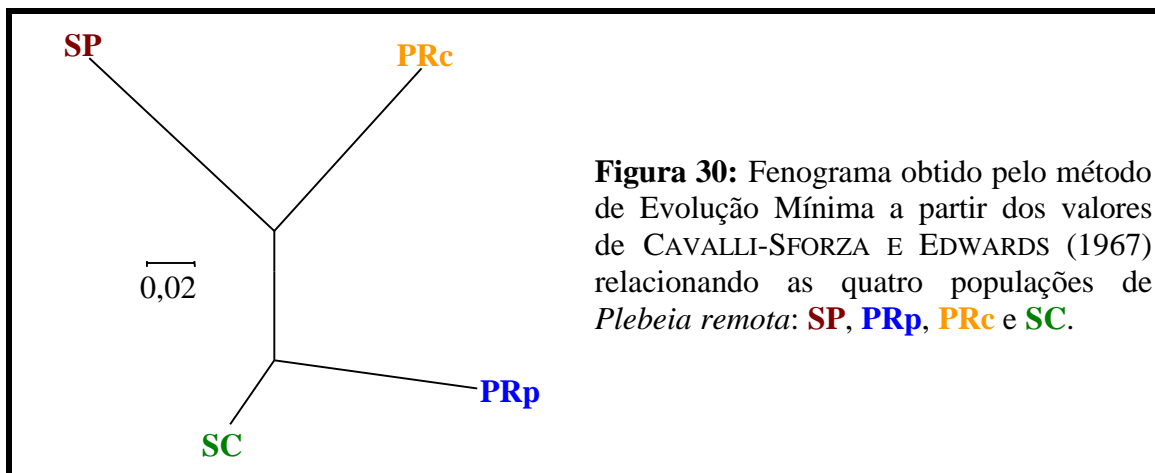
- Distância genética:

A distância “chord” de CAVALLI-SFORZA E EDWARDS (1967) foi calculada para cada par de populações (**Tabela 35**). A menor distância observada (0,119) foi entre PRp e SC, enquanto que o maior valor foi encontrado entre as populações de PRp e PRc (0,242).

Tabela 35: Valores de distância genética entre os pares de populações de *Plebeia remota* de acordo com CAVALLI-SFORZA E EDWARDS (1967).

População	SP	PRp	PRc
PRp	0,239	-	
PRc	0,199	0,242	-
SC	0,204	0,119	0,171

Os valores da **Tabela 35** foram utilizados na construção de um fenograma baseado no método de Evolução Mínima (**Figura 30**).



Embora com diferenças de escala, a topologia desse fenograma foi similar às topologias obtidas pelo RFLP do DNAm_t, com SP e PRc compartilhando um ramo, e SC e PRp compartilhando outro.

Os valores da distância genética nas análises com um e cinco indivíduos foram muito similares, tanto que os fenogramas construídos com base nesses valores apresentaram topologias idênticas, com SP e PRc compartilhando um ramo e SC e PRp compartilhando outro ramo. O fenograma construído com base nos valores da análise com cinco indivíduos pode ser visualizado na **Figura 31 (Apêndice)**.

Em virtude de todos os resultados das análises populacionais, podemos argumentar que, ao contrário da análise do DNAm_t que revelou estruturação entre as quatro populações de *P. remota*, o estudo com microsatélites (um indivíduo por colméia) não revelou diferenciação entre as populações de SP e PRc, e entre PRc e SC. Desse fato levanta-se uma questão curiosa. Como SP pode ser “igual” a PRc, PRc ser “igual” a SC, e SP não ser “igual” a SC? A resposta para essa questão pode estar no

pequeno número amostral da população de PRc (sete). As populações de SP e SC possuem um número de indivíduos analisados que foi suficiente para detectar estruturação entre essas populações, enquanto que o número de indivíduos da população de PRc, não foi grande o suficiente para essa população se diferenciar de SP ou SC.

Diante dos resultados obtidos pelos dois tipos de análise (um indivíduo *versus* cinco), o estudo envolvendo um indivíduo de cada colméia, apesar de possuir menor número amostral, foi mais confiável, já que todas as abelhas analisadas não possuíam uma relação de parentesco. As **Considerações Finais** (item **V**) levarão em conta apenas os resultados obtidos com o estudo de um indivíduo de cada colméia.

2.5. COMPARAÇÃO INTERESPECÍFICA

A **Tabela 36** sumariza os valores de H_O e do número de alelos observados em *P. remota* e em outras quatro espécies de meliponíneos (PETERS *et al.*, 1998), para os locos que foram identificados inicialmente em *M. bicolor*.

O presente trabalho encontrou dois alelos para o loco M33, número esse que não é encontrado em mais nenhuma espécie. O loco M215 mostrou-se polimórfico apenas em *P. remota* e em *M. bicolor*. Curiosamente, o loco M254 mostrou-se totalmente monomórfico em *P. remota* e *T. clavipes*, ao passo que as outras três espécies apresentaram no mínimo três alelos para esse loco. O loco M259 parece ser menos polimórfico na espécie em que ele foi descrito, pois nas outras espécies H_O variou de 0,50 em *M. quadrifasciata* e *S. postica* a 0,75 em *T. clavipes*. Caso inverso é

encontrado com o loco M278, em que *M. bicolor* apresenta o maior valor de H_o . No entanto, o número de alelos encontrados (cinco) é menor do que o encontrado em *P. remota* (seis). É curioso notar que o presente trabalho apresenta o maior número de indivíduos e colméias amostrados, mas mesmo assim só possui três alelos a mais que *M. bicolor*. Seria esperado que, quanto mais indivíduos fossem amostrados, maior seria o número de alelos encontrados.

Tabela 36: Taxa de heterozigose e número de alelos (entre parêntesis) observados em *Plebeia remota* (**Pr**), *Melipona bicolor* (**Mb**), *Melipona quadrifasciata* (**Mq**), *Tetragona clavipes* (**Tc**) e *Scaptotrigona postica* (**Sp**); para os microsatélites descritos em *M. bicolor* (PETERS *et al.*, 1998).

Loco	<i>Pr</i>	<i>Mb</i>	<i>Mq</i>	<i>Tc</i>	<i>Sp</i>
M33	0,00 (2)	0,00 (1)	0,00 (1)	0,00 (1)	0,00 (1)
M215	0,41 (2)	0,50 (3)	0,00 (1)	0,00 (1)	0,00 (1)
M254	0,00 (1)	0,38 (3)	1,00 (3)	0,00 (1)	0,50 (5)
M259	0,65 (6)	0,12 (2)	0,50 (2)	0,75 (3)	0,50 (3)
M278	0,16 (6)	0,86 (5)	0,01 (1)	0,25 (2)	0,25 (2)
NI	360	8	4	4	4
Nn	72	8	2	4	4

NI: número de indivíduos analisados;

Nn: número de ninhos analisados.

