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

Desenvolvimento e Caracterização de Marcadores Microssatélites de *Scaptotrigona aff depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

CAMILA CALIXTO MOREIRA DIAS

RIBEIRÃO PRETO - SP
2011

CAMILA CALIXTO MOREIRA DIAS

Desenvolvimento e Caracterização de Marcadores Microssatélites de *Scaptotrigona aff depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

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
2011

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

Dias, Camila Calixto Moreira.

Desenvolvimento e Caracterização de Marcadores Microssatélites de *Scaptotrigona aff depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Camila Calixto Moreira Dias; orientador: Ademilson Espencer Egea Soares.

--Ribeirão Preto, 2011

96p.

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

Orientador: Soares, Ademilson Espencer Egea

1. *Scaptotrigona aff depilis.* 2. Meliponíneos. 3. Genética de populações. 4. Microssatélites. 5. SSR. 6. Biblioteca enriquecida.

Este trabalho é dedicado aos meus pais Tadeu e Cidinha, aos meus irmãos Sara e Leonardo, ao meu marido Otávio e a minha princesinha Betina; minha querida e amada família.

- A **Deus**, pelo dom da vida, por ter permitido que tudo pudesse se realizar conforme a sua vontade e por iluminar e abençoar os meus caminhos.
- Aos meus queridos pais **Tadeu e Cidinha** que com todo seu carinho, dedicação, amor e compreensão me deram forças e incentivo para continuar realizando os meus sonhos. Amo vocês!!!!
- Ao meu querido e amado marido **Otávio,** pelo carinho, dedicação, amizade, amor, compreensão (por minhas ausências durante a realização deste trabalho) e principalmente por me dar o nosso bem mais precioso, a nossa linda princesa **Betina.** *Arodo* vocês!!!!
- Aos amados irmãos **Sara, Leonardo e Eunice** (prima irmã), pelo companheirismo, pelas brigas e reconciliação, pelas brincadeiras, pela amizade, carinho, amor e pelos ótimos momentos que sempre passamos juntos. Amo vocês!!!!
- Aos queridos Tios **Pedro, Lurdinha, Tereza e Euripedes** que em muitos momentos contribuíram para a minha formação profissional e principalmente pela minha formação pessoal.
- Ao Professor Dr. ***Ademilson Espencer Egea Soares*** pela oportunidade que me deu quando eu ainda era uma graduanda, pela contribuição em minha formação profissional, pela amizade e orientação, pela confiança em mim depositada na realização deste trabalho e pelos bons momentos de descontração.
- À **Dra. Geusa Simone de Freitas** pela colaboração, ensinamentos, conselhos e sua amizade sincera.
- Ao Professor **Dr. Weyder Cristiano Santana** (Departamento de Biologia Animal - Universidade de Viçosa) por apresentar-me ao mundo das abelhas, pelos ensinamentos, por emprestar as teses e dissertações antigas que são seu tesouro (Eu e a Aninha já devolvemos todas!!!!), pela amizade e pelos bons momentos de descontração durante o período em que esteve em Ribeirão Preto.
- À Professora **Drª Eucleia Primo Betioli Contel**, por permitir a utilização de seu laboratório para realização deste trabalho e principalmente pela paciência com a nossa “falação e Cantoria” no laboratório.

