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

**Diversidade genética em agregações de *Nannotrigona*
testaceicornis Cockerell, 1922 (Hymenoptera,
Apidae, Meliponini) através de marcadores
microssatélites**

ALINE SIMONETI FONSECA

RIBEIRÃO PRETO - SP

2010

ALINE SIMONETI FONSECA

Diversidade genética em agregações de *Nannotrigona testaceicornis* Cockerell, 1922 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) através de marcadores microssatélites

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

ORIENTADOR: PROF. DR. ADEMILSON ESPENCER E. SOARES

RIBEIRÃO PRETO – SP

2010

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Fonseca, Aline Simoneti.

Diversidade genética em agregações de *Nannotrigona testaceicornis* Cockerell, 1922 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) através de marcadores microsatélites. Aline Simoneti Fonseca; orientador: Ademilson Espencer Egea Soares.

--Ribeirão Preto, 2010

x+86p

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

Orientador: Soares, Ademilson Espencer Egea

1. *Nannotrigona testaceicornis*; 2. Diversidade genética; 3. Agregação; 4. Múltiplos acasalamentos; 5. Microsatélites.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.” (Leonardo Da Vinci)

Aos meus pais e irmão...

AGRADECIMENTOS

- ✚ Ao Professor Dr. Ademilson Espencer Egea Soares, pela oportunidade e por confiar em minha capacidade para a realização deste trabalho.
- ✚ Ao Professor Elias Karam Jr., por ter dito as palavras certas no momento certo e feito com que eu acreditasse em mim novamente.
- ✚ Ao Professor Dr. Eddy José Francisco de Oliveira por ter me estendido a mão e me guiado através de seus conhecimentos. Agradeço à nossa amizade, nossos “papos” e risadas. A você Eddy, serei eternamente grata.
- ✚ À Dr^a. Geusa Simone de Freitas pela amizade, conselhos, ensinamentos e pela ótima companhia.
- ✚ À Professora Dr^a Eucleia Primo Betioli Contel, por permitir a utilização de seu laboratório para realização deste trabalho, pelas correções e pela paciência com a nossa “falação” no lab.
- ✚ À Elisabete Maria S. Barreto-Beira (Bete), pela ajuda técnica no laboratório, pelas nossas conversas e principalmente pela paciência em aturar o “karaokê” das meninas super-poderosas (Aline, Amanda e Camila).
- ✚ À Mônica e Mipsi, que talvez não tenham idéia do quanto fizeram por mim quando cheguei a Ribeirão Preto.
- ✚ Ao técnico Jairo de Souza, pela realização da maioria das coletas, pelas brincadeiras e aventuras na Kombi.
- ✚ Aos funcionários da secretaria, em especial a Susie, pelo auxílio nas questões burocráticas.
- ✚ À Maria do Carmo, pela paciência e consideração em parar seu trabalho diversas vezes e me ajudar na leitura dos géis. À Ana Lúcia sempre solícita em esclarecer minhas dúvidas e à Dr. Cláudia E. Wiesel que muito me auxiliou nas estatísticas, além de corrigir minha dissertação.
- ✚ À musical Rosana, pelas muitas risadas e sessões de terapia.
- ✚ Aos amigos, Ana Rita, Omar, Ivan Akatsu, Paulo Emílio, Mauro, Weyder e Ivan Castro, pela amizade e contribuições ao longo desses dois anos.
- ✚ Às grandes amigas Amanda e Camila, pela nossa amizade, nossas cantorias, por todos os momentos de diversão e pelos cuidados que tiveram comigo, meu muito obrigada.
- ✚ Aos amigos do taikô Yukio Yamashita, pelos nossos ótimos momentos de dor e descontração e por me apresentarem um mundo novo.

- ✚ A todos os demais amigos e colegas que contribuíram para esta realização, obrigada.
- ✚ Aos meus amigos que só puderam estar em espírito junto a mim, obrigada pelas inspirações e por me manterem no caminho certo.
- ✚ À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto BIOTA e a CAPES pela bolsa concedida.
- ✚ E por último, mas não menos importante, muito pelo contrário, agradeço a meus pais, Frank e Maria Helena, que são os responsáveis por quem sou que fizeram sacrifícios e abriram mão de muito para que eu tivesse todas as condições de realizar meus sonhos e chegar onde estou. Ao meu irmão Rafael, que apesar do “pavio curto” sempre me ajudou quando precisei, especialmente quando meus problemas eram referentes à informática. E por fim à Nina. Amo vocês!!!!

Valeu!!!!

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUÇÃO	1
I.1 AS ABELHAS	2
I.2 BIODIVERSIDADE	4
I.3 AGREGAÇÃO DE NINHOS.....	5
I.4 ACASALAMENTOS	7
I.5 <i>NANNOTRIGONA TESTACEICORNIS</i>	9
I.6 VARIABILIDADE GENÉTICA.....	10
I.7 MICROSSATÉLITES.....	11
II. OBJETIVOS.....	15
III. JUSTIFICATIVA.....	17
IV. MATERIAL E MÉTODOS	19
IV.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	20
IV.2 LIBERAÇÃO PARA COLETA DE AMOSTRAS.....	21
IV.3 EXTRAÇÃO DE DNA.....	21
IV.4 AMPLIFICAÇÃO POR PCR.....	22
IV.5 ANÁLISE DO PRODUTO AMPLIFICADO.....	23
IV.5.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E PROCEDIMENTOS.....	23
IV.5.2 COLORAÇÃO DOS GÉIS.....	25
IV.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
V. RESULTADOS.....	28
V.1 DISTRIBUIÇÃO ALÉLICA E GENOTÍPICA.....	29
V.2 DIVERSIDADE GENÉTICA NAS AGREGAÇÕES.....	40
V.3 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG.....	43
V.4 COEFICIENTE DE ENDOGAMIA (<i>F_{is}</i>).....	47
V.5 DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL.....	47
V.6 MÚLTIPLOS ACASALAMENTOS.....	51
VI. DISCUSSÃO.....	60
VI.1 VARIABILIDADE GENÉTICA.....	61
VI.2 MÚLTIPLOS ACASALAMENTOS.....	64

VII. CONCLUSÕES.....	69
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
IX. ANEXOS.....	84

FONSECA, A. S. **Diversidade genética em agregações de *Nannotrigona testaceicornis* Cockerell, 1922 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) através de marcadores microssatélites.** 2010. X+85p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

As abelhas são insetos da ordem Hymenoptera e taxonomicamente estão reunidas na superfamília Apoidea. Os Meliponini, da subfamília Apinae, são popularmente chamados abelhas indígenas sem ferrão e algumas espécies são essenciais para a polinização de plantas selvagens e lavouras. As abelhas *Nannotrigona testaceicornis*, utilizadas neste trabalho, são pequenas, possuem o tórax marrom escuro e opaco e não são agressivas. No Brasil, elas são encontradas na Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. Assim como muitas espécies de Hymenoptera, elas também podem nidificar em agregações e analisar a variabilidade genética dentro e entre os agregados foi um dos objetivos deste trabalho, além de avaliar os prováveis múltiplos acasalamentos que parecem ocorrer dentro dessa espécie de meliponíneos. Para tanto, foram coletados indivíduos de ninhos de *N. testaceicornis* no Campus da USP de Ribeirão Preto (SP), Campinas (SP), Bonfim Paulista (SP), Uberlândia (MG) e Caratinga (MG). 302 indivíduos (operárias) de um total de 32 ninhos foram macerados e tiveram seu DNA extraído. Foram utilizados oito *loci* microssatélites específicos para o estudo da variabilidade genética e múltiplos acasalamentos. Um total de 38 alelos foi observado. A diversidade genética média entre as agregações foi de 35,4%, a heterozigose média esperada foi de 41,4% e a observada foi de 28,3%. O coeficiente de endogamia (*Fis*) foi estatisticamente significativo para todas as agregações. Também foram observados desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os *loci* analisados. A análise do *Fst* mostrou diferenciação entre as agregações, porém, apesar da indicação pelo AMOVA de uma discreta estruturação entre as agregações, não foi possível agrupá-las. A partir dos dados obtidos foi possível observar que a diversidade genética nestas agregações está baixa, além disso, os desvios do equilíbrio, o valor significativo do *Fis*, e a heterozigose observada menor do que a esperada em todos os *loci* demonstrou a ocorrência de cruzamentos endogâmicos resultando em alto nível de homozigose nesta população. Com relação aos múltiplos acasalamentos, dos 32 ninhos estudados, somente 11 (34,4%) apresentaram uma patrilinea. A presença de alelos nulos, a inclusão acidental de machos na amostra, mudanças recentes de rainhas, operárias de outros ninhos e a contínua conexão entre ninho mãe-filho podem ser possibilidades para estes resultados, entretanto, a frequência de mais de uma patrilinea é muito alta para que a poliandria não seja considerada.

Palavras-chave: 1. *Nannotrigona testaceicornis*; 2. Diversidade genética; 3. Agregação; 4. Múltiplos acasalamentos; 5. Microssatélites.

FONSECA, A. S. **Genetic diversity in aggregations of *Nannotrigona testaceicornis* Cockerell, 1922 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by using microsatellites markers.** (2010). X+86p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

Bees are insects belonging to the Hymenoptera order and to the Apoidea superfamily. The Meliponini, from the subfamily Apinae, are popularly known as “stingless bees” and some species are essential to the pollination of wild and farming plants. *Nannotrigona testaceicornis*, studied in this work, are small bees presenting a dark brown and opaque thorax, and non-aggressive behavior. In Brazil, they are found at Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro and São Paulo states. As well as many other Hymenoptera species, they can nest on aggregations. To analyze the genetic variability within and among the aggregates was one of the objectives of this work, besides to evaluate the possibility of multiple matings which seem to occur in this species. For this purpose, samples of *N. testaceicornis* were collected from nests found at University of São Paulo Campus at Ribeirão Preto (SP), Campinas (SP), Bonfim Paulista (SP), Uberlândia (MG) and Caratinga (MG). Three hundred and two individuals (workers) from thirty-two sampled nests had their DNA extracted. Eight specific microsatellite loci were used to study the genetic variability and multiple matings. A total of thirty-eight alleles were observed. The mean genetic diversity among the aggregations was 35.4%, the mean expected heterozygosity was 41.4% and the observed was 28.3%. The inbreeding coefficient (*Fis*) was statistically significant for all the aggregations. Deviations from Hardy-Weinberg Equilibrium were observed in all studied loci. The *Fst* analysis showed differentiation among the aggregations but, despite the AMOVA indication of structuring among them, it was not possible to group them. From the obtained data we observed that the genetic diversity of the aggregations is low. The significant *Fis* value and the observed heterozygosity lower than the expected one in all the studied loci, demonstrated inbreeding events resulting in a high level of homozygosis in this population. In relation to the possibility of multiple mating, from the 32 studied nests, only 11 (34.4%) presented one patriline. The presence of null alleles, the accidental inclusion of males in the sample, recent queen changes, workers drifting among nests, continuing connections between mother and daughter nests or multiple matings might be possibilities for these results. However, the frequency of more than one patriline is very high to not consider the polyandry.

Key-words: 1. *Nannotrigona testaceicornis*. 2. Genetic diversity. 3. Aggregation. 4. Multiple mating. 5. Microsatellites

I. INTRODUÇÃO

I.1 AS ABELHAS

As abelhas são insetos da ordem Hymenoptera e taxonomicamente estão reunidas na família Apidae (Michener, 2007). São as principais visitantes florais e polinizadoras da maioria das plantas do mundo sendo responsáveis por 35% da produção global de alimentos. Dessa forma, desempenham um papel ecológico e econômico fundamental que torna este grupo muito importante (Biesmeijer, 2006, Klein *et al.*, 2007).

Elas se destacam por sua grande diversidade de comportamentos sociais e por suas múltiplas relações com plantas e animais. A imensa maioria das espécies de abelhas tem no néctar e no pólen das flores sua principal fonte de energia e proteínas, respectivamente, e seu hábito forrageiro tem importância fundamental na polinização da vegetação natural e das plantas cultivadas. Além disso, ainda fornecem produtos bastante valorizados pelo homem, como cera, própolis, geleia real e principalmente mel. São conhecidas mais de 20.000 espécies de abelhas, e a maioria destas espécies são solitárias (Nogueira-Neto, 1997; Grimaldi e Engel, 2005).

Os Meliponini, da subfamília Apinae (que inclui outras tribos como Euglossini, Bombini e Apini), são popularmente chamados abelhas indígenas sem ferrão (Michener, 2007). Em contraste à *Apis*, os meliponíneos geralmente têm ferrão atrofiado, fecundam somente uma vez, não usam água para refrigerar seus ninhos ou cera pura para construí-los, não podem enxamear livremente para reproduzir-se (devem primeiro formar uma nova colônia), e os machos alimentam-se nas flores, enquanto a rainha fisiogástrica não pode voar (Roubik, 2006).

Estas abelhas exibem uma distribuição pantropical e apresentam uma grande diversidade de espécies, incluindo espécies importantes de diversos ecossistemas brasileiros. Algumas espécies são essenciais para a polinização de grande parte da flora das florestas, outras plantas selvagens e lavouras (Roubik, 1989; Kerr *et al.*, 1996).