A **Tabela 37** sumariza os valores de H_o para os locos T3 e T7 em *P. remota* e *S. postica*, além do número de alelos encontrados em cada loco para essas e mais outras seis espécies (PAXTON *et al.*, 1999a). Em ambas as medidas, os valores de *P. remota* foram menores do que em *S. postica*, a espécie na qual esses locos foram inicialmente identificados (PAXTON *et al.*, 1999a). Novamente o número de indivíduos amostrados não interferiu no número de alelos encontrados, pois tanto *M. beecheii* quanto *P. remota*, as quais foram as espécies com maior número de indivíduos analisados, não apresentaram mais alelos do que as outras espécies.

Tabela 37: Número de alelos (entre parêntesis) observados em *Plebeia remota* (**Pr**), *Scaptotrigona postica* (**Sp**), *Scaptotrigona pectoralis* (**Se**), *Scaptotrigona tubida* (**St**), *Lestremelitta limao* (**Ll**), *Melipona beecheii* (**Me**), *Nannotrigona* sp. (**Ns**) e *Trigona nigra* (**Tn**); e taxa de heterozigose observada em **Pr** e **Sc** para os microsatélites descritos em *S. postica* (PAXTON *et al.*, 1999a).

Loco	Pr	Sp	Se	St	Ll	Me	Ns	Tn
T3	0,34 (2)	0,72 (5)	(2)	(2)	(2)	(-)	(1)	(1)
T7	0,00 (1)	0,78 (6)	(2)	(2)	(-)	(3)	(-)	(1)
NI	353	18	2	2	2	99	2	2
Nn	71	18	1	1	1	10	1	1

(-): bandas múltiplas, arrasto ou não amplificação do produto;

NI: número de indivíduos analisados;

Nn: número de ninhos analisados.

Segundo alguns autores (CHUNG *et al.*, 1993; PÉPIN *et al.*, 1995), microsatélites perfeitos possuem mais alelos do que microsatélites interrompidos com um similar número de repetições, pois as interrupções parecem estabilizar os microsatélites, diminuindo a possibilidade de erro durante a replicação (WEBER, 1990). Todavia, neste trabalho, o loco que apresentou maior número de alelos foi do tipo composto e interrompido (M259). Teoricamente ele deveria ser menos polimórfico do que locos com microsatélites perfeitos (M215, M254, T3 e T7). Ao contrário, os locos M254 e T7 foram totalmente monomórficos, e M215 e T3 só apresentaram dois alelos. Outro loco que seria esperado não ser polimórfico por ser interrompido, foi o loco M278, que também apresentou seis alelos (na análise com cinco indivíduos). Os locos T3 e T7 são repetições de duas bases. De acordo com CHAKRABORTY *et al.* (1997), esse tipo de repetição evolui em uma taxa maior do que repetições de três e quatro bases. Isso significa que os locos T3 e T7 deveriam ser mais polimórficos do que os outros locos estudados, o que também não ocorreu.

Outro fator, além do tipo de repetição, que poderia levar a um baixo nível de polimorfismo, ou a uma deficiência de heterozigotos, seria a não amplificação de alelos devido a mutações nos sítios de ligação dos “primers” (CALLEN *et al.*, 1993); os chamados alelos nulos. Se apenas um alelo de um indivíduo heterozigoto for amplificado, será visualizado no gel de poliacrilamida apenas esse alelo, e esse indivíduo será erroneamente genotipado como homozigoto. Um modo de se evitar tal fenômeno é a utilização de “primers” desenhados para a própria espécie em estudo. SIMONSEN *et al.* (1998) utilizaram em búfalos africanos, “primers” desenhados para bovinos. Ao suspeitarem da ocorrência de alelos nulos, eles desenharam “primers” específicos para búfalos e notaram que vários indivíduos antes tidos como homozigotos para determinado loco, eram na realidade, heterozigotos. Portanto, o uso de “primers” interespecíficos também está envolvido na perda de polimorfismo (PÉPIN *et al.*, 1995). De acordo com CALLEN *et al.* (1993), alelos nulos e subdivisão populacional são os principais fatores que levam a uma deficiência de heterozigotos sob as premissas do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Outro fenômeno que pode levar a uma diminuição de polimorfismos é a ocorrência de homoplasia de tamanho. Dois produtos de PCR do mesmo loco, que possuam o mesmo tamanho, podem não ser idênticos em suas seqüências (ESTOUP E CORNUET, 1999). Sempre consideramos que alelos (de um mesmo loco) de tamanhos iguais possuem seqüências idênticas. VIARD *et al.* (1998) observaram que em populações de *A. mellifera* e *B. terrestris*, homoplasia de tamanho é mais comum entre do que dentro de populações, e como consequência, esse fenômeno levou a uma menor diferenciação nas populações de *B. terrestris*. Esses autores ainda mostraram que a

presença de homoplasia de tamanho pode alterar reconstruções filogenéticas. Segundo ESTOUP *et al.* (1995b) que também trabalharam com populações de *A. mellifera* e *B. terrestris*, microsatélites não-perfeitos seriam mais polimórficos do que os perfeitos, e por isso seriam menos susceptíveis à homoplasia de tamanho. Essa observação vem de encontro com o observado por outros autores (CHUNG *et al.*, 1993; PÉPIN *et al.*, 1995), e reflete bem o obtido neste trabalho, em que os microsatélites não perfeitos foram mais polimórficos do que os perfeitos.

V. Considerações Finais

Resultados idênticos e contraditórios foram obtidos com a utilização dos dois marcadores moleculares, na detecção de estruturação entre as populações de *P. remota*. Entre os resultados idênticos, destaca-se o grande isolamento da população de PRp de todas as outras populações. Entre os contraditórios, o estudo com microssatélites não revelou diferenciação entre as populações de SP e PRc, e entre PRc e SC, ao passo que a análise com DNAm_t revelou diferenciação entre todas as populações.

Filopatria por um ou ambos os sexos está tipicamente associada com comportamento social (ROSS, 2001). Parece que em insetos sociais, a dispersão da rainha é geralmente limitada, e por isso, significativas estruturações locais têm sido encontradas em muitos insetos sociais (ROSS, 2001). Este comportamento da rainha, também explicaria a diferenciação populacional encontrada pela análise do DNAm_t.