- À minha querida amiga e "irmã" **Ana Rita** (Aninha), pelos bons momentos que passamos juntas em nossa época de faculdade e estágio, pelo carinho, amor, compreensão e principalmente pela mais sincera e verdadeira amizade. Borsa do meu coração amo você!!!!
- Às melhores amigas do mundo **Aline Simoneti, Aline Mackert e Amanda,** pelo companheirismo, pelo carinho, pela eterna amizade e por todos os bons momentos que passamos juntas. Borsas amo vocês. Perto ou longe vocês estão sempre em meus pensamentos.
- Às queridas amigas **Marcela e Juliana,** pela disponibilidade em me ajudar em todos os momentos em que precisei, pela grande ajuda com os programas estatísticos, correções da dissertação, pelo carinho e principalmente pela amizade sincera. Gordinhas vocês moram no meu coração!!!!
- Ao amigo **Paulo Emílio** pelo cuidado que teve comigo durante a minha gravidez (corando todos os meus géis), pela amizade, brincadeiras e piadas e pela nossa aventura em Piracicaba durante o desenvolvimento de nossas bibliotecas.
- Ao técnico **Jairo de Souza**, pelo auxílio imprescindível nas coletas, pelas aventuras no *Campus* da USP com a nossa velha amiga Kombi e principalmente pela amizade.
- Aos abelhudos e grandes amigos **Ivan Akatsu, Omar, Eddy, Mauro, Ivan Castro,** pelas brincadeiras, pelo companheirismo e amizade.
- Aos queridos amigos do Bloco B do Dep. de Genética, **Maria, Edna, Ana Lúcia, Profª Ana Lília, Ronai, Romulo, Profº Aguinaldo, Flávia, Nathália, Claudia Caixeta, Juliana e Edilene,** muito obrigada pelos bate papos na hora do café e pela amizade.
- À **Elisabete** pela ajuda técnica no laboratório, pela amizade, pelas conversas e brincadeiras durante as paradinhas para o cafezinho da manhã e da tarde.
- À **Claudia e Rosana**, pelo carinho, amizade e pelos nossos passeios ao shopping durante nosso horário de almoço.
- Aos colegas, presentes e passados do Bloco A do dep. de Genética, **Vera, Pedro, Profa. Zilá, Profa. Márcia, Prof. Klaus, Prof. Lionel, Prof. David, Profa. Ana Maria Bonetti, André, Francis, Sávio, Sérgio, Mônica, Juliana, Aline Aleixo, Flávia, Tita, Lili, Vanessa, Lívia, Taty, Rodrigo, Moisés, Michelle Prioli, Michelle**

Manfrini, Fabrício, Tiago, Daiana, Carlitos, Umberto, Érica, Karina, Marina, Van, Anete, Rogério, Gesline, Mipsi.

- À Drª **Andréa Carla Quiapim**, pelo sequenciamento das amostras da biblioteca, importante etapa deste trabalho.
- À **Susie, Maria, Sílvia** e **Gustavo**, secretários do Dep. de Genética, pela dedicação e trabalho imprescindíveis.
- Aos **alunos do Dep. de Genética** pela agradável convivência.
- Aos docentes do Dep. de Genética pelos conhecimentos repassados e contribuição na minha formação.
- Aos membros da banca examinadora pela contribuição ao trabalho.
- À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto Biota.
- À CAPES pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

Resumo..... 10
Abstract..... 11
1. Introdução..... 12
1.1 As Abelhas indígenas sem ferrão (tribo Meliponini)..... 13
1.2 Gênero *Scaptotrigona*..... 15
1.3 Microssatélites..... 18
2. Objetivos..... 23
3. Material e Métodos..... 25
3.1 Material Biológico..... 26
3.2 Extração de DNA total..... 28
3.3 Construção da biblioteca enriquecida em marcadores microssatélites para *S. aff depilis*..... 29
3.3.1 Digestão e ligação dos adaptadores..... 29
3.3.2 Pré-amplificação via PCR..... 31
3.3.3 Purificação do DNA..... 31
3.3.4 Seleção dos fragmentos contendo microssatélites..... 31
3.3.5 Amplificação dos fragmentos selecionados..... 34
3.3.6 Ligação do inserto ao Plasmídio, Transformação e Extração de DNA plasmidial..... 34
3.3.7 Sequenciamento dos clones positivos..... 36
3.3.8 Análise das sequências e desenho dos primers..... 36
3.4 Ensaios de amplificação dos marcadores microssatélites desenvolvidos para *S. aff depilis*..... 37
3.5 Ensaios de amplificação heteróloga..... 38
3.6 Estudo de polimorfismo dos locos microssatélites desenvolvidos para *S. aff depillis*..... 38
3.6.1 Eletroforese..... 38
3.6.2 Coloração do gel com nitrato de prata e secagem..... 40
3.6.3 Determinação fenotípica..... 41
3.7 Análises estatísticas..... 41
3.7.1 Caracterização da diversidade genética com os marcadores desenvolvidos..... 41
3.7.2 Estimativa do desequilíbrio de ligação..... 42
3.7.3 Análise de diversidade genética, equilíbrio de Hardy-Weinberg e endogamia..... 42