Suas colônias variam de poucas dúzias a 100.000 ou mais operárias. Assim, como a *Apis mellifera* (tribo Apini), elas vivem em colônias “permanentes” e apresentam castas compreendidas em operárias e rainhas (Michener, 2000). A maioria faz seus ninhos preferencialmente em ocos de árvores. Algumas espécies podem nidificar em cavidades no solo, em cupinzeiros ou formigueiros (abandonados ou ativos), em ninhos desativados de pássaros ou em paredes de casas. Outras constroem ninhos expostos ou semiexpostos em galhos de árvores ou fendas em rochas. Cada espécie tem uma estrutura peculiar na entrada do ninho, que a identifica. Geralmente a entrada do ninho, na maioria das espécies de meliponíneos, é composta por um tubo externo de cera pura ou cerume que pode variar da cor branca até preta. Algumas espécies constroem um pequeno tubo de resina, outras utilizam geoprópolis (mistura de barro e resina) e outras não apresentam estrutura diferenciada na abertura externa do ninho (Camargo, 1989). A densidade de ninhos de abelhas em uma área pode ser modificada por queimadas ou desmatamentos porque reduzem o número de locais disponíveis para nidificação. Outro fator que pode modificar a densidade de ninhos em um local é a maior oferta de locais para nidificação (Siqueira, 2007).

Embora o desempenho ecológico dos Meliponini como polinizadores seja muito importante, este grupo de abelhas é pouco estudado em relação aos Apini (abelhas produtoras de mel).

O centro de origem e as rotas de dispersão responsáveis pela distribuição geográfica e riqueza local de espécies permanecem controversos (Michener, 1979; Wille, 1983), assim como as relações filogenéticas dentro da tribo (Camargo e Pedro, 1992). Outros aspectos relacionados exclusivamente às espécies ou populações dentro dos meliponíneos incluindo eventos de especiação, migração, fluxo gênico mediados por machos e/ou fêmea, diversidade genética e endogamia, entre outros, estão apenas no início de serem compreendidos (Arias *et al.*, 2006).

I.2 BIODIVERSIDADE

A preservação da biodiversidade tem se tornado uma prioridade no mundo inteiro, já que é compreendido que existe uma rede contínua de interações, de modo que a perda de qualquer espécie pode levar subsequentemente a variações no *status* de outras espécies relacionadas com ela, até o ponto de prejudicar todo o complexo de relações existentes em um ecossistema ou vários ecossistemas adjacentes (Savard *et al.*, 2000; Sih *et al.*, 2000).

A conservação de espécies tornou-se um grande desafio, tendo em vista que causas fundamentais das extinções biológicas são consequências de atividades humanas como o desmatamento objetivando urbanização, agricultura e pecuária (o que leva à perda do habitat natural), além da caça e

pesca, entre outros (Sih *et al.*, 2000). Dessa forma, na medida em que as florestas são derrubadas, queimadas e substituídas por plantios ou áreas urbanas, espécies de abelhas (e de outros organismos) dependentes desses ambientes são localmente extintas ou confinadas a pequenos fragmentos, de onde podem eventualmente desaparecer por problemas de escassez de recursos, endogamia e redução populacional, ou pela competição ou predação por organismos invasores sem que antes pudessem ter sido estudadas, ou mesmo conhecidas como nidificando, e pertencentes ao ecossistema daquela região afetada (Pereira, 2006).

As inúmeras espécies de abelhas brasileiras sem ferrão estão sendo extintas em proporções muito elevadas. Das matas de São Paulo, Minas Gerais e Paraná sobraram apenas 8%. Nestes 8% restantes, vários meleiros encontram a colônia de abelhas, derrubam a árvore e retiram o mel, jogando a cria no chão, que é devorada pelas formigas (Kerr *et al.*, 1996).

I.3 AGREGAÇÃO DE NINHOS

Muitas espécies de Hymenoptera são encontradas em agregações (grupo de ninhos próximos, mas não relacionados entre si) (Figura 1) e a distribuição espacial destes ninhos pode ser influenciada por um número de fatores bióticos e abióticos (Potts e Willmer, 1998). Oldroyd *et al.* (1995) levantaram algumas hipóteses para explicar esse fenômeno em *Apis mellifera* como podendo ser o resultado da preferência dos enxames para viajar a curtas distâncias do seu ninho original; uma consequência de um desequilíbrio

ambiental; aumento na defesa do ninho; melhora na eficiência dos acasalamentos.

Diferentemente das abelhas *Apis* que saem de suas colônias de uma vez e não retornam mais, a enxameação entre os meliponíneos é demorada, com uma alta dependência entre a colônia-filha em relação à colônia-mãe. Durante muitos dias, as abelhas sem ferrão abastecem o novo ninho com alimentos e materiais de construção vindos da colônia-mãe (Nogueira-Neto, 1997).

Figura 1: A e B - Área da agregação OFI (a parte cinza da parede apresenta ninhos de diferentes espécies incluindo vários de *N. testaceicornis*).

Em algumas espécies de meliponíneos como a *Trigona collina*, as colônias apresentam uma distribuição espacial altamente agregada (Yoshikawa

et al., 1969; Roubik, 1989; Eltz *et al.*, 2002, 2003). A distribuição espacial desses agregados poderia ser atribuída ao sistema de enxameação reprodutiva na qual a colônia-filha é abastecida pela mãe, dessa forma, limitando a distância que estes enxames poderiam se mover em relação ao ninho-mãe (Inoue *et al.*, 1984; Wille, 1983).

I.4 ACASALAMENTOS

De acordo com estudos genéticos um único acasalamento parece ser a regra geral entre os meliponíneos (Peters *et al.*, 1999), porém, observações (Imperatriz-Fonseca *et al.*, 1998) e outros estudos genéticos tiveram ocasionais rainhas poliândricas (Brito, 2005; Falcão e Contel, 1991; Paxton *et al.*, 1999, 2000, 2003; Peters *et al.*, 1999), indicando que múltiplos acasalamentos em rainhas de abelhas sem ferrão ocorrem naturalmente, e que está distribuído entre os meliponíneos (Paxton *et al.*, 1999).

Intensivos e extensivos trabalhos têm avaliado os múltiplos acasalamentos em rainhas de insetos sociais em um esforço para encontrar explicações para esta questão. Um grande número de hipóteses, muitas vezes complexas, têm sido propostas, a maioria delas no que se refere aos potenciais benefícios para a rainha, que surgem do aumento da diversidade genética intracolônia resultante de múltiplos pais dividindo a paternidade da prole da rainha (Crozier e Fjerdingstad, 2001).

Fêmeas que realizam múltiplos acasalamentos obtêm a quantidade de esperma necessária, não gasta energia para evitar machos, reduz dificuldade em identificar o melhor macho; diminui as questões de compatibilidade

genética, reduz as dificuldades de acesso ao melhor macho possível; apresenta vantagens na diversidade genética (Strassmann, 2001), além de uma adaptação para reduzir a carga genética causada pela produção de machos diplóides (Ratnieks, 1990).

O dogma de um único acasalamento por rainha de abelhas sem ferrão tem sido baseado em três evidências equivocadas: relação entre a quantidade de esperma na spermateca da rainha e nos indivíduos machos; análise de segregação nas operárias (baseados em marcadores de aloenzimas com baixa variabilidade) e a existência de um “plug” de acasalamento deixado pelo macho dentro da genitália da rainha após a cópula (Kerr *et al.*, 1962; Kerr, 1969; Camargo, 1972; Da Silva *et al.*, 1972; Contel e Mestriner, 1974; Contel e Kerr, 1976; Machado *et al.*, 1984 apud Paxton *et al.*, 1999).

Por outro lado, favorecendo o baixo número de acasalamentos, é possível observar para quase todas as fêmeas de insetos sociais uma estreita janela de tempo para o acasalamento, falta de habilidade dos machos para assediar as fêmeas (que deve mover seu ferrão para o lado no acasalamento na maioria das espécies), e a falta de cuidado paterno (Strassmann, 2001).

O fato é que conclusões sobre ocorrências esperadas e observadas de um único e de múltiplos acasalamentos de fêmeas de himenópteros solitários e eussociais são altamente variadas (Page, 1986) e certamente mais estudos são necessários.

I.5 *Nannotrigona testaceicornis*

As *Nannotrigona testaceicornis* (Figura 2) são abelhas pequenas, possuem o tórax marrom escuro e opaco e não são agressivas. Seus ninhos estão localizados em cavidades de paredes e muros de pedra, em troncos e tubulações. A entrada do ninho é formada por um tubo curto de cerume marrom claro ou escuro. Geralmente ficam algumas abelhas de sentinela em torno do tubo e à aproximação de algum suposto agressor ou invasor, elas se escondem dentro do ninho. O tubo é fechado durante a noite com a construção de uma rede de cerume, que é desfeita ao amanhecer (Freitas, 2004). As colônias podem ter de 2000 a 3000 abelhas (Lindauer e Kerr, 1960).

Figura 2: *Nannotrigona testaceicornis* – A - tubo de entrada do ninho em uma parede; B, C e D - tubo de entrada do ninho com as abelhas “guardas”.

Gonçalves *et al.* (2005) constataram em estudos realizados com o mel de *N. testaceicornis* uma alta atividade antimicrobiana demonstrando o excelente potencial terapêutico deste produto natural.

No Brasil as *Nannotrigona testaceicornis* são encontradas na Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (Silveira *et al.*, 2002), mas também já foram observadas no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Mendes, 2007)

Freitas (2001) realizou um levantamento no campus da USP em Ribeirão Preto, onde localizou 566 ninhos, distribuídos em 13 gêneros e 19 espécies. Este levantamento é executado continuamente e conta atualmente com 1.101 ninhos identificados e mapeados. Atualmente, no campus da USP de Ribeirão Preto estão mapeados aproximadamente 100 ninhos de *Nannotrigona testaceicornis*, sendo que 30% destes encontram-se mortos.

I.6 VARIABILIDADE GENÉTICA

Entre as características genéticas de uma espécie, a variabilidade genética é tida como uma propriedade intrínseca fundamental, responsável pela manutenção da espécie a longo prazo. Ela é essencial para o potencial de sobrevivência dos organismos e para o sucesso na resposta a mudanças ambientais, sendo composta por três componentes principais: a) a diversidade genética, isto é, a quantidade de variação genética que possui a espécie; b) a diferenciação genética, definida como a distribuição da variação genética entre populações e c) a distância genética, que pode ser definida como a quantidade de variação genética que existe entre pares de populações (Lowe *et al.*, 2004).

Os fatores que afetam a diversidade e a diferenciação genética estão relacionados às características dos organismos e seu habitat, e incluem o tamanho da população, o fluxo gênico, a deriva genética, o sistema reprodutivo e a seleção natural (Lacadena, 1988).

I.6.1 MICROSSATÉLITES

O sucesso do manejo ou conservação de uma espécie depende do conhecimento da quantidade de variação genética presente, que pode ser obtido por meio de marcadores genéticos.

Um marcador genético pode ser qualquer sítio no genoma onde existe variação na sequência de DNA, que é detectável como diferença entre indivíduos de uma população. Se a diferença é rara ela é chamada de mutação; se é comum, é chamada de polimorfismo (Alberts *et al.*, 1997).

Os microssatélites são uma classe de polimorfismos. Eles são repetições em tandem de sequências com não mais do que seis nucleotídeos (Hancock, 2000). São encontrados em maior ou menor abundância no genoma de todos os organismos conhecidos (Chambers, 2000). Estão distribuídos pela região eucromática do genoma (Schlötterer e Wiehe, 1999), mas são raros em regiões codificadoras (Hancock, 1999).

Os *loci* de microssatélites são considerados codominantes, seletivamente neutros, altamente polimórficos e apresentam herança Mendeliana (Strassmann *et al.*, 1996). Marcadores microssatélites, com altos níveis de polimorfismos, podem ser usados na determinação de parentesco entre colônias, estimando níveis de endocruzamento e avaliando a estrutura da

população além da investigação de aspectos não estudados da sociobiologia das espécies de abelhas (Green *et al.*, 2001). Eles têm sido utilizados também para avaliar o impacto do comportamento reprodutivo, estrutura social e dispersão em populações de risco (Beaumont e Bruford, 1999).

No nível populacional, o alto grau de polimorfismos de microssatélites é considerado uma consequência de novas mutações, deriva genética e seleção em genes ligados às sequências repetitivas (Schlötterer and Wiehe, 1999).

Os microssatélites podem ser organizados em quatro classes (Goldstein e Schlötterer, 1999): 1. Microssatélites Perfeitos: sequência de bases repetidas sem nenhuma interrupção (GTGTGTGTGTGTGTGT); 2. Microssatélites imperfeitos: são interrompidos pela adição ou substituição de um ou mais nucleotídeos dentro do arranjo do microssatélite (GTGTGTGTGTAGTGTGT); 3. Microssatélites interrompidos: um pequeno número de bases está inserido e não se encaixa na estrutura repetitiva (GTGTGTGTAAAAGTGT); 4. Microssatélites compostos: dois ou mais microssatélites adjacentes com diferentes sequências repetitivas (GTGTGTGTACGACGACGACGACG).