A ação do homem na estrutura e dinâmica das populações de *P. remota* e de outras abelhas é evidente, pois é só observar a diferença entre a distribuição original da Mata Atlântica e a atual. O isolamento de populações é a primeira consequência da fragmentação da mata, seguida pela total extinção das populações, à medida que o desmatamento avança sobre a floresta.

Outra maneira em que o homem poderia estar influenciando na estrutura das populações de *P. remota*, seria através do transporte de colméias. Ao se retirar ninhos de seu habitat natural e levá-los a um local diferente, deve-se ter em mente que as novas rainhas e machos produzidos nestas colméias estarão sujeitos ao cruzamento com abelhas nativas locais, alterando, dessa maneira, o patrimônio genético original. A variação genética fornece a matéria-prima para futuras mudanças evolutivas, e

diferentes níveis de variação em diferentes populações podem fornecer evidências de diferentes eventos evolutivos do passado (WEIR, 1996); e descrever a quantidade de variação genética entre populações, assim como estudar seu mecanismo de manutenção, são os principais objetivos da genética de populações (NEI, 1987).

Este foi o primeiro trabalho a realizar uma análise da genética populacional de uma espécie de abelha pertencente à tribo Meliponini. A espécie *P. remota* é uma abelha que apresenta importante papel ecológico em nossas matas, contudo, sua biologia geral ainda é bastante desconhecida. Esse fato, de certa forma, tornou-se por vezes um obstáculo, mas também um desafio para a realização deste trabalho. De forma geral, os dados aqui obtidos com os dois marcadores moleculares e determinação de métodos de análise poderão contribuir para futuras pesquisas com os meliponíneos, e por que não, com abelhas pertencentes a outros grupos.

VI. RESUMO



Ferramentas moleculares têm sido amplamente utilizadas em estudos de caracterização de populações. Dentre essas ferramentas destaca-se o DNA mitocondrial (DNAmt) e os microssatélites. Em abelhas *Apis mellifera* esses dois marcadores têm auxiliado no entendimento da dinâmica de populações, caracterização de subespécie, filogeografia e relações filogenéticas. Neste trabalho, nosso objetivo foi caracterizar populações da abelha nativa *Plebeia remota* com os marcadores moleculares acima citados para uma possível correlação entre suas composições genéticas e biogeografia. Foram estudadas amostras de quatro populações (SP, PRp, PRc e SC) pertencentes a três estados brasileiros: SP, PR e SC. Foi caracterizado o DNAmt de 70 colméias dessa espécie, e pudemos observar a existência de 15 haplótipos distintos. Diferentes métodos estatísticos revelaram isolamento entre as quatro populações estudadas, indicando a ausência de fluxo gênico via fêmea. Com relação ao uso dos microssatélites, sete locos foram selecionados e analisados em 360 indivíduos de 72 colméias. Análises realizadas com cinco indivíduos por colméia mostraram ser menos eficientes do que as realizadas com um indivíduo por colméia, cujo resultado não mostrou diferenciação entre as populações de SP e PRc, e entre PRc e SC. Essa ausência de isolamento pode ser devida ao pequeno número amostral de PRc. As topologias dos fenogramas construídos com base nos dados do DNAmt e dos microssatélites, relacionando as quatro populações estudadas, foram concordantes.

VII. Abstract



Molecular tools have been widely applied in studies of population characterization. Among those tools, the mitochondrial DNA (mtDNA) and the microsatellites are the most successfully used. In honeybees *Apis mellifera* these two molecular markers have added new and important informations about population dynamics, subspecies characterization, phylogeography and phylogenetic relationships. In this work, our objective was to characterize populations of the native bee *Plebeia remota* using the molecular markers mentioned above and make correlation between their genetic compositions and biogeography. Samples from four populations (SP, PRp, PRc and SC) were studied, belonging to three Brazilian states: SP, PR and SC. The mtDNA from 70 colonies was characterized, and 15 distinct haplotypes were determined. Through statistical methods, isolation among the four populations studied was shown, indicating the absence of female gene flow. For the microsatellites, seven loci were selected and 360 individuals from 72 colonies were analyzed. The data obtained using five individuals per colony showed to be less efficient than the analysis made with one individual per colony. The microsatellite data from one individual did not show isolation between SP and PRc populations neither between PRc and SC populations. The apparent lack of population structure might be due to the small number of samples from PRc. The topologies of the phenograms built based on the data from mtDNA and microsatellites, were similar.

VIII. Referências Bibliográficas

- AMOS W. (1999) A comparative approach to the study of microsatellite evolution. "In" *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds. D.B. GOLDSTEIN E C. SCHLÖTTERER), pp. 66-79, Oxford University Press, New York.
- ARIAS M.C. E SHEPPARD W.S. (1996) Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **5**: 557-566.
- ARIAS M.C. E INFANTE-MALACHIAS M.E. (2001) RFLP: o emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. "In" *Biologia Molecular e Evolução* (ed. S.R. MATIOLI), pp. 143-152, Holos Editora, Ribeirão Preto.
- ARIAS M.C.; SOARES A.E.E. E NÓBREGA 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.; FRANCISCO F.O.; SILVESTRE D.; WEINLICH R. E SHEPPARD W.S. (1998) Utilização de pares de "primers" específicos para a amplificação integral do genoma mitocondrial de abelhas *Apis mellifera*. *Anais do III Encontro sobre Abelhas*, p. 271, Ribeirão Preto.
- AVISE J.C.; ARNOLD J.; BALL R.M.; BERMINGHAM E.; LAMB T.; NEIGEL J.E.; REEB C.A. E SAUNDERS N.C. (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 489-522.
- BAVERSTOCK P.R. E MORITZ C. (1996) Project design. "In" *Molecular Systematics*. 2nd edition (eds. D.M. HILLIS; C. MORITZ E B.K. MABLE), pp. 17-27, Sinauer Associates, Massachusetts.

- BEAUMONT M.A. E BRUFORD M.W. (1999) Microsatellites in conservation genetics. "In" *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds. D.B. GOLDSTEIN E C. SCHLÖTTERER), pp. 165-182, Oxford University Press, New York.
- BEIGUELMAN B. (1996) *Curso Prático de Bioestatística*. 4a edição. Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto.
- BROWN W.M. (1985) The mitochondrial genome of animals. "In" *Molecular Evolutionary Genetics* (ed. R.J. MACINTYRE), pp. 95-130, Plenus Press, New York.
- BROWN W.M.; GEORGE M.JR. E WILSON A.C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **76**: 1967-1971.
- CAIXEIRO A.P.A (1999) Caracterização citogenética da heterocromatina constitutiva e sua implicação na evolução do cariótipo de espécies do gênero *Plebeia* (Hymenoptera: Apinae: Meliponini). Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- CALLEN D.F.; THOMPSON A.D.; SHEN Y.; PHILLIPS H.A.; RICHARDS R.I.; MULLEY J.C. E SUTHERLAND G.R. (1993) Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics* **52**: 922-927.
- CAMARGO J.M.F. E PEDRO S.R.M. (1992) Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini review. *Apidologie* **23**: 509-522.
- CAMARGO J.M.F. E WITTMANN D. (1989) Nest architecture and distribution of the primitive stingless bee, *Mourella caerulea* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae): evidence for the origin of *Plebeia* (s. lat.) on the Gondwana Continent. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* **24**: 213-229.