4. Resultados..... 43
4.1 Construção da biblioteca enriquecida e desenho dos primers..... 44
4.2 Otimização dos locos microssatélites..... 47
4.3 Caracterização dos locos microssatélites..... 47
4.4 Desequilíbrio de ligação..... 53
4. 5 - Ensaios de amplificação heteróloga..... 55
4.6 Diversidade Genética de *S. aff depilis*..... 56
4.6.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg..... 58
4.6.2 Coeficiente de endogamia (F_{is}) e Diferenciação Populacional (F_{st})..... 60
4.6.3 Alelos exclusivos..... 61
5. Discussão..... 62
5.1 Caracterização dos locos..... 63
5.2 Desequilíbrio de ligação..... 65
5. 3 Ensaios de amplificação heteróloga..... 65
5. 4 Diversidade Genética de *S. aff depilis*..... 66
5.5 Equilíbrio de Hardy-Weinberg, Coeficiente de endogamia (F_{is}) e Diferenciação Populacional (F_{st})..... 67
6. Conclusões..... 69
7. Referências Bibliográficas..... 72
8. Anexo..... 83

DIAS, C. C. M. **Desenvolvimento e Caracterização de Marcadores Microssatélites de *Scaptotrigona aff depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)** 2011. 96p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

As abelhas da tribo Meliponini são conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão. São encontradas em áreas tropicais e subtropicais do mundo e estão entre os principais polinizadores da flora brasileira, no entanto, a maioria das espécies estão seriamente ameaçadas de extinção devido a fragmentação dos ecossistemas onde vivem, causados principalmente pelas queimadas e desmatamento. *Scaptotrigona aff depilis* é uma espécie de abelha indígena sem ferrão que vive em ocos de árvores com colônias bastante populosas. As operárias são de porte pequeno e possuem uma coloração preta fosca. No Brasil, elas são encontradas no Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Minas Gerais. Assim como para a maioria dos meliponíneos os estudos populacionais para esta espécie são muito escassos, fazendo-se necessário a ampliação desses estudos para uma melhor compreensão da dinâmica populacional da espécie para futuras estratégias de manejo e conservação. Este trabalho teve como objetivo principal desenvolver um conjunto de marcadores microssatélites que possam ser úteis para futuros estudos populacionais. Foi desenvolvido um conjunto de 20 pares de *primers* microssatélites, utilizando a técnica de biblioteca genômica enriquecida. Esses *primers* foram caracterizados em 90 abelhas de nove ninhos naturais coletados de sete regiões (Londrina-PR; Cornélio Procópio-PR; Piracicaba-SP; Ribeirão Preto-SP; Jardinópolis-SP Franca-SP e Uberlândia-MG). Dos 20 pares de *primers* desenhados e sintetizados, 17 tiveram sucesso na amplificação. O número de alelos por loco variou de 3 a 11 (média de 6,23). A heterozigosidade esperada variou de 0,345 a 0,863 e a heterozigosidade observada variou de 0,226 a 0,938. Os locos apresentaram alta probabilidade de exclusão de paternidade. O índice de diversidade genética dos locos (6,23) foi maior que os relatados em muitas espécies de abelha indígena sem ferrão. Não foram detectados indícios significativos de ligação entre os locos desenvolvidos. O teste de transferibilidade entre *S. aff depilis* e outras espécies de meliponíneos, demonstrou que as sequências que flanqueiam as regiões microssatélites são conservadas, uma vez que 10 pares de *primers* amplificaram em pelo menos quatro das sete espécies testadas. A diversidade alélica (2,4) nos ninhos estudados ficou abaixo do observado na literatura, este fato ocorreu devido ao baixo número de indivíduos amostrados por região. As estatísticas *F* mostraram que não ocorre endogamia entre os ninhos (F_{is}=-0,2410) e que eles estão estruturados (F_{st}=0,3810). Os resultados obtidos neste trabalho mostram que os *primers* desenvolvidos para a *S. aff depilis* são bem informativos e adequados para futuros estudos de distribuição da diversidade genética, estrutura populacional, agregação de ninhos, conservação e manejo, estudos de filogeografia e estudos de parentesco.

Palavras-chave: 1. *Scaptotrigona aff depilis*; 2. Meliponíneos; 3. Genética de populações; 4. SSR; 5. Microssatélites.; 6. Biblioteca enriquecida.