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

Dois modelos para o processo mutacional dos *loci* microssatélites têm sido aplicados: o modelo de alelo infinito, chamado de IAM (*Infinite Allele Model*, Kimura e Crow, 1964), e o modelo Stepwise (SMM, *Stepwise Mutation Model*, Kimura e Ohta, 1978). O modelo IAM, considera que mutações nas sequências de microssatélites resultariam em perda ou ganho de uma ou mais

unidades de repetição, sempre gerando um estado alélico não encontrado anteriormente na população. O modelo SMM é o mais aceito para microssatélites e admite que a mutação em alelos resulte na perda ou ganho de uma única unidade de repetição, e os alelos poderiam variar através de estados anteriormente presentes na população.

Loci de microssatélites têm sido isolados de poucas espécies de meliponíneos. Oliveira *et al.* (2009) desenvolveram 15 marcadores microssatélites específicos para a abelha *N. testaceicornis*. A amplificação de cinco dos 15 microssatélites de *N. testaceicornis* foi testada em quatro outras espécies de abelhas sem ferrão. O número médio de alelos por *loci* nas quatro espécies variou de 3,0 a 4,2. Francisco *et al.* (2006) em um trabalho utilizando *primers* heterólogos de abelhas sem ferrão detectou um baixo número de polimorfismos quando comparado a polimorfismos detectados em organismos no qual foram utilizados *primers* homólogos.

A fixação de alelos nulos é o principal responsável pela maioria das falhas nas amplificações de *primers* heterólogos (Chambers, 2000; Callen *et al.*, 1993; Francisco, 2002). Quando ocorre a substituição de um único (ou múltiplos) nucleotídeos, inserções ou deleções nas regiões flanqueadoras do microssatélite, o *primer* não pode se ligar ao marcador. Esse processo resulta em alelos nulos, que podem tornar-se fixos na população. 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. Portanto,

o uso de *primers* interespecíficos também está envolvido na perda de polimorfismos (Pépin *et al.*, 1995).

Ainda assim, os microssatélites podem e devem ser usados como uma valiosa ferramenta para caracterizar níveis e distribuição da diversidade genética, estrutura populacional, congregação de machos e agregação de ninhinhos (Oliveira *et al.*, 2009).

II. OBJETIVOS

II.1 OBJETIVO GERAL

-Avaliar a estrutura genética das agregações de ninhos de *Nannotrigona testaceicornis*.

II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar diversidade genética nas agregações;
- Avaliar fluxo gênico para compreender a dinâmica de nidificação e distribuição de *N. testaceicornis*;
- Avaliar o sistema de cruzamento (índice de endogamia);
- Avaliar o sistema de acasalamento para esta espécie de abelha indígena.

III. JUSTIFICATIVA

Os meliponíneos são de extrema importância no meio ambiente como agentes polinizadores tanto da flora nativa como dos cultivares. Seus representantes vêm sofrendo com a degradação das matas, principal habitat das abelhas sem ferrão. A extinção de representantes deste grupo de insetos pode levar à diminuição da biodiversidade vegetal afetando desta forma a biodiversidade animal.

A abelha *Nannotrigona testaceicornis* foi escolhida por apresentar um comportamento de formação de agregados que será importante para avaliar a nidificação e distribuição da diversidade genética destes polinizadores.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

IV.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram coletados 302 indivíduos de 32 ninhos distribuídos entre seis agregações de *Nannotrigona testaceicornis* (Tabela 1) sendo duas no Campus da USP de Ribeirão Preto (SP), uma em Campinas (SP), seis em Bonfim Paulista (SP), seis em Uberlândia (MG) e cinco em Caratinga (MG) (Figura 3). A distância entre os ninhos de cada agregado não ultrapassou cinco metros.

Tabela 1- Local de coleta da agregação, abreviação utilizada e número das amostras coletadas.

Agregação	Abreviação	Nº das amostras
1-Rua Sul 1 – USP-RP	SUL	40;60;83;115
2-Oficina – USP-RP	OFI	29;41;45;46;47;48;56;57;59
3- Campinas	CAM	171;172
4-Uberlândia	UBE	256;257;258;259;260;261
5-Bonfim Paulista	BOM	276;277;278;279;280;281
6- Caratinga	CAR	315;316;317;318;319

Figura 3- Localização dos locais de coleta das agregações de acordo com a Tabela 1.

IV.2 LIBERAÇÃO PARA COLETA DE AMOSTRAS

Todas as coletas foram autorizadas pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, do Ministério do Meio Ambiente, em nome do Professor Dr. Ademilson Espencer Egea Soares, do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

IV.3 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo de Higuchi (1989) modificado (procedimento de extração por proteinase K). Dez indivíduos (operárias) de cada um dos 32 ninhos foram macerados (toda a abelha foi utilizada, com exceção das asas que foram separadas para futuras análises morfométricas) em 300 µl de tampão de lise II (Tabela 2) e então 5 µl de proteinase K (10 mg/ml em água) foram adicionados. A mistura foi homogeneizada e incubada a 65°C por uma hora. Então, a proteinase K foi inativada a 94°C por 10 minutos e o DNA foi armazenado a -20°C.

Tabela 2- Protocolo de preparação de lise II

**tampão de lise II	Volume(1l)
Tris/HCl 0,01M pH 8,3	20 ml
KCl 50 mM	25 ml
MgCl ₂ 2,5 mM	2,5 ml
NP-40 0,45%	10 ml
TWEEN-20 0,45%	10 ml
# completar o volume com H ₂ O Mili-Q	

IV.4 AMPLIFICAÇÕES POR PCR

Foram utilizados oito pares de marcadores (*primers*) microssatélites de *Nannotrigona testaceicornis* (Tabela 3), para este estudo.

Tabela 3 – *Loci* microssatélites e marcadores utilizados para o estudo de *Nannotrigona testaceicornis*.

Locus	Repetição	Sequência (5'→3')	T. (°C)	Tamanho (bp)	Referência
Ntes 02	(GCGTGT)3(GT)5	F: AAGACAGCCAGGTGTTGTAA R: TACTTTCCGCGTAAGTGCT	57	164 (162–172)	Oliveira <i>et al.</i> 2009
Ntes 34	(GA)17	F: TGCCCCGGCAGTAAGTATAA R: TGCCCTCTAACTATCGGTCTTT	57	227 (221–229)	Oliveira <i>et al.</i> 2009
Ntes 37	(GT)12	F: TTGGAGTGCTTTTTCTTTCA R: CGTCGTATATCTCCCCATTT	56	165 (165–175)	Oliveira <i>et al.</i> 2009
Ntes 41	(GT)13	F: AGGCGTGAAAGGGACCCAGAG R: CCACGCAGAGGATCCACCCC	54	189 (181–195)	Oliveira <i>et al.</i> 2009
Ntes 50	(AG)50	F: TAAGCGTCGTGTGATCTCTG R: AACGCTCGTCGAATTCTC	52	179 (173–185)	Oliveira <i>et al.</i> 2009
Ntes 59	(AG)17	F: ATTCGTCAAAGTGAAAGCAC R: GAACTTGTTCCGTCATCTCTT	53	207 (201–231)	Oliveira <i>et al.</i> 2009
Ntes 70	(GT)13	F: CCATTGTAAGGAGCAATATC R: ATGTTATTACGTTTCGAGAG	53	232 (232–146)	Oliveira <i>et al.</i> 2009
Ntes 73	(GT)12	F: CAATAACAGTGACGCACACG R: GGCTCCCAAGCTAGTTTTTA	54	186 (184–196)	Oliveira <i>et al.</i> 2009

T – temperatura de hibridação dos *primers*

As amplificações por PCR foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo: 2,5 µl de tampão 10X, 0,8 µl de MgCl₂ 25mM, 1,25 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada primer, 1U de *Taq* DNA (EasyPath) e 1 µl de DNA.genômico. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador *Eppendorf Mastercycler* sob as seguintes condições: 94°C por 2 minutos

(desnaturação), seguidos de 32 ciclos de 94°C por um minuto, temperatura de hibridação específica determinada para cada *primer* (Tabela 3) por um minuto e 72°C por um minuto. A extensão final de 72°C por 30 minutos completou a polimerização.

Após o término da amplificação o produto da reação de PCR foi guardado em geladeira (4°C) até sua análise por eletroforese.

IV.5 ANÁLISE DO PRODUTO AMPLIFICADO

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em géis de poliacrilamida desnaturante 12% (ureia), seguida por coloração com nitrato de prata.

IV.5.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E PROCEDIMENTO

TEMED: N,N,N',N', tetrametiletilenodiamina (*Pharmacia Biotech*).

Formamida: 75%.

Solução de acrilamida/bis-acrilamida (29:1): 29 g de acrilamida; 1 g de bis-acrilamida diluídas em 100 ml de água desionizada.

Solução de EDTA pH 8,0: 186 g de EDTA; 1l de H₂O. Acertar o pH com pastilhas de hidróxido de sódio (NaOH).

Solução de persulfato de potássio: 650 mg de persulfato de potássio; 6,5 ml de H₂O.

Tampão TBE 10X (0,9M) pH 8,0: 108 g de Tris (PM=121,1); 53 g de ácido bórico; 40 ml de solução de EDTA; H₂O qsq 1l.

Tampão TBE cubas (1X): 100 ml de tampão TBE 10X; 900 ml de H₂O.

Tampão de amostra (*loading buffer*): 900 µl bromofenol; 900 µl de xilenocianol; 900 µl de TBE; 4,5 ml de Ficoll 30% diluído em água destilada; 1,8 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0; 3,6 g de sacarose. Misturar tudo até a dissolução completa da sacarose.

Tampão de amostra desnaturante: 300 µl de tampão de amostra; 900 µl de formamida.

Gel desnaturante 12%: 8 ml de solução de bis-acrilamida; 9,6 g de ureia, 2,0 ml de TBE (10X); 15 µl de TEMED; 300 µl de persulfato de potássio. Completar a solução com água destilada para 20 ml.

Para a montagem do gel desnaturante, a ureia foi dissolvida com a solução de bis-acrilamida em banho-maria a 50°C. Após a dissolução da ureia, foi adicionado o TBE e a água e seguido ao resfriamento foi acrescentado o TEMED e o persulfato de potássio. A solução foi homogeneizada e rapidamente vertida no jogo de placas (previamente montada) com o cuidado para a não formação de bolhas. O jogo de placas para corrida eletroforética é formado por duas placas de vidro separadas por espaçadores de *teflon* (1mm) e presas com grampos. O tamanho das placas utilizadas foi de 17 cm x 15 cm. Logo após a mistura ser vertida entre as placas, um pente foi colocado na borda superior formando poços no gel, onde posteriormente foram aplicadas as amostras de DNA amplificado. Aguardou-se a polimerização por cerca de 20 minutos.

Após a polimerização do gel o pente foi retirado e os poços foram lavados com água. O gel foi então montado em cuba vertical contendo tampão TBE, em ambos os polos (porção superior e inferior). Esta cuba foi conectada a

uma fonte *Amersham Pharmacia Biotech* (EPS 1001) ajustada a uma corrente constante de 15 mA por gel. O tempo de corrida foi de 4h30min para os *loci* Ntes02, Ntes37 e Ntes70 e de 5h30min para os demais.

Para corrida em gel desnaturante, os produtos de PCR devem ser desnaturados na presença do tampão de amostra desnaturante. Para tanto, foram utilizados 3 µl de produto amplificado e 5 µl de tampão. A mistura foi aquecida a 94°C por 10 minutos e colocada imediatamente em banho de gelo, seguindo-se a aplicação no gel.

Com o término da corrida eletroforética, o gel foi retirado cuidadosamente das placas de vidro e submetido aos processos de coloração.

IV.5.2 COLORAÇÃO DOS GÉIS

IV.5.3 REAGENTES, SOLUÇÕES E PROCEDIMENTO

Solução de nitrato de prata: 10 g de nitrato de prata; 100 ml de H₂O. Dissolver a prata em uma parte de água e depois completar com o restante, manter a solução ao abrigo da luz (volume final 100 ml).

Solução fixadora: 160 ml etanol (PA); 7 ml de ácido acético glacial (PA); 833 ml de H₂O (volume final 1l).

Solução reveladora: 22,5 g de NaOH; 1 l de H₂O. Dissolver em um agitador o hidróxido de sódio em uma parte de água e depois completar com o restante (volume final 1 l).

A coloração do gel foi feita de acordo com protocolo adaptado de Sanguinetti *et al.* (1994):

Fixação: após a retirada das placas de vidro e dos espaçadores o gel foi colocado em um recipiente de vidro contendo 100 ml de solução fixadora. Adicionou-se 1,5 ml de solução de nitrato de prata, e agitou-se por 5 minutos. A solução foi então descartada e o gel lavado rapidamente em água quente, agitando levemente e, ao final, descartada a água.

Revelação: a 100 ml de solução reveladora (aquecida) foram acrescentados 750 µl de formaldeído e a mistura foi despejada cuidadosamente no recipiente contendo o gel, que foi submetido à agitação por alguns minutos até que as bandas aparecessem nitidamente.