- CAVALLI-SFORZA L.L. E EDWARDS A.W.F. (1967) Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* **19**: 233-257.
- CHAKRABORTY R.; KIMMEL M.; STIVERS D.N.; DAVISON L.J. E DEKA R. (1997) Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94**: 1041-1046.
- CHAKRABORTY R. E KIMMEL M. (1999) Statistics of microsatellite loci: estimation of mutation rate and pattern of population expansion. "In" *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds. D.B. GOLDSTEIN E C. SCHLÖTTERER), pp. 139-150, Oxford University Press, New York.
- CHUNG M.; RANUM L.P.W.; DUVICK L.A.; SERVADIO A.; ZOGHBI H.Y. E ORR H.T. (1993) Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type I. *Nature Genetics* **5**: 254-258.
- CROZIER R.H. E CROZIER, Y.C. (1993) The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and the genome organization. *Genetics* **133**: 97-117.
- DESALLE R.; GIDDINGS L.V. E TEMPLETON A.R. (1986) Mitochondrial DNA variability in natural populations of Hawaiian *Drosophila*. I. Methods and levels of variability in *D. silvestris* and *D. heteroneura* populations. *Heredity* **56**: 75-85.
- DOWLING T.E.; MORITZ C.; PALMER J.D. E RIESEBERG L.H. (1996) Nucleic acids III: analysis of fragments and restriction sites. "In" *Molecular Systematics*. 2nd edition (eds. D.M. HILLIS; C. MORITZ E B.K. MABLE), pp. 249-320, Sinauer Associates, Massachusetts.
- EDWARDS A.; CIVITELLO A.; HAMMOND H.A. E CASKEY C.T. (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics* **49**: 746-756.

- EISEN J.A. (1999) Mechanistic basis for microsatellite instability. "In" *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds. D.B. GOLDSTEIN E C. SCHLÖTTERER), pp. 34-48, Oxford University Press, New York.
- ESTOUP A. E CORNUET J.-M. (1999) Microsatellite evolution: inferences from population data. "In" *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds. D.B. GOLDSTEIN E C. SCHLÖTTERER), pp. 49-65, Oxford University Press, New York.
- ESTOUP A.; SOLIGNAC M.; HARRY M. E CORNUET J.-M. (1993) Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Research* **21**: 1427-1431.
- ESTOUP A.; TAILLIEZ C.; CORNUET J.-M. E SOLIGNAC M. (1995a) Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Molecular Biology and Evolution* **12**: 1074-1084.
- ESTOUP A.; GARNERY L.; SOLIGNAC M. E CORNUET J.-M. (1995b) Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics* **140**: 679-695.
- ESTOUP A.; SOLIGNAC M.; CORNUET J.-M.; GOUDET J. E SCHOLL A. (1996) Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. *Molecular Ecology* **5**: 19-31.
- EXCOFFIER L.; SMOUSE P.E. 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.

- FRANCISCO F.O.; SILVESTRE D. E ARIAS M.C. (2001) Mitochondrial DNA characterization of five species of *Plebeia* (Apidae: Meliponini): RFLP and restriction maps. *Apidologie* **32**: 323-332.
- FRANCK P.; GARNERY L.; SOLIGNAC M. E 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. E CORNUET J.-M. (2000) Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Molecular Ecology* **9**: 907-921.
- FRANCK P.; GARNERY L.; LOISEAU A., OLDROYD B.P.; HEPBURN H.R.; SOLIGNAC M. E CORNUET J.-M. (2001) Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity* **86**: 420-430.
- FUTUYMA D.J. (1992) *Biologia Evolutiva*. 2a edição. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto.
- GARNERY L.; CORNUET J.-M. E SOLIGNAC M. (1992) Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology* **1**: 145-154.
- GOLDSTEIN D.B. E SCHLÖTTERER C. (1999) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, New York.
- GOUDET J.; RAYMOND M.; DE MEEÛS T. E ROUSSET F. (1996) Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* **144**: 1933-1940.
- GUO S.W. E THOMPSON E.A. (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* **48**: 361-372.

- GUPTA M.; CHYI Y.-S.; ROMERO-SEVERSON J. E OWEN J.L. (1994) Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* **89**: 998-1006.
- HAAVIE J.; SÆTRE G.-P. E MOUM T. (2000) Discrepancies in population differentiation at microsatellites, mitochondrial DNA and plumage colour in the pied flycatcher – inferring evolutionary processes. *Molecular Ecology* **9**: 1137-1148.
- HALDANE J.B.S. (1954) An exact test for randomness of mating. *Journal of Genetics* **52**: 631-635.
- HALL H.G. E SMITH D.R. (1991) Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **88**: 4248-4552.
- HANCOCK J.M. (1999) Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. “In” *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds. D.B. GOLDSTEIN E C. SCHLÖTTERER), pp. 1-9, Oxford University Press, New York.
- HARRIS H. (1966) Enzyme polymorphisms in man. *Proceedings of the Royal Society of London B* **164**: 298-310.
- HARRISON R.G. (1989) Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution* **4**: 6-11.
- HENDERSON S.T. E PETES T.D. (1992) Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **12**: 2749-2757.
- HUBBY J.L. E LEWONTIN R.C. (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **54**: 577-594.

- INFANTE M.E. E AZEREDO-ESPIN A.M.L. (1995) Genetic variability in mitochondrial DNA of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) from Brazil. *Biochemical Genetics* **33**: 237-256.
- KERR W.E.; CARVALHO G.A. E NASCIMENTO V.A. (1996) *Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação*. Fundação Acangauá, Belo Horizonte.
- KUMAR S.; TAMURA K.; JAKOBSEN I.B. E NEI M. (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics* **17**: 1244-1245.
- LEWONTIN R.C. E COCKERHAM C.C. (1959) The goodness-of-fit test for detecting natural selection in random mating populations. *Evolution* **13**: 561-564.
- LEWONTIN R.C. E HUBBY J.L. (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **54**: 595-609.
- LI C.C. (1988) Pseudo-random mating populations. In celebration of the 80th anniversary of the Hardy-Weinberg law. *Genetics* **119**: 731-737.
- LINN S. E ARBER W. (1968) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. *In vitro* restriction of phage fd replicative form. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **59**: 1300-1306.
- LITT M. E LUTY J.A. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* **44**: 397-401.
- LOBO J.A. (1995) Morphometric, isozymic and mitochondrial variability of Africanized honeybees in Costa Rica. *Heredity* **75**: 133-141.