DIAS, C. C. M. **Development and Characterization of Microsatellite Markers for *Scaptotrigona aff depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).** 2011. 96p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Bees of the Meliponini tribe are known as stingless bees. They are found in tropical and southern subtropical areas throughout the world and are among the most important Brazilian flora pollinators. However, many species are in seriously extinction danger due to fragmentation of the ecosystems where they live, mainly caused by great extent burnings and deforestation. *Scaptotrigona aff depilis* is a stingless bee species which nests are found in tree cavities with highly populated colonies. The workers are small-sized and have a matte black color. In Brazil, they are found at Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso do Sul, São Paulo and Minas Gerais states. As for most meliponines, the population studies for this species are very scarce, making it necessary to expand these studies to better understand the population dynamics of the species for future conservation and management strategies. The present study aimed to develop a set of microsatellite markers that might be useful for future population studies, especially on stingless bees. It was developed a set of 20 pairs of microsatellite primers with the technique of enriched genomic library. Those primers were characterized in 90 bees from 9 natural nests sampled in seven different regions (Londrina-PR; Cornélio Procópio-PR; Piracicaba-SP; Ribeirão Preto-SP; Jardinópolis-SP; Franca-SP; Uberlândia-MG). Of the 20 primer pairs designed and synthesized, 17 were successful in amplification. The allele number per locus varied from 3 to 11 (mean=6.23). The expected heterozygosity ranged from 0.345 to 0.863 and observed heterozygosity from 0.226 to 0.938. The loci presented a high probability of paternity exclusion. The index of genetic diversity of loci (6.23) was higher than those reported in many stingless bee species. It was not detected significant evidences of linkage between developed loci. The transferability test between *S. aff depilis* and other meliponine species showed that the sequences flanking the microsatellite regions are conserved, since 10 pairs of primers amplified in at least four of the seven species tested. The allelic diversity (2.4) in the studied nests was lower than that observed in the literature; this may be due to the low number of individuals sampled per region. The *F* statistics showed non-occurrence of inbreeding between the nests (F_{is}=-0.2410) and that they are structured (F_{st}=0.3810). The obtained results demonstrate that the developed primers for *S. aff depilis* are very informative and suitable for further studies of the distribution of genetic diversity, population structure, aggregation of nests, conservation and management studies, phylogeography and kinship studies.

Key-words: 1. *Scaptotrigona aff depilis.* 2. Meliponines. 3. Population genetics. 4. SSR 5. Microsatellites.. 6. Library enriched

1. INTRODUÇÃO

1.1 - As Abelhas indígenas sem ferrão (tribo Meliponini)

As abelhas são insetos que pertencem à ordem Hymenoptera cujo nome é derivado do grego (*hymen* = membrana; *ptero* = asas) e estão reunidas taxonomicamente na família Apidae (Michener, 2007).

Segundo Michener (2007), Apidae é uma das famílias mais diversas de abelhas, com o maior número de tribos e com espécies de abelhas com comportamentos que vão desde hábitos solitários a altamente sociais, espécies parasitas sociais e cleptoparasitas, e variações com relação ao substrato para nidificação como solo e cavidades pré-existentes (como ocos de árvores).

A família Apidae é divida em três subfamílias: Xylocopinae, Nomadinae e Apinae sendo esta a maior e mais diversificada, a qual pertence a tribo Meliponini.

As abelhas desta tribo são conhecidas como "abelhas indígenas sem ferrão", porque possuem seu acúleo (ferrão) atrofiado (Michener, 2007). São encontradas em áreas tropicais e subtropicais do mundo, mas sua maior diversidade é observada nas regiões neotropicais, com mais de 300 espécies descritas e na região Indo-Malaia, com cerca de 60 espécies, sendo que certos táxons são restritos às regiões subtropicais do hemisfério sul (Camargo & Pedro, 1992). No Brasil, onde foram descritas aproximadamente 192 espécies pertencentes a 27 gêneros, essa tribo é bastante representativa (Silveira *et al*., 2002).

Os meliponíneos variam muito de tamanho e apresentam comportamento eussocial, embora algumas espécies como no gênero *Lestrimelitta* sejam cleptobióticas (Silveira *et al.,* 2002). Diferente dos Apini, os Meliponini de maneira geral fecundam apenas uma vez, a rainha fisogástrica não pode voar, utilizam uma mistura de cera e resina (cerume) na construção dos ninhos, não usam água para refrigerar seus ninhos, os machos alimentam-se nas flores (Roubik, 2006). Suas colônias variam de poucas dúzias a centenas ou mais de operárias, vivem em colônias "permanentes" e apresentam castas (fêmeas comportamentais e morfologicamente diferentes) denominadas operárias e rainhas (Michener, 2000; Michener, 2007).

Diversos substratos são utilizados como local de nidificação por estas abelhas. A maioria das espécies faz seus ninhos preferencialmente em ocos de árvores. Algumas

espécies podem nidificar em cavidades no solo, como *Trigona recursa* (feiticeira)**;** em ninhos desativados de pássaros ou em paredes de casas, como *Tetragonisca angustula* (jataí); em termiteiros abandonados ou ativos, como *Scaura latitarsis* e *Partamona cupira* que podem viver em termiteiros ativos. Há ainda espécies que constroem ninhos expostos ou semiexpostos, em galhos de árvores ou fendas nas rochas, como a *Trigona spinipes* e *Trigona hyalinata* (Kerr *et al*., 1996; Velthuis, 1997; Michener, 2000).