Bloqueio da reação: após o aparecimento das bandas no gel, a solução reveladora foi descartada e a reação foi bloqueada com uma lavagem direta do gel em 100 ml de solução fixadora.

Secagem do gel: Para a realização da leitura e armazenagem, todos os géis passaram por um processo simples de secagem. Duas folhas de papel celofane foram molhadas; uma placa de vidro com uma área maior que a do gel foi coberta com uma das folhas; o gel foi colocado sobre a placa com o celofane procurando não deixar bolhas; o gel foi então bem molhado e coberto com a outra folha de celofane, também com o cuidado de não fazer bolhas. Este gel foi deixado secando à temperatura ambiente por dois ou três dias até a secagem completa, sendo então devidamente identificado e armazenado.

Todos os alelos encontrados foram comparados entre si e, após uma leitura prévia, amostras que a princípio pareciam conter o mesmo alelo foram

comparadas lado a lado em outro gel para confirmação até todos os possíveis alelos estarem contidos em um único gel formando uma “escada alélica”.

IV.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas para estimativa das frequências alélicas e genotípicas, aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e teste U (verificar excesso ou deficiência de heterozigotos) foram feitas pelo programa GENEPOP, versão 3.0 (Raymond e Rousset, 1995). O programa *Genetic Data Analysis Package GDA* (Lewis e Zaykin, 1997) foi utilizado para estimar a heterozigose, os alelos exclusivos e a estatística *F*. A diversidade gênica foi calculada pelo programa FSTAT, versão 2.9.3 (Goudet, 2001). A estrutura populacional foi avaliada através da análise de variância molecular (AMOVA), software Arlequin, versão 3.1 (EXCOFFIER *et al.*, 2007).

A análise do número de possíveis acasalamentos das rainhas de *N. testaceicornis* foi realizada com o programa MateSoft (www.zi.ku.dk/poepcol/personal/JRPederson/MateSoft.htm) e a relação de parentesco pelo software Mark – Genetic Marker Analysis Program, versão 2.1 (estimador Ritland, 1996).

V.RESULTADOS

V.1. DISTRIBUIÇÃO ALÉLICA E GENOTÍPICA

Os níveis de diversidade genética de 302 indivíduos de abelhas *N. testaceicornis* distribuídas em 32 ninhos de seis agregações foram estimados por meio de oito marcadores microsatélites.

O número total de alelos foi de 38, considerando as seis agregações, variando entre um (1) e onze (11). Apenas o *locus* Ntes02 apresentou somente um alelo e o *locus* que apresentou o maior número de alelos foi Ntes50 (11) (tabela 4). A agregação de Caratinga apresentou 30 dos 38 alelos observados no geral e as demais agregações variaram entre 15 e 22 alelos (Gráficos 1 a 7). O baixo número de alelos na agregação CAM pode ser explicado pelo baixo número de indivíduos amostrados (17). A tabela 4 mostra as taxas de heterozigose observada (H_o) e esperada (H_e) sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg por *locus* e por agregação.

Tabela 4 – Número de alelos por agregação e *locus* (A). Heterozigose esperada (He) e observada (Ho) por agregação e *locus*.

Locus		SUL	OFI	CAM	UBE	BON	CAR	Valor médio (H)/total alelos
Ntes02	A	1	1	1	1	1	1	1
	He	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Ho	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ntes34	A	3	3	2	3	5	5	6
	He	0,561	0,500	0,514	0,402	0,789	0,595	0,637
	Ho	0,000	0,108	0,000	0,113	0,333	0,340	0,165
Ntes37	A	1	1	1	1	2	2	2
	He	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,323	0,068
	Ho	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,400	0,071
Ntes41	A	2	2	3	4	3	3	4
	He	0,479	0,467	0,684	0,725	0,666	0,458	0,663
	Ho	0,000	0,381	0,667	0,562	0,490	0,510	0,446
Ntes50	A	4	5	3	4	3	8	11
	He	0,686	0,783	0,558	0,682	0,732	0,854	0,811
	Ho	0,428	0,655	0,765	0,692	0,873	0,960	0,733
Ntes59	A	4	6	2	4	5	5	8
	He	0,596	0,767	0,355	0,651	0,745	0,545	0,776
	Ho	0,686	0,534	0,444	0,811	0,904	0,700	0,689
Ntes70	A	1	1	1	1	1	3	3
	He	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,478	0,118
	Ho	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,360	0,070
Ntes73	A	1	3	2	1	2	3	3
	He	0,040	0,414	0,500	0,000	0,164	0,220	0,237
	Ho	0,040	0,063	0,000	0,000	0,178	0,200	0,096
Total	A	17	22	15	19	22	30	38
Valor	He	0,295	0,366	0,326	0,307	0,389	0,435	0,414
Médio	Ho	0,144	0,218	0,234	0,272	0,349	0,434	0,283

Gráfico 1: Número de alelos por marcador na agregação SUL

Gráfico 2: Número de alelos por marcador na agregação OFI.

Gráfico 3: Número de alelos por marcador na agregação CAM

Gráfico 4: Número de alelos por marcador na agregação UBE.

Gráfico 5: Número de alelos por marcador na agregação BON.

Gráfico 6: Número de alelos por marcador na agregação CAR.

Gráfico 7: O número total de alelos por marcador considerando todas as agregações como uma única população.

Dentre as seis agregações estudadas, somente as de Campinas e Uberlândia não apresentaram alelos exclusivos. Estes alelos estão presentes nos *loci* Ntes34, Ntes50 (maior frequência) e Ntes70, tendo a agregação de Caratinga o maior número de alelos exclusivos. A distribuição e os valores das frequências dos alelos exclusivos estão descritos na tabela 5.

Tabela 5: Frequência dos alelos exclusivos e suas respectivas agregações.

Locus	Alelo	Frequência	Agreg. encontrada
Ntes34	1	0,0957	CAR
Ntes34	5	0,1071	BON
Ntes50	15	0,2100	CAR
Ntes50	3	0,0500	CAR
Ntes50	7	0,0900	CAR
Ntes50	8	0,2069	OFI
Ntes50	2	0,0714	SUL
Ntes70	2	0,2400	CAR
Ntes70	1	0,0800	CAR

As frequências alélicas foram bastante variadas entre os *loci* nas agregações, entretanto, é interessante observar que em todos os marcadores ao menos um alelo apresentou frequência superior a 20% (Tabela 6). Os gráficos 8 a 14 apresentam a frequência dos alelos por agregação (o *locus* Ntes02 não foi representado por ser monomórfico). Também é possível verificar a frequência dos alelos por agregação no anexo I.

As agregações que apresentaram o maior número de genótipos foram CAR com 38, sendo 23 heterozigotos e OFI com 37, sendo 12 heterozigotos (Tabela 7).

Tabela 6 – Frequência alélica entre agregações.

		Marcador							
Alelos		Ntes02	Ntes34	Ntes37	Ntes41	Ntes50	Ntes59	Ntes70	Ntes73
	1	1,000	0,017	0,035	0,084	0,022	0,032	0,016	0,097
	2		0,066	0,965	0,376	0,008	0,057	0,047	0,869
	3		0,539		0,418	0,008	0,056	0,938	0,033
	4		0,221		0,122		0,373		
	5		0,017				0,209		
	6		0,142				0,169		
	7					0,015	0,063		
	8					0,061	0,041		
	9					0,260			
	10					0,270			
	11					0,172			
	12					0,115			
	13					0,032			
	15					0,035			

Os números em negrito indicam frequências acima de 20%.

Tabela 7: Genótipos observados por agregação e *locus*.

Locus	SUL	OFI	CAM	UBE	BON	CAR
Ntes02	0101	0101	0101	0101	0101	0101
Ntes34	0303 0404 0606	0303 0304 0404 0306 0606	0303 0404	0202 0303 0304 0404	0202 0303 0204 0404 0305 0506 0606	0202 0203 0303 0304 0106 0606
Ntes37	0202	0202	0202	0202	0102 0202	0102 0202
Ntes41	0202 0303	0202 0203 0303	0202 0203 0304 0404	0101 0102 0202 0203 0303 0104 0304	0202 0203 0303 0304 0404	0101 0102 0202 0203 0303
Ntes50	0909 0210 0910 1010 0911 1111	0808 0809 0909 0810 0910 1010 0811 1011 1111 0912 1012	1010 1011 1013	0909 0910 0911 1011 1111 0912 1112	0909 0910 0911 1011 1111 0912 1112	0107 0110 1010 0311 1011 0112 0712 1212 0915 1015 1115
Ntes59	0204 0305 0405 0505	0204 0404 0205 0405 0505 0406 0506 0606 0607 0707 0608 0808	0404 0407	0304 0404 0105 0305 0405	0204 0304 0404 0205 0405 0505 0406 0506 0606	0106 0206 0406 0606 0608
Ntes70	0303	0303	0303	0303	0303	0101 0102 0202 0203
Ntes73	0202	0101 0202 0203	0202 0303	0202	0102 0202	0101 0102 0202 0203

Gráfico 08: Marcador Ntes34. Frequência dos alelos por agregação.

Gráfico 09: Marcador Ntes37. Frequência dos alelos por agregação.

Gráfico 10: Marcador Ntes41. Frequência dos alelos por agregação.

Gráfico 11: Marcador Ntes50. Frequência dos alelos por agregação.

Gráfico 12: Marcador Ntes59. Frequência dos alelos por agregação.

Gráfico 13: Marcador Ntes70. Frequência dos alelos por agregação.

Gráfico 14: Marcador Ntes73. Frequência dos alelos por agregação.

V.2. DIVERSIDADE GENÉTICA NAS AGREGAÇÕES

Os dados relativos à diversidade gênica entre *loci* e agregações estão mostrados na tabela 8, onde é possível observar uma variação de 0% a 85,2% na diversidade. A média da diversidade entre as agregações foi de 35,4% e quando todas as agregações foram consideradas como uma única população a média de diversidade caiu para 20,8% (Tabela 8).

Um resumo da variação genética entre as agregações está na tabela 9. A média entre as agregações para o valor de *A* (número médio de alelos por *locus*) foi de 2,67, sendo as agregações de Campinas e Caratinga as mais discrepantes. Quando analisados os valores para os *loci* polimórficos (*PLP*), a maior porcentagem foi observada na agregação de Caratinga e a menor na de Uberlândia. Nenhuma agregação apresentou diferença em *PLP* independente do critério utilizado, 95% ou 99%.

Tabela 8: Diversidade gênica (H_s) por agregação, entre as agregações e as agregações como uma população.

Locus	SUL	OFI	CAM	UBE	BON	CAR	Agregações (média)	População Geral (média)
Ntes02	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ntes34	0,571	0,502	0,533	0,405	0,794	0,598	0,567	0,236
Ntes37	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,322	0,057	0,038
Ntes41	0,489	0,468	0,685	0,727	0,668	0,457	0,582	0,301
Ntes50	0,690	0,784	0,551	0,682	0,728	0,852	0,716	0,506
Ntes59	0,595	0,769	0,353	0,649	0,744	0,547	0,611	0,454
Ntes70	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,480	0,081	0,054
Ntes73	0,000	0,416	0,536	0,000	0,164	0,221	0,217	0,078
Média	0,293	0,367	0,332	0,308	0,390	0,435	0,354	0,208

A maior taxa de heterozigose (H) observada foi em CAR e a menor em SUL, entretanto, é possível observar que a taxa de H_o e H_e estão muito próximas nas agregações BON e CAR (Tabela 9).

Tabela 9: Variação genética entre agregação

	SUL	OFI	CAM	UBE	BON	CAR
N	36	88	18	54	56	50
N_m	30,8	78,4	15,0	51,9	52,9	49,9
A_m	2,25	2,75	1,88	2,38	3,00	3,75
PLP(95%/99%)	62,5	62,5	62,5	50,0	62,5	87,5
He_m	0,295	0,366	0,326	0,307	0,389	0,435
Ho_m	0,144	0,218	0,234	0,272	0,349	0,434

N- número de indivíduos; N_m- número médio de indivíduos; A_m- número médio de alelos; PLP- *loci* polimórficos; He_m- heterozigose média esperada; Ho_m- heterozigose média observada.

Quando todas as agregações são consideradas uma única população, o número de alelos médio por *locus* (A) sobe consideravelmente para 4,75, mas o PLP cai para 43% (não houve diferença entre 95% e 99%). Diferentemente do que ocorre com as agregações em separado, o H_o torna-se maior do que o H_e (Tabela 10).

Tabela 10: Todas as agregações analisadas como uma única população.

	N	N _m	A _m	PLP(95%/99%) (%)	He	Ho
P	302	8,9	4.75	43	0,210	0.275

N=número de indivíduos; N_m=número médio de indivíduos; A_m=número médio de alelos; PLP=*loci* polimórficos; He_m=heterozigose média esperada; Ho_m=heterozigose média observada; P=população geral.

V.3. EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

Quando todas as agregações foram consideradas como uma única população, o qui quadrado (valor infinito) com 48 graus de liberdade forneceu um *P* altamente significativo.

Analisando as agregações separadamente todas apresentaram valores altamente significativos, indicando que tanto as agregações separadas ou como um todo, não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 11).

Tabela 11: Teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg entre agregações e *locus*.