- LYNCH M. E MILLIGAN B.G. (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**: 91-99.
- MATIOLI S.R. E PASSOS-BUENO M.R.S. (2001) Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. "In" *Biologia Molecular e Evolução* (ed. S.R. MATIOLI), pp. 153-161, Holos Editora, Ribeirão Preto.
- MCELROY D.; MORAN P.; BERMINGHAM E. E KORNFELD I. (1992) REAP: an integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data. *The Journal of Heredity* **83**: 157-158.
- MESELSON M. E YUAN R. (1968) DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* **217**: 1110-1114.
- MICHENER C.D. (1990) Classification of the Apidae (Hymenoptera). *The University of Kansas Science Bulletin* **54**: 75-164.
- MICHENER C.D. (2000) *The Bees of the World*. The John Hopkins University Press, Baltimore.
- MORITZ C. E HILLIS D.M. (1996) Molecular systematics: context and controversies. "In" *Molecular Systematics*. 2nd edition (eds. D.M. HILLIS; C. MORITZ E B.K. MABLE), pp. 1-13, Sinauer Associates, Massachusetts.
- MORITZ C.; DOWLING T.E. E BROWN W.M. (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 269-292.
- MORITZ R.F.A.; HAWKINS C.F.; CROZIER R.H. E MACKINLAY A.G. (1986) A mitochondrial DNA polymorphism in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Experientia* **42**: 322-324.

- 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. E 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.
- NEI M. E TAJIMA F. (1981) DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* **97**: 145-163.
- NEI M. E TAJIMA F. (1983) Maximum likelihood estimation of the number of nucleotide substitutions from restriction sites data. *Genetics* **105**: 207-217.
- NOGUEIRA-NETO P. (1970) *A criação de abelhas indígenas sem ferrão*. 2a edição. Editora Tecnapis, São Paulo.
- NOGUEIRA-NETO P. (1997) *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. Editora Nogueirapis, São Paulo.
- ORITA M.; IWAHANA H.; KANAZAWA H.; HAYASHI K. E SEKIYA T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as a single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **86**: 2766-2770.
- PAMILO P. E CROZIER R.H. (1981) Genic variation in male haploids under deterministic selection. *Genetics* **98**: 199-214.
- PAMILO P.; VEPSÄLÄINEN K. E ROSENGREN R. (1975) Low allozymic variability in *Formica* ants. *Hereditas* **80**: 293-296.

- PAMILO P.; VARVIO-AHO S.-L. E PEKKARINEN A. (1978) Low enzyme gene variability in Hymenoptera as a consequence of haplodiploidy. *Hereditas* **88**: 93-99.
- PAXTON R.J.; WEIßSCHUH N. E QUEZADA-EUÁN J.J.G. (1999a) Characterization of dinucleotide microsatellite loci for stingless bees. *Molecular Ecology* **8**: 690-692.
- PAXTON R.J.; WEIßSCHUH N.; ENGELS W.; HARTFELDER K. E QUEZADA-EUÁN J.J.G. (1999b) Not only single mating in stingless bees. *Naturwissenschaften* **86**: 143-146.
- PÉPIN L.; AMIGUES Y.; LÉPINGLE A.; BERTHIER J.-L.; BENSALD A. E VAIMAN D. (1995) Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. *Heredity* **74**: 53-61.
- PETERS J.M.; QUELLER D.C.; IMPERATRIZ-FONSECA V.L. E STRASSMANN J.E. (1998) Microsatellite loci for stingless bees. *Molecular Ecology* **7**: 784-787.
- PETERS J.M.; QUELLER D.C.; IMPERATRIZ-FONSECA V.L.; ROUBIK D.W. E STRASSMANN J.E. (1999) Mate number, kin selection and social conflicts in stingless bees and honeybees. *Proceedings of the Royal Society of London B* **266**: 379-384.
- PIETROMONACO S.F.; HESSLER R.A. E O'BRIEN T.W. (1986) Evolution of proteins in mammalian cytoplasmic and mitochondrial ribosomes. *Journal of Molecular Evolution* **24**: 110-117.
- POWELL J.R.; CACCONE A.; AMATO G.D. E YOON C. (1986) Rates of nucleotide substitution in *Drosophila* mitochondrial DNA and nuclear DNA are similar. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **83**: 9090-9093.
- QUELLER D.C. E GOODNIGHT K.F. (1989) Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* **43**: 258-275.

- RAYMOND M. E ROUSSET F. (1995a) An exact test for population differentiation. *Evolution* **49**: 1280-1283.
- RAYMOND M. E ROUSSET F. (1995b) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *The Journal of Heredity* **86**: 248-249.
- ROFF D.A. E BENTZEN P. (1989) The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: χ^2 and the problem of small samples. *Molecular Biology and Evolution* **6**: 539-545.
- ROSS K.G. (2001) Molecular ecology of social behaviour: analyses of breeding systems and genetic structure. *Molecular Ecology* **10**: 265-284.
- ROSS K.G.; KRIEGER M.J.B.; SHOEMAKER D.D.; VARGO E.L. E KELLER L. (1997) Hierarchical analysis of genetic structure in native fire ant populations: results from three classes of molecular markers. *Genetics* **147**: 643-655.
- ROUSSET F. E RAYMOND M.L. (1995) Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* **140**: 1413-1419.
- RUTTNER F. (1988) *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Springer-Verlag, Berlin.
- RZHETSKY A. E NEI M. (1992) A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. *Molecular Biology and Evolution* **9**: 945-967.
- SAIKI R.K.; SCHARF S.; FALOONA F.; MULLIS K.B.; HORN G.T.; ERLICH H.A. E ARNHEIM N. (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.

- SAIKI R.K.; GELFAND D.H.; STOFFEL S.; SCHARF S.J.; HIGUCHI R.; HORN G.T.; MULLIS K.B. E ERLICH H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- SAMBROOK J.; FRITSCH E.F. E MANIATIS T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- SCHLÖTTERER C. E WIEHE T. (1999) Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps. "In" *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds. D.B. GOLDSTEIN E C. SCHLÖTTERER), pp. 238-248, Oxford University Press, New York.
- SCHNEIDER S.; ROESSLI D. E EXCOFFIER L. (2000) Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- SCHUG M.D.; MACKAY T.F.C. E AQUADRO C.F. (1997) Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics* **15**: 99-102.
- SEDEROFF R.R. (1984) Structural variation in mitochondrial DNA. *Advances in Genetics* **22**: 1-108.
- SHEPPARD W.S. E MCPHERON B.A. (1991) Ribosomal DNA diversity in Apidae. "In" *Diversity in the Genus Apis* (ed. D.R. SMITH), pp. 89-102, Westview Press e IBH Pub., Oxford.
- SHEPPARD W.S.; RINDERER T.E.; MAZZOLI J.; STELZER J.A. E SHIMANUKI H. (1991a) Gene flow between African- and European-derived honey bee populations in Argentina. *Nature* **349**: 782-784.
- SHEPPARD W.S.; SOARES A.E.E.; DEJONG D. E SHIMANUKI H. (1991b) Hybrid status of populations near the historic origin of Africanization in Brazil. *Apidologie* **22**: 643-652.

- SHEPPARD W.S.; ARIAS M.C. E SHIMANUKI H. (1994) Determination of mitochondrial DNA haplotypes from sting remnants of the honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Bulletin of Entomological Research* **84**: 551-554.
- SIA E.A.; JINKS-ROBERTSON S. E PETES T.D. (1997) Genetic control of microsatellite stability. *Mutation Research* **383**: 61-70.
- SIHANUNTAVONG D.; SITTIPRANEED S. E KLINBUNGA S. (1999) Mitochondrial DNA diversity and population structure of the honey bee, *Apis cerana*, in Thailand. *Journal of Apicultural Research* **38**: 211-219.
- SIMON C.; FRATI F.; BECKNBACH A.; CRESPI B.; LIU H. E FLOOK P. (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* **87**: 651-701.
- SIMONSEN B.T.; SIEGISMUND H.R. E ARCTANDER P. (1998) Population structure of African buffalo inferred from mtDNA sequences and microsatellite loci: high variation but low differentiation. *Molecular Ecology* **7**: 225-237.
- SITTIPRANEED S.; LAOAROON S.; KLINBUNGA S. E WONGSIRI S. (2001) Genetic differentiation of the honey bee (*Apis cerana*) in Thailand: evidence from microsatellite polymorphism. *Journal of Apicultural Research* **40**: 9-16.
- SMITH G.P. (1976) Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science* **191**: 528-535.
- SMITH D.R. (1988) Mitochondrial DNA polymorphisms in five Old World subspecies of honey bees and in New World hybrids. "In" *Africanized Honey bees and Bee Mites* (eds. G.R. NEEDHAM; R.E. PAGE JR.; M. DELFINADO-BAKER E C.E. BOWMAN), pp. 303-312, Ellis-Horwood, Chichester, England.

- SMITH D.R. (1991) African bees in Americas: insight from biogeography and genetic. *Trends in Ecology and Evolution* **6**: 17-21.
- SOLFERINI V.N. E SELIVON D. (2001) Polimorfismos de isozimas. "In" *Biologia Molecular e Evolução* (ed. S.R. MATIOLI), pp. 137-142, Holos Editora, Ribeirão Preto.
- SOUTHERN E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**: 503-517.
- STRASSMANN J.E.; SOLÍS C.R.; PETERS J.M. E QUELLER D.C. (1996) Strategies for finding and using highly polymorphic DNA microsatellite loci for studies of genetic relatedness and pedigrees. "In" *Molecular Methods in Zoology and Evolution* (eds. J.D. FERRARIS E S.R. PALUMBI), pp. 163-178, 528-549, Wiley-Liss, New York.
- STREISINGER G.; OKADA Y.; EMRICH J.; NEWTON J.; TSUGITA A.; TERZAGHI E. E INOUE M. (1966) Frameshift mutations and the genetic code. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **31**: 77-84.
- SUNNUCKS P. (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* **15**: 199-203.
- SWOFFORD D.L. E 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.
- TAKEZAKI N. E NEI M. (1996) Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* **144**: 389-399.
- TAUTZ D. (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* **17**: 6463-6471.

- VAN BENTHEM F.D.J.; IMPERATRIZ-FONSECA V.L. E VELTHUIS H.H.W. (1995) Biology of the stingless bee *Plebeia remota* (Holmberg): observations and evolutionary implications. *Insectes Sociaux* **42**: 71-87.
- VELTHUIS H.H.W. (1997) *Biologia das Abelhas sem Ferrão*. Universidade de São Paulo e Universiteit Utrecht.
- VIARD F.; FRANCK P.; DUBOIS M.-P.; ESTOUP A. E JARNE P. (1998) Variation of microsatellite size homoplasy across electromorphs, loci, and populations in three invertebrate species. *Journal of Molecular Evolution* **47**: 42-51.
- VOS P.; HOGERS R.; BLEEKER M.; REIJANS M.; VAN DE LEE T.; HORNES M.; FRIJTERS A.; POT J.; PELEMAN J.; KUIPER M. E ZABEAU M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4407-4414.
- WALSH P.S.; METZGER D.A. E HIGUCHI R. (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* **10**: 506-513.
- WEBER J.L. (1990) Informativeness of human (dC-dA)_n·(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* **7**: 524-530.
- WEBER J.L. E MAY P.E. (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics* **44**: 388-396.
- WEBER J.L. E WONG C. (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* **2**: 1123-1128.
- WEINLICH R.; FRANCISCO F.O.; SILVESTRE D. E ARIAS M.C. (1999) Análise do genoma mitocondrial e caracterização de espécies do gênero *Melipona*. *Genetics and Molecular Biology (Supplement)* **22**: 184.

- WEIR B.S. (1996) Intraspecific differentiation. "In" *Molecular Systematics*. 2nd edition (eds. D.M. HILLIS; C. MORITZ E B.K. MABLE), pp. 385-405, Sinauer Associates, Massachusetts.
- WIDMER A. E SCHMID-HEMPEL P. (1999) The population genetic structure of a large temperate pollinator species, *Bombus pascuorum* (Scopoli) (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Ecology* **8**: 387-398.
- WIDMER A.; SCHMID-HEMPEL P.; ESTOUP A. E 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.
- WILLE A. (1979) Phylogeny and relationships among the genera and subgenera of the stingless bees (Meliponinae) of the world. *Revista de Biología Tropical* **27**: 241-277.
- WILLIAMS J.G.K.; KUBELIK A.R.; LIVAK K.J.; RAFALSKI J.A. E TINGEY S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**: 6531-6535.
- WOLSTENHOLME D.R. (1992) Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. "In" *Mitochondrial Genomes* (eds. D.R. WOLSTENHOLME E K.W. JEON), pp. 173-216, Academic Press, San Diego.
- WRIGHT S. (1943) Isolation by distance. *Genetics* **28**: 114-138.
- WRIGHT S. (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* **15**: 323-354.