		<i>Locus</i>								χ^2	g.l.	<i>P</i>
Agregações		Ntes02	Ntes34	Ntes37	Ntes41	Ntes50	Ntes59	Ntes70	Ntes73			
	SUL	-	0,0000	-	0,0000	0,0000	0,0006	-	-	134,9	8	0,0000
	OFI	-	0,0000	-	0,1756*	0,0000 (0,0000)	0,0000 (0,0000)	-	0,0000	∞	10	AS
	CAM	-	0,0000	-	0,0070	0,1691*	0,5289*	-	0,0070	44,7	10	0,0000
	UBE	-	0,0000	-	0,0000	0,0000	0,0000	-	-	132,5	8	0,0000
	BON	-	0,0000 (0,0000)	-	0,0000	0,0013	0,0002 (0,0001)	-	1	∞	10	AS
	CAR	-	0,0000 (0,0000)	0,1750*	0,0297	0,0000 (0,0000)	0,2863* (0,0110)	0,0001	0,1867*	∞	14	AS
	χ^2	-	∞	-	102,1	∞	∞	-	98,8	∞		
	g.l.	-	12	-	12	12	12	-	8		48	
	<i>P</i>	-	AS	-	0,0000	AS	AS	-	0,0000			AS

*Valores não-significativos, $P > 0,05$; Valores entre parênteses=desvio padrão; AS=altamente significativo; ∞ =valor infinito; g.l.=grau de liberdade.

Para verificar se o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg nas agregações de *N. testaceicornis* está relacionado com excesso ou déficit de heterozigotos, foi realizado o teste “U” (Rousset e Raymond, 1995), em que a hipótese alternativa (H1) é: déficit de heterozigotos para $P < 0,05$. Como pode ser observado na tabela 12, todas as agregações apresentaram déficit de heterozigotos para pelo menos um marcador. A tabela 13 apresenta o déficit de heterozigotos por ninho de cada agregação para uma melhor interpretação dos resultados observados na tabela 12.

Tabela 12: Deficiência de heterozigotos nas agregações por *locus*.

		<i>Locus</i>							
Agregações		Ntes02	Ntes34	Ntes37	Ntes41	Ntes50	Ntes59	Ntes70	Ntes73
	SUL	-	0,0000*	-	0,0000*	0,0240*	0,9541	-	-
	OFI	-	0,0000*	-	0,1129	0,0044* (0,0010)	0,0000* (0,0000)	-	0,0000*
	CAM	-	0,0000*	-	0,3592	1	1	-	0,0070*
	UBE	-	0,0000*	-	0,0148*	0,3391	0,9997	-	-
	BON	-	0,0000*	-	0,0019*	0,9982	0,9432 (0,0040)	-	1
	CAR	-	0,0086* (0,0014)	1	0,0314*	0,9752 (0,0034)	1 (0,0000)	0,0482*	0,1090

*Valores significativos, $P < 0,05$; Valores entre parênteses=desvio padrão.

Tabela 13: Deficiência de heterozigotos para cada ninho dentro das agregações.

Marcadores										
Ninhos por agregação			Ntes02	Ntes34	Ntes37	Ntes41	Ntes50	Ntes59	Ntes70	Ntes73
	SUL	40	-	0,0117*	-	-	1	1	-	-
		60	-	-	-	-	-	-	-	-
		83	-	0,0070*	-	-	0,7016	1	-	-
		115	-	0,0117*	-	-	0,9105	1	-	-
	OFI	29	-	-	-	-	1	0,9085	-	-
		41	-	1	-	1	1	-	-	-
		45	-	-	-	0,7016	1	0,9801	-	1
		46	-	-	-	1	1	1	-	-
		47	-	1	-	1	1	0,6952	-	-
		48	-	-	-	1	1	1	-	-
		56	-	-	-	-	1	1	-	-
		57	-	-	-	0,8552	0,3124	1	-	-
		59	-	0,0093*	-	-	0,4333	-	-	-
	CAM	171	-	-	-	1	1	-	-	-
		172	-	-	-	1	1	1	-	0,0070*
	UBE	256	-	0,0014*	-	1	1	1	-	-
		257	-	1	-	-	1	1	-	-
		258	-	0,0029*	-	1	1	1	-	-
		259	-	-	-	-	-	1	-	-
		260	-	-	-	1	1	1	-	-
		261	-	-	-	1	1	-	-	-
	BON	276	-	1	-	1	1	1	-	-
		277	-	1	-	1	1	1	-	-
		278	-	1	-	0,4333	0,1331	1	-	1
		279	-	-	-	-	1	0,3547	-	-
		280	-	0,0017*	-	1	1	1	-	-
		281	-	-	-	-	1	1	-	-
	CAR	315	-	1	-	-	0,9146	-	0,9401	0,4799
		316	-	-	-	1	1	1	-	1
		317	-	0,5294	-	0,9473	1	1	-	-
		318	-	1	1	1	1	1	1	-
		319	-	-	1	0,1579	0,9791	1	0,4333	-

*Valores significativos, $P < 0,05$; Valores entre parênteses=desvio padrão.

V.4 COEFICIENTE DE ENDOGAMIA (*Fis*)

O coeficiente de endogamia foi calculado por *locus* e agregação. Todos os valores foram estatisticamente significantes para um intervalo de confiança (IC) de 95%. Os valores negativos indicam uma frequência maior de heterozigotos (Tabela 14).

Tabela 14: Coeficiente de endogamia (*Fis*) por *locus* e por agregação.

	SUL	OFI	CAM	UBE	BON	CAR
Ntes02	-	-	-	-	-	-
Ntes34	1,000	0,784	1,000	0,721	0,580	0,430
Ntes37	-	-	-	-	0,000	-0,241
Ntes41	1,000	0,186	0,026	0,226	0,266	-0,117
Ntes50	0,379	0,164	-0,387	-0,016	-0,199	-0,126
Ntes59	-0,153	0,305	-0,259	-0,249	0,216	-0,279
Ntes70	-	-	-	-	-	0,249
Ntes73	-	0,848	1,000	-	-	0,093
Média	0,525	0,407	0,294	0,115	0,102	0,002

Todos os valores foram significativos no IC=95%.

V.5 DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL

O parâmetro de diferenciação populacional *Fst*, apresentou valores significativos entre os pares de agregações analisados demonstrando que estas são geneticamente diferentes entre si no IC=95% (Tabela 15).

As tabelas 18 a 23 apresentam os valores de *Fst* entre os pares de ninhinhos de cada agregação (todos os valores foram calculados para um IC=95%). Na agregação SUL somente o par de ninhinhos 40/83 não apresentou valor significativo (Tabela 16). Para a agregação OFI, das 36 combinações de ninhinhos obtidas, foram observados somente três valores não significativos

(ninhos 45/46 46/48, 47/59) (Tabela 17). A única combinação possível para a agregação CAM (formada somente por dois ninhos) obteve um valor significativo (Tabela 18). A agregação UBE apresentou cinco valores não significativos em 15 combinações possíveis de ninhos, sendo esta, a agregação com o maior número de pares de ninhos com valores não significativos (Tabela 19). A agregação BON apresentou somente um valor não significativo para o par de ninhos 280/281 (Tabela 20). A sexta e última agregação, CAR, apresentou todos os valores significativos, demonstrando diferenciação genética entre todos os ninhos (Tabela 21).

Tabela 15: Estimativa de F_{st} entre pares de agregações.

Agregações	SUL	OFI	CAM	UBE	BON
OFI	0,1389				
CAM	0,2050	0,1347			
UBE	0,2390	0,1159	0,1972		
BON	0,0734	0,0772	0,1308	0,1204	
CAR	0,2446	0,1459	0,2400	0,2191	0,1646

As combinações par a par foram todas significativas no $IC=95\%$.

Tabela 16: Estimativa de F_{st} entre pares de ninhos da agregação SUL.

Ninhos	40	60	83
60	0,6482*		
83	0,0033	0,5757*	
115	0,5221*	0,5130*	0,4850*

*Valores significativos no $IC=95\%$.

Tabela 17: Estimativa de Fst entre pares de ninhos da agregação OFI.

Ninhos	29	41	45	46	47	48	56	57
41	0,6002*							
45	0,6133*	0,5393*						
46	0,6954*	0,6339*	0,1491					
47	0,6492*	0,6083*	0,3727*	0,4375*				
48	0,6877*	0,6759*	0,3080*	0,2967	0,4120*			
56	0,7067*	0,6460*	0,3952*	0,4448*	0,5328*	0,4649*		
57	0,6008*	0,5762*	0,1701*	0,2466*	0,3551*	0,2333*	0,3313*	
59	0,7190*	0,7106*	0,5338*	0,6061*	0,2298	0,5607*	0,6509*	0,4654*

*Valores significativos no IC=95%.

Tabela 18: Estimativa de Fst entre o pare de ninhos da agregação CAM.

Ninhos	171
172	0,4949*

*Valor significativo no IC=95%.

Tabela 19: Estimativa de Fst entre pares de ninhos da agregação UBE.

Ninhos	256	257	258	259	260
257	0,3871*				
258	0,2796*	0,3991*			
259	0,3337	0,5617*	0,4089*		
260	0,4046*	0,4472*	0,4037*	0,1921	
261	0,4684*	0,3802	0,4478*	0,6187	0,5135

*Valores significativos no IC=95%.

Tabela 20: Estimativa de Fst entre pares de ninhos da agregação BON.

Ninhos	276	277	278	279	280
277	0,3148*				
278	0,2814*	0,3705*			
279	0,2792*	0,2099*	0,3519*		
280	0,2912*	0,2106*	0,3509*	0,2956*	
281	0,2257*	0,4763*	0,4761*	0,5281*	0,4769

*Valores significativos no IC=95%.

Tabela 21: Estimativa de F_{st} entre pares de ninhos da agregação CAR.

Ninhos	315	316	317	318
316	0,4948			
317	0,4489	0,3388		
318	0,4287	0,2453	0,2198	
319	0,3673	0,3158	0,3859	0,1436

Todos os valores foram significativos no $IC=95\%$.

Foram realizados outros testes para verificação de diferenciação populacional (agregação) já que estas não se comportam como uma população panmítica. O primeiro teste realizado foi o de diferenciação alélica, em que a hipótese nula foi: “a distribuição alélica é idêntica entre as agregações”. Quando o teste foi realizado com todas as agregações como uma única, o valor de P foi altamente significativo (nem mesmo sendo expresso em números) e o chi quadrado foi infinito. Todos os *loci* (com exceção do Ntes02, pois não pode ser calculado por ser monomórfico) apresentaram o mesmo valor ($P=0,0000$ e desvio padrão= $0,0000$). Quando os pares de agregações foram testados com todos os *loci* analisados em conjunto, todas as agregações diferiram quanto à distribuição alélica, pois o chi quadrado foi novamente infinito e os valores foram altamente significativos.

Também foi realizado o teste de diferenciação genotípica entre agregações em que a hipótese nula foi: “a distribuição genotípica é idêntica entre as populações”, a qual deve ser aceita caso $P>0,05$. Entretanto, pelos resultados obtidos a distribuição genotípica não é idêntica entre as agregações já que $P=0,0000$ (desvio padrão= $0,0000$) foi igual para todos os *loci* (exceto Ntes02 que não pode ser calculado pelo motivo já citado).

Quando considerado todos os *loci* juntos todos os pares de agregações se mostraram diferenciados quanto à distribuição dos genótipos. O chi quadrado foi infinito e os valores de P foram altamente significativos.

A estrutura populacional foi avaliada através da análise de variância molecular (AMOVA). Primeiramente, foram testadas todas as agregações como uma única população a fim de testar uma possível estruturação. A porcentagem de variação para este teste foi de 14%, sendo $P=0,0000$ e o desvio padrão de 0,0000 ($P<0,05$), indicando um valor estatisticamente significativo. Dessa forma, foram montadas diferentes combinações entre as agregações, entretanto, nenhuma dessas combinações mostrou um P estatisticamente significativo, indicando dessa forma que há uma baixa estruturação entre as agregações, mas não o suficiente para serem agrupadas.

V.6 MÚLTIPLOS ACASALAMENTOS

O teste para múltiplos acasalamentos (Tabela 22) mostrou que dos 32 ninhos analisados 11(34,4%) apresentaram somente uma patrilinea, sete (21,9%) apresentaram duas patrilineas, três (9,4%) apresentaram quatro patrilineas, dois (6,3%) apresentaram cinco patrilineas, um ninho (3,2%) apresentou seis patrilineas, dois (6,3%) apresentaram sete patrilineas e um (3,2%) dez patrilineas. Em cinco ninhos não foi possível calcular a quantidade de patrilineas, pois o programa acusou poliginia. Com relação ao grau de parentesco, alguns valores fugiram ao esperado para a quantidade de patrilineas correspondentes (Tabela 22).

Tabela 22: Número de patrilíneas e relação de parentesco por ninho.

Agregação	Ninho	Patrilíneas	Parentesco
SUL	40	2	0,481 (0,059)
	60	*	-
	83	4	0,382 (0,046)
	115	10	0,277 (0,026)
OFI	29	4	0,464** (0,033)
	41	1	0,710 (0,045)
	45	2	0,702** (0,022)
	46	1	0,709 (0,037)
	47	2	0,579 (0,034)
	48	1	0,503** (0,038)
	56	1	0,468** (0,046)
	57	6	0,315 (0,040)
	59	*	0,425 (0,109)
	171	1	0,716 (0,033)
CAM	172	*	0,549 (0,048)
UBE	256	2	0,702** (0,092)
	257	1	0,527** (0,021)
	258	2	0,455 (0,038)
	259	1	0,679** (0,020)
	260	4	0,730** (0,019)
	261	1	0,725 (0,022)
	276	1	0,476** (0,017)
BON	277	7	0,310 (0,018)
	278	7	0,595** (0,018)
	279	*	0,256 (0,042)
	280	2	0,585 (0,075)
	281	2	0,259** (0,005)

Tabela 22: continuação

	315	5	0,464** (0,026)
	316	1	0,575** (0,018)
CAR	317	5	0,462** (0,013)
	318	1	0,610** (0,011)
	319	*	0,368 (0,022)

*Poliginia (segundo o software). **Valores que fogem ao esperado.

A Tabela 23 traz a quantidade de alelos diferentes observados em cada ninho. Por exemplo, foi observado um alelo nos 32 ninhos analisados para o locus Ntes02, ou no caso do Ntes50, onde 15 ninhos apresentaram dois alelos, 15 ninhos apresentaram três alelos, um ninho apresentou quatro alelos e um ninho apresentou cinco alelos. Dos 32 ninhos, cinco deles fogem explicitamente ao número máximo de alelos esperado para um único acasalamento (três alelos). Os gráficos 15 a 22 ilustram a frequência de ninhos que apresentam de um a cinco alelos diferentes para cada marcador.

Outra questão interessante e que pode ser observada na tabela 24, é que, apesar de muitos ninhos apresentarem dois ou três alelos para um determinado marcador, os genótipos observados não excluem a possibilidade de múltiplos acasalamentos

Tabela 23: Quantidade de vezes que um dado número de alelos se repete entre os ninhos por locus.

Nº de alelos	Ntes02	Ntes34	Ntes37	Ntes41	Ntes50	Ntes59	Ntes70	Ntes73
1	32	15	28	10	-	6	27	25
2	-	14	4	19	15	11	2	5
3	-	2	-	1	15	12	1	-
4	-	-	-	-	1*	3*	-	-
5	-	-	-	-	1*	-	-	-

*Ninhos que não correspondem a um único acasalamento.

Gráfico 15: Frequência de ninhos com seu respectivo número de alelos para o *locus* Ntes02.

Gráfico 16: Frequência de ninhos com seu respectivo número de alelos para o *locus* Ntes34.

Gráfico 17: Frequência de ninhos com seu respectivo número de alelos para o *locus* Ntes37.

Gráfico 18: Frequência de ninhos com seu respectivo número de alelos para o *locus* Ntes41.

Gráfico 19: Frequência de ninhos com seu respectivo número de alelos para o *locus* Ntes50.

Gráfico 20: Frequência de ninhos com seu respectivo número de alelos para o *locus* Ntes59.

Gráfico 21: Frequência de ninhos com seu respectivo número de alelos para o *locus* Ntes70.

Gráfico 22: Frequência de ninhos com seu respectivo número de alelos para o *locus* Ntes73.

Tabela 24: Genótipos observados em ninhos com mais de uma patrilinea.

Ninho	Ntes34	Ntes41	Ntes50	Ntes59	Ntes70	Ntes73
40	6/6 (3) 4/4 (4)					
83	6/6 (3) 4/4 (5)		9/11 (4) 11/11 (2) 9/10 (1) 9/9 (1)			
115	3/3 (4) 6/6 (3)		2/10 (5) 10/10 (2) 9/11 (1)	4/5 (4) 3/5 (3) 5/5 (1)		
29			10/12 (2) 10/11 (7) 10/10 (1)	4/5 (6) 5/5 (1) 4/4 (3)		
45				4/5 (6) 5/5 (1) 4/4 (1)		
47				6/6 (3) 6/7 (5) 7/7 (2)		
57		3/3 (3) 2/3 (5) 2/2 (1)	10/12 (4) 9/9 (1) 9/12 (2) 10/10 (3)	2/5 (5) 5/6 (1) 4/5 (2) 2/4 (2)		
59	3/3 (2) 4/4 (8)		10/11 (4) 11/11 (3) 10/10 (2) 9/10 (1)			
172						2/2 (5) 3/3 (3)

Tabela 24: continuação

256	4/4				
	(5)				
	3/3				
258	(5)				
	2/2				
	(5)				
277	3/3				
	(5)				
	(4)				
278		2/3	11/11		
		(4)	(6)		
		3/3	9/10		
279		(3)	(1)		
		2/2	9/11		
		(3)	(2)		
280			9/9		
			(1)		
315				3/4	
				(6)	
				6/6	
317				(2)	
				4/5	
				(2)	
319	6/6				
	(4)				
	4/4				
315	(6)				
			7/12	1/2	1/2
			(5)	(6)	(3)
317			1/7	1/1	1/1
			(4)	(1)	(1)
			12/12	2/3	2/2
319			(1)	(3)	(6)
	2/3	2/3	11/15		
	(3)	(6)	(1)		
317	3/4	3/3	1/10		
	(1)	(2)	(6)		
	2/2	2/2	10/10		
319	(5)	(1)	(1)		
			1/12		
			(2)		
319		1/2			
		(1)			
		1/1			
319		(1)			
		2/2			
		(8)			

Números entre parênteses: quantidade de vezes observadas.

VI. DISCUSSÃO

VI. VARIABILIDADE GENÉTICA

A análise da diversidade alélica é um dos parâmetros utilizados no estudo da diversidade genética das populações. De acordo com as análises realizadas neste trabalho, o nível de diversidade alélica observado nas agregações, que variou de 1,88 a 3,75 com uma média de 4,75 (Tabela 9), está de acordo com os descritos na literatura para marcadores microsatélites específicos (Green *et al.*, 2001; Francini *et al.*, 2009), demonstrando a eficiência dos marcadores aqui utilizados. Entretanto, o número de alelos observados (com exceção do Ntes50) ficou abaixo dos encontrados por Oliveira *et al.* (2009), o que poderia ser justificado pelo maior número de regiões amostradas pelos autores para efeito da caracterização desses marcadores. É interessante observar que a agregação de Caratinga apresentou quase todos os alelos encontrados nas outras agregações. Assis (2010), em um estudo realizado com abelhas *N. testaceicornis*, mas utilizando DNA mitocondrial, também encontrou diferenças nas abelhas de Caratinga em relação às demais regiões estudadas. A autora infere que a população de Caratinga esteja isolada pela barreira geográfica formada pelo complexo da “Serra do Espinhaço”. Essa barreira poderia de alguma forma estar protegendo essa população de ações seletivas mais intensas que poderiam estar ocorrendo atualmente sobre as outras agregações.

De maneira geral, a porcentagem de *loci* polimórficos encontrada nesta análise (50% a 87,5%) (Tabela 9) foi tão alta quanto às observadas na literatura. Peters *et al.* (1999) por exemplo, encontraram 76% de polimorfismo em *Melipona bicolor*. Strassmann *et al.* (1997) observaram polimorfismos nos

18 *loci* analisados na vespa *Polistes bellicosus* e somente um *locus* entre oito na espécie *Polistes annularis* foi monomórfico.

Presume-se que a heterozigose esperada, importante medida da variação genética (Nei, 1987, apud Hedrick, 2005), seja mais alta quando não existem divergências nos valores das frequências dos alelos de um *locus* ou se existem muitos alelos em um *locus* com frequências semelhantes (Hartl e Clarck, 2007). Essa situação foi observada para os *loci* Ntes41, Ntes50 e Ntes59. Já os demais *loci* apresentaram alguns alelos com frequências que variaram de zero a mais de 50% (Tabela 6). Quando essa situação ocorre, a heterozigose diminui porque a maioria dos indivíduos é homozigota para o alelo mais frequente (Hartl e Clarck, 2007). Essas altas frequências foram responsáveis pelas diferenças encontradas entre os valores de heterozigose observada (H_o) e esperada (H_e).

Todas as agregações apresentaram valores de H_e superiores a H_o segundo equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 4). Uma possível explicação para a perda de variação genética demonstrada pela análise da heterozigose nas agregações pode ser uma consequência da presença de alelos nulos, como observado por Green *et al.* (2001) para um marcador específico de *Trigona carbonaria*, além disso, as agregações poderiam estar se comportando como um isolado resultando em endogamia o que levaria ao déficit de heterozigotos (Dakin e Avise, 2004) e consequente perda de diversidade, ambos fatores observados neste trabalho.

Cameron *et al.* (2004) realizou um estudo em agregações de *Trigona collina* e mesmo utilizando marcadores heterólogos encontrou uma diversidade gênica média de $H_s=0,526$ um valor relativamente mais alto do que o

observado para as agregações deste trabalho, $H_s=0,354$, porém, essa baixa diversidade gênica é condizente com os valores de heterozigose encontrados neste estudo.

O teste exato foi aplicado para se estimar a probabilidade de um desvio casual (P). Todas as agregações apresentaram desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg. Quando o teste U foi aplicado para averiguar se os desvios eram causados por excesso ou déficit de heterozigotos, pode-se observar um desbalanço muito grande entre essas duas possibilidades, pois os marcadores apresentaram uma deficiência significativa de heterozigotos em algumas agregações e excesso em outras (Tabela 12). Os desvios poderiam ser causados por diversos fatores tais como subestrutura populacional, tamanho amostral, acasalamento não aleatório, deriva genética, seleção e endogamia (Tourret *et al.*, 1999, apud Oliveira, 2005).

O coeficiente de endogamia F_{is} é uma medida do grau de acasalamentos endogâmicos dentro de populações isoladas e estruturadas. Quando $F_{is}=0$, as frequências genotípicas são idênticas àquelas do princípio de Hardy-Weinberg e quando $F_{is}=1$ (endogamia completa), todos os indivíduos são autozigóticos, ou seja, os alelos encontrados são idênticos por descendência (Hartl e Clarck, 2007). No presente estudo, foram observados valores significativos de endogamia para todas as agregações (Tabela 14). A consequência direta desses resultados é o excesso de genótipos homozigotos e a deficiência de genótipos heterozigotos. O resultado da análise do F_{is} é muito importante, pois justifica os desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg e o fato da heterozigose observada ser menor do que a esperada.

As análises de diferenciação populacional mostraram que as agregações estão diferenciadas, pois os valores de *Fst* foram diferentes de zero e os valores de *P* foram significativos para todos os pares de agregações. O *Fst* também foi testado para os pares de ninhos de cada agregação e das 83 combinações somente 10 (12%) apresentaram valores não significativos o que revela diferenciação entre os ninhos e explica a diferença entre as agregações. A análise de diferenciação populacional também foi realizada pela comparação da distribuição alélica e distribuição dos genótipos tanto entre os pares de agregações como nas agregações como uma única população. Para estas análises os valores se mostraram mais uma vez significativos corroborando com os resultados do teste para *Fst*.

A estrutura populacional foi avaliada pela análise de variância molecular (AMOVA). Primeiramente todas as agregações foram testadas como um único grupo. A porcentagem de variação foi de 14% com um $P=0,0000$, indicando significância e dessa forma, estruturação. Entretanto, quando as agregações foram combinadas na tentativa de formar subgrupos, nenhum valor foi significativo, ou seja, entre todas as agregações há uma estruturação discreta possivelmente em função da presença de alelos exclusivos (evidência de baixo fluxo gênico e consequente estruturação populacional), mas não suficiente para subagrupar as agregações.

MÚLTIPLOS ACASALAMENTOS

Tanto rainhas de meliponíneos quanto de abelhas do mel acasalam uma única vez na vida, mas enquanto as rainhas melíferas são altamente

poliandricas (Estoup *et al.*, 1994), a monoandria tem sido considerada a norma entre as abelhas sem ferrão (Sakagami, 1982; Engels e Engels, 1988; Peters *et al.*, 1999).

A teoria da seleção de parentes (kin selection theory) busca explicar a evolução social através da referência aos altos graus de relação genética entre indivíduos cooperativos. Para a maioria dos himenópteros sociais (formigas, abelhas e vespas), a teoria da seleção de parentes tem sido especialmente atrativa devido ao sistema genético haplóide dos machos que leva a uma relação potencialmente alta entre as fêmeas da colônia (Ross, 1986). Entretanto, os múltiplos acasalamentos contradizem a teoria da seleção de parentes, pois reduzem consideravelmente a relação de parentesco entre as operárias, aumenta o risco de predação, além de aumentar as chances de adquirir doenças sexualmente transmissíveis (Crozier e Fjerdingstad, 2001).

Devido ao aparente *inclusive fitness* da monoandria e dos potenciais custos da poliandria, explicações para os múltiplos acasalamentos têm sido frequentemente buscadas. Uma das possíveis explicações, conhecida como variância genética, postula que o *fitness* tanto da rainha quanto da colônia melhora pelo aumento da diversidade genética intracolônia que provém dos múltiplos acasalamentos (Palmer e Oldroyd, 2000).