IX. Apêndice



Tabela 38: Descrição dos genótipos encontrados por loco analisado e respectivo número de indivíduos a eles relacionados, distribuídos por sub-população. **N:** número total de indivíduos analisados (cinco indivíduos por colméia).

Loco	Genótipo	C (N = 45)	C-sp (N = 45)	P-sp (N = 30)	P (N = 145)
M33	AA	1			
	BB	44	45	30	145
M215	AA	21	16	30	95
	AB	20	25		38
	BB	4	4		12
M254	AA	45	45	30	145
M259	AA	9	1	2	2
	AB	9	15	15	45
	AC	15	9		
	AE	8			
	BB	3	6	4	53
	BD	1	9	9	45
	BF		5		
M278	AB	2	1		
	AC	6	6		
	BB	20	24	30	140
	BC	9	13		5
	BF	5			
	CC	1	1		
	DD	1			
	DE	1			
T3	AA	41	18	7	5
	AB	2	16	7	57
	BB		11	16	83
	<i>nd</i>	2			
T7	AA	45	45	30	145

nd: não diagnosticado.

Tabela 39: Descrição dos genótipos encontrados por loco analisado e respectivo número de indivíduos a eles relacionados, distribuídos por sub-população. **N:** número total de indivíduos analisados (um indivíduo por colméia).

Loco	Genótipo	C (N = 9)	C-sp (N = 9)	P-sp (N = 6)	P (N = 29)
M33	BB	9	9	6	29
M215	AA	5	3	6	21
	AB	3	5		6
	BB	1	1		2
M254	AA	9	9	6	29
M259	AB	3	3	3	9
	AC	3	2		
	AE	2			
	BB		1	1	15
	BD	1	2	2	5
	BF		1		
M278	AB		1		
	AC	1	1		
	BB	5	4	6	28
	BC		3		1
	BF	2			
	DD	1			
T3	AA	7	3	1	
	AB	1	5	1	14
	BB		1	4	13
	<i>nd</i>	1			
T7	AA	9	9	6	29

nd: não diagnosticado.

Tabela 40: Descrição dos genótipos encontrados por loco analisado e respectivo número de indivíduos a eles relacionados, distribuídos por população. **N:** número total de indivíduos analisados por localidade.

Loco	Genótipo	SP (N = 90)	PRp (N = 175)	PRc (N = 35)	SC (N = 60)
M33	AA	1		5	
	BB	89	175	30	20
M215	AA	37	124	6	16
	AB	45	39	23	41
	BB	8	12	6	3
M254	AA	90	175	35	60
M259	AA	10	4	13	
	AB	24	60	7	26
	AC	24			
	AE	8			
	BB	9	57	11	23
	BD	10	54	4	6
	BE				5
	BF	5			
M278	AB	3		9	
	AC	12			
	BB	44	170	26	60
	BC	22	5		
	BF	5			
	CC	2			
	DD	1			
	DE	1			
T3	AA	59	12	20	3
	AB	18	64	9	8
	BB	11	99	1	1
	<i>nd</i>	2		5	
T7	AA	90	175	35	60

nd: não diagnosticado.

Tabela 41: Número de alelos por loco em cada uma das quatro populações estudadas de *Plebeia remota*.

Loco	SP	PRp	PRc	SC
M33	2	1	2	1
M215	2	2	2	2
M254	1	1	1	1
M259	6	3	3	4
M278	6	2	2	1
T3	2	2	2	2
T7	1	1	1	1
Total	20	12	13	12

Tabela 42: Frequências alélicas, taxa de heterozigose observada (H_O), taxa de heterozigose esperada sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_E) e taxa de heterozigose não-tendenciosa (H_N) por loco e por localidade em populações de *Plebeia remota*. n : número de alelos amostrados por loco e população.

Loco	Alelo (pb)	SP	PRp	PRc	SC
M33		(n = 180)	(n = 350)	(n = 70)	(n = 120)
	A (135)	0,0111		0,1429	
	B (140)	0,9889	1,0000	0,8571	1,0000
H_O		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
H_E		0,0220	0,0000	0,2449	0,0000
H_N		0,0221	0,0000	0,2484	0,0000
M215		(n = 180)	(n = 350)	(n = 70)	(n = 120)
	*A (91)	0,6611	0,8200	0,5000	0,6083
	B (97)	0,3389	0,1800	0,5000	0,3917
H_O		0,5000	0,2229	0,6571	0,6833
H_E		0,4481	0,2952	0,5000	0,4765
H_N		0,4506	0,2960	0,5072	0,4805
M259		(n = 180)	(n = 350)	(n = 70)	(n = 120)
	A (185)	0,4222	0,1943	0,4714	0,2166
	*B (195)	0,3167	0,6514	0,4714	0,6917
	C (205)	0,1333			
	D (215)	0,0556	0,1543	0,0572	0,0500
	E (193)	0,0444			0,0417
	F (190)	0,0278			
H_O		0,7889	0,6514	0,3143	0,6167
H_E		0,6978	0,5141	0,5522	0,4704
H_N		0,7017	0,5156	0,5602	0,4744

Tabela 42: continuação.

Loco	Alelo (pb)	SP	PRp	PRc	SC
M278		(n = 180)	(n = 350)	(n = 70)	(n = 120)
	A (125)	0,0833		0,1286	
	*B (128)	0,6556	0,9857	0,8714	1,0000
	C (135)	0,2111	0,0143		
	D (138)	0,0166			
	E (140)	0,0056			
	F (120)	0,0278			
H_O		0,4778	0,0286	0,2571	0,0000
H_E		0,5177	0,0282	0,2241	0,0000
H_N		0,5205	0,0282	0,2273	0,0000
T3		(n = 176)	(n = 350)	(n = 60)	(n = 120)
	*A (96)	0,7727	0,2514	0,8167	0,6500
	B (98)	0,2273	0,7486	0,1833	0,3500
H_O		0,2045	0,3657	0,3000	0,5000
H_E		0,3512	0,3764	0,2994	0,4550
H_N		0,3532	0,3775	0,3045	0,4588

*: Alelos sequenciados.

Tabela 43: Resumo da informação genética para cada população de *Plebeia remota*. N : tamanho amostral médio; A : número médio de alelos por loco; PLP : porcentagem de locos polimórficos.

	SP	PRp	PRc	SC
N	89,7 (0,3)	175,0 (0,0)	34,3 (0,7)	60,0 (0,0)
A	2,9 (0,8)	1,7 (0,3)	1,9 (0,3)	1,7 (0,4)
PLP (95% de critério)	57,14	42,86	71,43	42,86
PLP (99% de critério)	71,43	57,14	71,43	42,86
H_O média	0,282 (0,118)	0,180 (0,095)	0,218 (0,092)	0,257 (0,123)
H_E média	0,291 (0,108)	0,173 (0,082)	0,260 (0,082)	0,200 (0,094)
H_N média	0,293 (0,108)	0,173 (0,082)	0,264 (0,083)	0,202 (0,095)

Valores entre parêntesis são erros padrão.

Tabela 44: Teste de probabilidade para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg nos locos e populações. **g.l.:** graus de liberdade.

	SP	PRp	PRc	SC	c ²	g.l.	P
M33	0,0056* (0,0000)	-	0,0000* (0,0000)	-	38,4	4	0,0000*
M215	0,3501 (0,0000)	0,0015* (0,0000)	0,0979 (0,0000)	0,0011* (0,0000)	33,4	8	0,0001*
M259	0,0000* (0,0000)	0,0000* (0,0000)	0,0009* (0,0000)	0,0514 (0,0000)	¥	8	0,0000*
M278	0,0000* (0,0000)	1,0000 (0,0000)	1,0000 (0,0000)	-	¥	6	0,0000*
T3	0,0002* (0,0000)	0,6901 (0,0000)	1,0000 (0,0000)	0,5746 (0,0000)	18,6	8	0,0172*
c²	¥	53,3	46,7	20,8			
g.l.	10	8	10	6			
P	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0020*			

Valores entre parêntesis são erros padrão;

-: Loco com apenas um alelo;

*: $P < 0,05$.

Tabela 45: Teste para verificar desvios (deficiência ou excesso) do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Deficiência	SP	PRp	PRc	SC
M33	0,0056* (0,0000)	-	0,0000* (0,0000)	-
M215	0,9021 (0,0000)	0,0003* (0,0000)	0,9840 (0,0000)	1,0000 (0,0000)
M259	0,9858 (0,0003)	1,0000 (0,0000)	0,0478* (0,0000)	1,0000 (0,0000)
M278	0,0206* (0,0004)	1,0000 (0,0000)	1,0000 (0,0000)	-
T3	0,0002* (0,0000)	0,4091 (0,0000)	0,6735 (0,0000)	0,8389 (0,0000)
Excesso	SP	PRp	PRc	SC
M33	1,0000 (0,0000)	-	1,0000 (0,0000)	-
M215	0,2088 (0,0000)	0,9997 (0,0000)	0,0736 (0,0000)	0,0008* (0,0000)
M259	0,0161* (0,0004)	0,0000* (0,0000)	0,9531 (0,0000)	0,0003* (0,0000)
M278	0,9796 (0,0003)	0,9715 (0,0000)	0,5559 (0,0000)	-
T3	1,0000 (0,0000)	0,7347 (0,0000)	0,7753 (0,0000)	0,3405 (0,0000)

Valores entre parêntesis são erros padrão;

-: Loco com apenas um alelo;

*: $P < 0,05$.

Visto que as populações não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, cálculos que agrupam todas elas em uma só população, não puderam ser realizados.

Tabela 46: Teste para verificar desequilíbrio de ligação entre os pares de locos nas populações.

Par de locos	SP	PRp	PRc	SC
M33 + M215	0,4994 (0,0003)	-	0,0000* (0,0000)	-
M33 + M259	1,0000 (0,0000)	-	0,1795 (0,0001)	-
M33 + M278	0,0224* (0,0002)	-	0,0004* (0,0000)	-
M215 + M259	0,0000* (0,0000)	0,4011 (0,0010)	0,0095* (0,0001)	0,3738 (0,0007)
M215 + M278	0,0024* (0,0001)	0,7149 (0,0003)	0,0024* (0,0000)	-
M215 + T3	0,0129* (0,0001)	0,0970 (0,0005)	0,3794 (0,0006)	0,1903 (0,0005)
M259 + M278	0,0000* (0,0000)	0,0485* (0,0002)	0,0106* (0,0001)	-
M259 + T3	0,0000* (0,0000)	0,0002* (0,0000)	0,0041* (0,0001)	0,6538 (0,0006)
M278 + T3	0,1664 (0,0008)	0,1232 (0,0002)	0,1364 (0,0003)	-

Valores entre parêntesis são erros padrão;

-: Loco com apenas um alelo;

*: $P < 0,05$.

Cálculos que agrupam todos os locos não puderam ser realizados devido ao fato de eles não estarem em equilíbrio de ligação.

Como já mencionado, o único cálculo de diferenciação populacional possível de ser realizado quando as populações e os locos não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg é o cálculo de diferenciação genotípica.

Tabela 47: Teste de diferenciação genotípica por loco para cada par de populações.

Loco	SP + PRp	SP + PRc	SP + SC	PRp + PRc	PRp + SC	PRc + SC
M33	0,3395 (0,0002)	0,0066* (0,0000)	1,0000 (0,0000)	0,0001* (0,0000)	-	0,0056* (0,0000)
M215	0,0001* (0,0000)	0,0122* (0,0001)	0,3248 (0,0005)	0,0000* (0,0000)	0,0000* (0,0000)	0,0850 (0,0002)
M259	0,0000* (0,0000)	0,0002* (0,0000)	0,0000* (0,0000)	0,0000* (0,0000)	0,0000* (0,0000)	0,0011* (0,0000)
M278	0,0000* (0,0000)	0,0000* (0,0000)	0,0000* (0,0000)	0,0000* (0,0000)	0,2415 (0,0002)	0,0001* (0,0000)
T3	0,0000* (0,0000)	0,6396 (0,0004)	0,0393* (0,0002)	0,0000* (0,0000)	0,0000* (0,0000)	0,0211* (0,0001)

Valores entre parêntesis são erros padrão;

-: Loco com apenas um alelo;

*: $P < 0,05$.

Tabela 48: Valores de distância genética entre os pares de populações de *Plebeia remota* de acordo com CAVALLI-SFORZA E EDWARDS (1967).

População	SP	PRp	PRc
PRp	0,235	-	
PRc	0,188	0,224	-
SC	0,199	0,134	0,160