No caso de espécies que apresentam poliandria como *Apis mellifera*, conflitos intracoloniais são observados como, por exemplo, o *worker policing* (policiamento de postura de ovos de operárias por outras operárias) (Brito, 2005), característica que não havia sido presenciada em meliponíneos. Porém, Koedam *et al.* (1998), observaram comportamento de oofagia e substituição de ovos por operárias e suas rainhas dentro de colônias de *Melipona subnitida*,

sugerindo que outras espécies de meliponíneos teriam um repertório comportamental necessário para lidar na competição reprodutiva com suas rainhas.

Apesar dos fatores contra a poliandria nos meliponíneos aparentemente pesarem mais dos que os a favor, alguns pesquisadores estão demonstrando que múltiplos acasalamientos nesse grupo de abelhas é um fenômeno que parece não ser tão raro.

Paxton (2000), empregando marcadores microssatélites demonstrou que a poliandria é facultativa em *Scaptotrigona postica*, além de já ter demonstrado em um trabalho anterior (Paxton *et al.* 1999) a presença de seis patrilineas na mesma espécie de abelhas. Imperatriz-Fonseca *et al.* (1998) também mostraram a presença de múltiplos acasalamientos em *Tetragonisca angustula* ao filmar uma rainha dessa espécie copulando com ao menos dois machos.

Assim como essas pesquisas sugerem múltiplos acasalamientos, o presente trabalho observou diferentes patrilineas para vários ninhos. Apesar de não ter sido o foco inicial desta pesquisa, os resultados que foram surgindo durante as análises chamaram a atenção para este fenômeno.

A tabela 22 apresenta o número de patrilineas e a relação de parentesco entre as operárias. A relação de parentesco entre operárias para um único macho foi de $r=0,75$ e para dois machos a relação caiu para $r=0,50$, devido ao sistema sexual haplo-diplóide dos himenópteros. 50% dos ninhos tiveram seu r dentro do valor esperado segundo Palmer e Oldroyd (2000) (Gráfico 23), entretanto, os demais ninhos fugiram a esse valor. Porém, o problema pode não estar na relação de parentesco e sim no número de patrilineas que pode ter sido sub ou super estimadas. Isso provavelmente ocorreu devido à forma

como o programa analisou os genótipos das operárias e determinou o genótipo das rainhas e possíveis machos. Por exemplo, quando todas as operárias de um ninho foram heterozigotas o programa considerou duas rainhas homozigotas e desconsiderou a possibilidade dessa rainha ser heterozigota, pois ele optou por diminuir a quantidade de patrilineas. Entretanto, como a quantidade de rainhas era muito grande em alguns ninhos, foi necessário escolher manualmente uma ou no máximo duas dentre as que apresentaram as maiores probabilidades de serem as reais rainhas para em seguida serem calculadas as patrilineas (Tabela 22).

Gráfico 23: Média na relação de parentesco entre operárias por número de machos.

Mais de 90% das mudanças na relação de parentesco surgem nos primeiros seis acasalamentos (Palmer e Oldroyd, 2000).

Testes na tentativa de minimizar o número de patrilineas foram realizados, como subtrair indivíduos que apresentaram genótipos completamente diferentes do contexto do ninho ou a exclusão de ninhos inteiros, mas a quantidade de patrilineas e genótipos das rainhas não se

alteraram. Portanto, optou-se por utilizar todos os genótipos do modo como foram observados nos géis.

Independente dos problemas apresentados na análise das patrilineas, o número de alelos observados em alguns ninhos (Tabela 23) e os genótipos (Tabela 24) indicam prováveis múltiplos acasalamentos.

Outra questão interessante é que apesar de no máximo três alelos por *locus* ser o esperado para um único acasalamento (dois da rainha se ela for heterozigota e um do macho) em alguns casos nem mesmo a presença de dois alelos justificaram uma patrilinea. Alguns ninhos para alguns marcadores apresentaram dois genótipos homozigotos. Um desses casos é o ninho 40, marcador Ntes34, pois, considerando a rainha heterozigota 4/6, a única forma de ela gerar prole 4/4 e 6/6 seria sendo fecundada por dois machos (Tabela 24).

Apesar desses dados serem consistentes com a possibilidade de múltiplos acasalamentos, outros fatores poderiam justificar esses achados como a presença de alelos nulos, a inclusão acidental de machos na amostra, mudanças recentes de rainhas, operárias de outros ninhos e a contínua conexão entre ninho mãe-filho (Peters *et al.* 1998).

VII. CONCLUSÕES

- A alta variabilidade alélica observada nas agregações de abelhas *N. testaceicornis* demonstrou que a utilização de primers específicos pode ser mais eficiente na análise de estudos populacionais, pois refletem com mais fidelidade a diversidade da espécie em questão.
- A baixa heterozigosidade e diversidade gênica estão diretamente relacionadas com o alto índice de endogamia observado e que pode ter relação com a dependência ninho mãe-filho ou por algum sistema de isolamento das agregações, ou ainda, por uma baixa variabilidade genética da espécie.
- Apesar de Caratinga ser a agregação mais distante geograficamente é a que apresenta maior variação genética. Isso poderia sugerir que em algum momento no passado as abelhas das diferentes agregações mantiveram contato, entretanto, eventos antigos em consequência de mudanças climáticas devido às glaciações do Pleistoceno, juntamente com a barreira geográfica do mosaico de montanhas do complexo da “Serra do Espinhaço” (Silva e Passos, 2009) isolou a população de Caratinga. Esse fenômeno poderia estar preservando essa agregação de uma possível pressão seletiva que possa estar atuando com maior intensidade sobre as demais agregações.
- A análise do F_{st} apresentou diferenciação genética nas agregações, assim como as análises de distribuição alélica e genotípica. Entretanto, a análise por AMOVA indicou ausência de estruturação entre as

agregações. Quando todas as agregações foram computadas em um único grupo o resultado apresentou uma discreta estruturação provavelmente devido à presença de alelos exclusivos, o que também poderia explicar os resultados dos demais testes de diferenciação.

- Diversos ninhos apresentaram mais de uma patrilínea indicando que essa espécie pode ser poliândrica. A não afirmação dessa característica se deve a fatores discutidos anteriormente e que exigem um estudo direcionado para esse fenômeno.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ritmo atual de destruição, alteração e fragmentação de ambientes naturais devido ao crescente impacto das atividades humanas tem levado a uma alarmante perda da biodiversidade presente em nosso planeta (Wilson, 1988; Erlich, 1988; Avise, 1996, apud Elzirik, 1996). Esforços no sentido de reverter ou minimizar os efeitos deste processo são ainda insuficientes e necessariamente devem envolver iniciativas integradas por campos tão diversos quanto economia, política, ciências sociais e muitas áreas das ciências biológicas como a Genética da Conservação (Elzirik, 1996).

Populações pequenas e fragmentadas tendem a sofrer com a perda da diversidade genética, com os efeitos deletérios do endocruzamento sobre a reprodução e sobrevivência e com os efeitos da ação da seleção natural (Frankham *et al.*, 2004).

Pelo apresentado neste estudo, observamos que apesar da alta variabilidade alélica, os alelos estão distribuídos de forma irregular e essa disparidade acaba levando a uma baixa diversidade gênica. Além disso, os altos índices de endogamia mantêm a variabilidade genética baixa e demonstra a ausência de fluxo gênico. O que chama a atenção é que os ninhos de uma agregação não estão impedidos do contato com ninhos que por ventura estão próximos, mas que não fazem parte da agregação, portanto, ou as agregações desenvolveram um comportamento de isolamento, o que não parece ser a realidade já que Cameron *et al.* (2004), observaram que as rainhas de agregações de *Trigona collina* tendem a ser fecundadas por machos provindos de ninhos distantes, ou a diversidade genética para as abelhas *N. testaceicornis* está realmente baixa.

Um estudo populacional com abelhas provindas de diferentes regiões do Brasil poderia esclarecer essas dúvidas, e ajudar a direcionar pesquisadores e sociedade a encontrar formas de manter ou recuperar a diversidade das abelhas que são peças de fundamental importância para o meio ambiente.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. (1997). **Biologia molecular da célula**. Ed. Artes Médicas, Porto Alegre.
- ARIAS, M. C.; BRITO, R. M.; FRANCISCO, F. O.; MORETTO, G de OLIVEIRA, F. F.; SILVESTRE, D.; SHEPPARD, W. S. (2006). Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. **Apidologie** 37: 259-274.
- BEAUMONT, M. A.; BRUFORD, M. W. (1999). **Microsatellites in conservation genetics**, In D.B. Goldstein & C. Schlötterer (eds.), *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford University Press, New York, p.165-182.
- BIESMEIJER, J. C.; SLAA, E. J. (2006). The structure of eusocial bee assemblages in Brazil. **Apidologie**, 37, 240-258.
- BRITO, R. M. (2005) **Análise molecular e populacional de *Partamona mulata* (Moure In Camargo, 1980) e *Partamona helleri* (Fiese, 1900) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**, Tese de Doutorado, Genética, Instituto de Biociências, 189 páginas.
- CALLEN, D. F.; THOMPSON, A. D.; SHEN, Y.; PHILLIPS, H. A.; RICHARDS, R. I.; MULLEY, J. C.; SUTHERLAND G. R. (1993). Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers. **Am. J. Hum. Genet**, 52, 922-927.
- CAMARGO, J. M. F. (1989). **Comentários sobre a sistemática de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae)**. In: Anais do XIV Simp. Anual da ACIESP. **68** (suppl.), 41-61.
- CAMARGO, J. M. F., PEDRO S. R. M. (1992). Sytematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. **Apidologie** 23, 509–522.

- CAMERON, E. C.; FRANCK, P.; OLDROYD B. P. (2004). Genetic structure of nest aggregations and drone congregations of the southeast Asian stingless bee *Trigona collina*. **Molecular Ecology**, 13, 2357-2364.
- CHAMBERS, G. K.; MACAVOY, E. S. (2000). Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, 126, 455-476.
- CHUNG, M.; RANUM, L. P. W.; DUVICK, L. A.; SERVADIO, A.; ZOGHBI, H. Y.; ORR H.T. (1993). Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type I. **Nat. Genet**, 5, 254-258.
- CROZIER, R. H.; FJERDINGSTAD, E. J. (2001). Polyandry in social Hymenoptera-disunity in diversity. **Ann Zool Fennici**, 38, 267-285.
- DAKIN, E. E.; AVISE, J. C. (2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, 23, 504-509.
- ELTZ T.; BRÜHL C. A.; IMIYABIR, Z.; LINSÉNMAIR, K. E. (2003). Nesting and nest trees of stingless bees (Apidae: Meliponini) in lowland dipterocarp forests in Sabah, Malaysia, with implications for forest management. **Forest Ecology and Management**, 172, 301-313.
- ELTZ T.; BRÜHL C. A.; KAARS, S.; LINSÉNMAIR, K. E. (2002). Determinants of stingless bee nest density in lowland dipterocarp forests of Sabah, Malaysia. **Oecologia**, 131, 27-34.
- ELZIRIK, E. (1996). Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. **Brazilian Journal of Genetics**, 19(4), 23-29.

- ENGELS, E.; ENGELS, W. (1988). Age-dependent queen attractiveness for drones and mating in the stingless bee, *Scaptotrigona postica*. **J. Apic. Res.**, 27, 3-8.
- ESTOUP, A.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J.-M. (1994). Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in honeybee colonies. **Proceedings of the Royal Society B**, 258, 1-7.
- FALCÃO, T. M .M. A.; CONTEL, E. P. B.; (1991). Genetic variability in natural population of Brazilian bees: II Electrophoretic data for PMG and MDH give evidence for multiple fertilizations in stingless bees. **Revista Brasileira de Genética**, 14, 47-59.
- FRANCINI, I. B.; SOUSA, A. C. B.; SFORÇA, D. A.; COSTA-PINTO, M. F. F.; CAMPOS, T.; NUNES-SILVA, C. G.; ZUCCHI, M. I.; SOUZA, A. P.; CARVALHO-ZILSE, G. A. (2009). Isolation and characterization of microsatellite loci in the stingless bee *Melipona interrupta manausensis* (Apidae: Meliponini). **Conservation Genetics Resources**, (on line).
- FRANCISCO, F. O. (2002). **Diversidade genética da abelha sem ferrão *Plebeia remota*: análise do DNA mitocondrial e microssatélites**. Dissertação de Mestrado, Genética, Instituto de Biociências-USP.
- FRANCISCO, F. O.; BRITO, R. M.; ARIAS, M. C. (2006). Allele number and heterozygosity for microsatellite loci in different stingless bee species (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Neotropical Entomology**, 35(5), 638-643.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. (2004). **Fundamentos de genética da conservação**. SBG editora, Ribeirão Preto-SP, 262 páginas.
- FREITAS, G. S. (2001). **Levantamento de ninhos de meliponíneos (Hymenoptera, Apidae) em área urbana: Campus da USP, Ribeirão**

- Preto/SP.** Dissertação de Mestrado, Entomologia, FFCLRP-USP, 81 páginas.
- FREITAS, G. S.; SOARES, A. E. E. (2004). **Procurando Irá: um passeio ecológico.** FMRP-USP, 34 páginas.
- GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER, C. (1999). **Microsatellites: Evolution and Applications.** Oxford University Press, New York, 368p.
- GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. (2005). Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Arq. Inst. Biol**, 72 (4), 455-459.
- GOUDET, J. (2001). **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices.** Version 2.9.3. <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- GREEN, C. L.; FRANCK, P.; OLDROYD, B. P. (2001). Characterization of microsatellite loci for *Trigona carbonaria*, a stingless bee endemic to Australia. **Molecular Ecology Notes**, 1, 89-92.
- GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. (2005). **Evolution of the Insects.** Cambridge, Cambridge University Press, 755p.
- HANCOCK, J. M. (1999). **Microsatellites and other simple sequences: Genomic context and mutational mechanisms,** In D.B. Goldstein & C. Schlötterer (eds.), *Microsatellites: Evolution and Applications.* Oxford University Press, New York, p.1-9.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. (2007). **Principles of population genetics.** 4^a ed. Sinauer, MA.

- HEDRICK, P. W. (2005). **Genetics of Populations**. 3ª. ed. Jones and Bartlett, Boston, MA.
- HIGUCHI, R. (1989). Simple and rapid preparation of samples for PCR In: Erlich, H.A. (eds) **PCR technology – principles and applications for DNA amplification**. New York; Stockton Press, p 36-60.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; MATOS, E. T.; FERREIRA, F.; VELTHUIS, H. H. W. (1998). A case of multiple mating in stingless bees (Meliponinae). **Insectes Sociaux**, 45, 231-233.
- INOUE, T.; SAKAGAMI, S. F.; SALMAH, S.; YAMANE, S. (1984). The process of colony multiplication in the sumatran stingless bee *Trigona (Tetragonula) laeviceps*. **Biotropica**, 16(2), 100-111.
- KERR, W. E.; CARVALHO G. A.; NASCIMENTO, V. A. (1996). **Abelha Uruçu: biologia, manejo e conservação**. Fundação Acangaú, Belo Horizonte.
- KIMURA, M.; CROW, J. F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, 49, 725-738.
- KIMURA, M.; OHTA, T. (1978). Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. **Proc. Natl. Acad. Scd**, 75(6), 2868-2872.
- KLEIN A. M.; VAISSIÈRE B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C. AND TSCHARNTKE, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B**, 274, 303-313.
- KOEDAM, D.; CONTRERA, F. A. L.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (1998). A study of reproductive behaviour of workers in *Melipona subnitida*: patterns in the production of males? In: **Anais do Encontro sobre**

- Abelhas III** (Z. L. Paulino Simões *et al.*, Eds), Ribeirão Preto, SP, Brazil. p. 189.
- LACADENA, J. R. (1988). **Genética**. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. (1997). **Genetic data analysis: software for the analysis of discrete genetic data**. Version 1.0.
- LINDAUER, M.; KERR, W. E. (1960). Communication between the workers of stingless bees. **Bee World**, 41, 29-41 & 65-71.
- LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. (2004). **Ecological genetics. Design, analysis and application**. Blackwell Publishing, Oxford, 2004.
- MENDES, M. F. M.; FRANCOY, T. M.; NUNES-SILVA, P.; MENEZES, C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (2007). Intra-populational variability of *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) using relative warp analysis. **Biosci. J.**, 23(1), 147- 152.
- MICHENER, C. D. (1979). Biogeography of the bees. **Ann. Missouri Bot. Gard.** 66, 277–347.
- MICHENER, C. D. (2000). **The bees of the world**. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- MICHENER, C. D. (2007). **The bees of the world**. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- MOILANEN, A.; SUNDSTRÖM, L.; PEDERSEN, J. S. (2004) MATESOFT: a program for deducing parental genotypes and estimating mating system statistics in haplodiploid species. **Molecular Ecology Notes**, 4, 795-797.

- NOGUEIRA-NETO, P. (1997). **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. Ed. Nogueirapis, São Paulo.
- OLDROYD, B.; SMOLENSKI, A.; LAWLER, S.; ESTOUP, A.; CROZIER, R. (1995). Colony aggregations in *Apis mellifera* L. **Apidologie**, 26, 119-130.
- OLIVEIRA, E. J. F. (2005). **Estrutura genética espacial do Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*)**. Tese de doutorado, Genética, FMRP-USP, 93 páginas.
- OLIVEIRA, E. J. F.; FREITAS, G. S.; FONSECA, A. S.; SOUSA A. C. B.; CAMPOS, T.; ASSIS, A. F.; SOUZA, A. P.; CONTEL, E. P. B.; SOARES, A. E. E. (2009). Isolation and characterization of microsatellite markers from the stingless bee *Nannotrigona testaceicornis*. **Conservation Genetics Resources**, 1(1), 97-99.
- PAGE, R. E. (1986). Sperm utilization in social insects. **Ann. Rev. Entomol**, 31, 297-320.
- PALMER K. A.; OLDROYD B. P. (2000). Evolution of multiple mating in the genus *Apis*. **Apidologie**, 31, 235-248.
- PAXTON, R. J. (2000). Genetic structure of colonies and a male aggregation in the stingless bee *Scaptotrigona postica*, as revealed by microsatellite analysis. **Insectes sociaux**, 47, 63–69.
- PAXTON, R. J.; BEGO, L. R.; SHAH, M. M.; MATEUS, S. (2003). Low mating frequency of queens in the stingless bee *Scaptotrigona postica* and worker maternity of males. **Behav Ecol Sociobiol**, 53, 174-181.
- PAXTON, R. J.; WEIßSCHUH, N.; ENGELS, W.; HARTFELDER, K.; QUEZADA-EUAN, J. J. G. (1999). Not only single mating in stingless bees. **Naturwissenschaften**, 86, 143-146.

- PÉPIN, L.; AMIGUES, Y.; LÉPINGLE, A.; BERTHIER, J.-L.; BENSALD, A.; 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.
- PEREIRA, J. O. P. (2006). **Diversidade genética da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata* baseada no seqüenciamento das regiões ITS1 parcial e 18S do DNA ribossômico nuclear**. Tese de doutorado, Zootecnia, UFCE, 142p.
- PETERS, J. M.; QUELLER, D. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; 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.; STRASSMANN, J. E. (1999). Mate number, kin selection, and social conflicts in stingless bees and honeybees. **Proceedings of the Royal Society**, 266, 379-384.
- POTTS, S. G.; WILLMER, P. (1998). Compact housing in built-up areas: spatial patterning of nests in aggregations of a groundnesting bee. **Ecological Entomology**, 23, 427-432.
- RATNIEKS, F. L. W. (1990) The evolution of polyandry by queens in social Hymenoptera: the significance of the timing of removal of diploid males. **Behav Ecol Sociobiol**, 26, 343-348.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. (1995). GENEPOP Version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, 86, 248-249.
- RITLAND, K. (2006). **Mark – Genetic Marker Analysis Program**. Version 2.1.

- ROSS, K. G. (1986) Kin selection and the problem of sperm utilization in social insects. **Nature**, 323, 798-800.
- ROUBIK, D. W. (1989). **Ecology and natural history of tropical bees**, Cambridge University Press.
- ROUBIK, D. W. (2006). Stingless bee nesting biology. **Apidologie**, 37, 124–143.
- SAKAGAMI, S. F. (1982). Stingless bee. In: **Social Insects**. H. R. Hermann, Ed., Academic Press, New York, p. 361-423.
- SANGUINETTI, C. J.; NETO, E. D.; SIMPSON, A. J. D. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, 17, 209-214.
- SAVARD, J. L.; CLERGEAU, P.; MENNECHEZ, G. (2000). Biodiversity concepts and urban ecosystems. **Landscape and Urban Planning**, 48, 131-142.
- SCHLÖTTERER, C.; WIEHE, T. (1999). **Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps**, In D.B. Goldstein & C. Schlötterer (eds.), *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford University Press, New York, p.238-248.
- SIH, A.; JONSSON, B. G.; LUIKART, G. (2000). Habitat loss: ecological, evolutionary and genetic consequences. **Trends in Ecology and Evolution**, 15, 132-134.
- SILVA, P. A. H; PASSOS, E. (2009). **A teoria dos refúgios florestais: distribuição e evolução das paisagens ao fim do pleistoceno**. *Geografar* Revista eletrônica do programa de Pós-graduação em Geografia da Universidade Federal do Paraná. *Disponível em:* <www.ser.ufpr.br/geografar>

- SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. (2002). **Abelhas Brasileiras - Sistemática e Identificação**. Ed. IDM Composição e Arte, Belo Horizonte.
- SIQUEIRA, E. L.; MARTINES, R. B.; NOGUEIRA-FERREIRA, F. H. (2007). Ninhos de abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Meliponina) em uma região do rio Araguari, Araguari-MG. **Biosci. J.**, 23(1), 38-44.
- STRASSMANN, J. E. (2001). The rarity of multiple mating by females in the social Hymenoptera. **Insectes sociaux**, 48, 01-13.
- STRASSMANN, J. E.; SOLIS, C. R.; PETERS, J. M.; QUELLER, D. C. (1996). **Strategies for finding and using highly polymorphic DNA microsatellite loci for studies of relatedness and pedigrees**, In: Ferraris, J. D.; Palumbi, S. R. (eds), *Molecular Zoology: Advances, strategies, and protocols* Wiley-Liss, Inc. p. 163-180.
- STRASSMANN, K.; BAREFIELD, K.; SOLIS, C. R.; HUGHES, C. R.; QUELLER, D. C. (1997). Trinucleotide microsatellite loci for a wasp *Polistes*. **Molecular Ecology**, 6, 97-100.
- WEBER, J. L. (1990). Informativeness of human (dC-dA)_n×(dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, 7, 524-530.
- WILLE, A. (1983). Biology of the stingless bees. **Annu. Rev. Entomol.** 28, 41–64, 1983.
- YOSHIKAWA, K.; OHGUSHI, R.; SAKAGAMI, S. F. (1969). Preliminary report on Osaka City University 5th scientific expedition to Southeast Asia 1966. **Nature and Life in Southeast Asia**, 6, 153-182.

IX. ANEXOS

Tabela 25 – Frequência alélica - agregação SUL.

		Marcador							
Alelos		Ntes02	Ntes34	Ntes37	Ntes41	Ntes50	Ntes59	Ntes70	Ntes73
	1	1,000							
	2			1,000	0,375	0,072	0,100		1,000
	3		0,125		0,625		0,043	1,000	
	4		0,594				0,300		
	5						0,557		
	6		0,281						
	9					0,171			
	10					0,414			
	11					0,343			

Tabela 26 – Frequência alélica – agregação OFI.

		Marcador							
Alelos		Ntes02	Ntes34	Ntes37	Ntes41	Ntes50	Ntes59	Ntes70	Ntes73
	1	1,000							0,241
	2			1,000	0,365		0,040		0,728
	3		0,669		0,635			1,000	0,032
	4		0,187				0,381		
	5						0,193		
	6		0,145				0,136		
	7						0,165		
	8					0,207	0,085		
	9					0,287			
	10					0,253			
	11					0,121			
	12					0,132			

Tabela 27 – Frequência alélica – agregação CAM.

		Marcador							
Alelos		Ntes02	Ntes34	Ntes37	Ntes41	Ntes50	Ntes59	Ntes70	Ntes73
	1	1,000							
	2			1,000	0,306				0,625
	3		0,553		0,333			1,000	0,375
	4		0,467		0,361		0,778		
	7						0,222		
	10					0,618			
	11					0,235			
	13					0,147			

Tabela 28 – Frequência alélica – agregação UBE.

		Marcador							
Alelos		Ntes02	Ntes34	Ntes37	Ntes41	Ntes50	Ntes59	Ntes70	Ntes73
	1	1,000			0,406		0,066		
	2		0,094	1,000	0,198				1,000
	3		0,755		0,208		0,189	1,000	
	4		0,151		0,188		0,509		
	5						0,236		
	9					0,481			
	10					0,163			
	12					0,221			
	13					0,135			

Tabela 29 – Frequência alélica – agregação BON.

		Marcador							
Alelos		Ntes02	Ntes34	Ntes37	Ntes41	Ntes50	Ntes59	Ntes70	Ntes73
	1	1,000		0,009		0,009			0,089
	2		0,155	0,991	0,304		0,154		0,911
	3		0,250		0,402		0,096	1,000	
	4		0,202		0,294		0,394		
	5		0,107				0,250		
	6		0,286				0,106		
	9					0,300			
	10					0,227			
	11					0,345			
	12					0,118			

Tabela 30 – Frequência alélica – agregação CAR.

		Marcador							
Alelos		Ntes02	Ntes34	Ntes37	Ntes41	Ntes50	Ntes59	Ntes70	Ntes73
	1	1,000	0,096	0,200	0,032	0,120	0,120	0,080	0,050
	2		0,138	0,800	0,681		0,040	0,240	0,880
	3		0,606		0,287	0,050		0,680	0,070
	4		0,043				0,100		
	6		0,117				0,650		
	7					0,090			
	8						0,090		
	9					0,090			
	10					0,240			
	11					0,110			
	12					0,090			
	15					0,210			