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 a preta), cujo comprimento varia de acordo com a espécie. Este grupo necessita de alimento durante todo o ano, ao contrário das espécies solitárias que entram em diapausa durante períodos de escassez de alimento (Freitas, 2001).

Algumas espécies de abelhas são conhecidas pelo excelente mel que produzem, sendo geralmente criadas para esta finalidade (Cortopassi-Laurino, *et al*., 2006). O mel de *Tetragonisca angustula* (jataí) chega a ser de oito a dez vezes mais caro que o mel de *Apis meliffera* (Nogueira-Neto, 1997). Porém o papel ecológico fundamental dos meliponíneos é a polinização cruzada que ajuda a manter a biodiversidade das espécies vegetais. A polinização para o visitante floral é uma consequência da coleta de um recurso alimentar (pólen e/ou néctar), mas para a planta é uma maneira de aumentar ao máximo o fluxo de genes.

De acordo com Kerr *et al.* (1996) as abelhas sem ferrão seriam responsáveis pela polinização de 40 a 90% das árvores nativas, dependendo do ecossistema. Há dados de que no cerrado 60% a 75% das espécies vegetais sejam polinizadas pelos meliponíneos (Silberbauer-Gottsberger & Gottsberger, 1998).

1.2 - Gênero *Scaptotrigona*

O gênero *Scaptotrigona* possui abelhas que se enquadram entre as mais robustas dentro dos Meliponini, o corpo das operárias mede de 5mm a 7mm e é caracterizado por sua pigmentação negra (Michener, 2000). Constituem colônias muito populosas, cujas abelhas são muito agressivas, pertencendo ao tipo popularmente denominado "torce-cabelos" (Nogueira-Neto, 1970).

O grupo desse gênero distribui-se por toda a região neotropical e apresenta uma grande diversidade de formas, muitas delas constituindo-se complexos de difícil separação. Os nomes utilizados para espécies presentes no Brasil são: *affabra* (Moure, 1989) [RO], *bipunctata* (Lepeletier, 1836) [MG, RS, SP], *depilis* (Moure, 1942) [MG, MS, PR, RS, SP], *fulvicutis* (Moure, 1964) [AP], *polysticta* (Moure, 1950) [MG], *postica* (Latreille, 1807) [MG, SP], *tubiba* (Smith, 1863) [BA, MG, SE, SP], e *xanthotricha* (Moure, 1950) [BA, ES, MG, RJ, SP]. Há ainda um grande número de espécies não descritas em todas as regiões brasileiras (Silveira *et al.*, 2002).

Os ninhos de *Scaptotrigona* são encontrados em cavidades de troncos de grandes árvores (Kerr, 1996; Nogueira-Neto, 1997), são construídos com cerume, uma mistura de cera e resinas (Nogueira-Neto, 1997; Michener 2000). A entrada do ninho (Figura 1) apresenta-se sob forma de um túnel de cerume que desemboca em um local perto das células de cria (Nogueira-Neto, 1970). À noite esse túnel não é fechado (em épocas de frio pode ocorrer o fechamento) e durante as horas de maior movimento, várias operárias guardam a entrada do túnel (Michener, 2000).

Figura 1. Vista frontal da entrada do ninho de duas espécies de abelhas do gênero *Scaptotrigona. 1- Scaptotrigona aff depilis*, 2- *Scaptotrigona bipunctata*. Fonte: Freitas, 2001.

Os alimentos, pólen e mel, são armazenados em potes ovalados, construídos de cerume e agrupados nas laterais do ninho. As células de cria são arranjadas em favos horizontais formando placas que se sobrepõem, lamelas de cerume envolvem os favos de cria, formando o invólucro que serve para conservar o calor (Kerr, 1996; Nogueira-Neto, 1997; Michener, 2000)

As colônias possuem extrema diferenciação de castas, com uma clara divisão de trabalho, sendo a comunicação entre os indivíduos muito eficiente, promovida principalmente pelos feromônios (Engels *et al*, 1997).

Freitas (2001) realizou um levantamento de ninhos no campus da USP em Ribeirão Preto, onde localizou 566 ninhos, distribuídos em 13 gêneros e 19 espécies. Este levantamento é executado continuadamente e conta atualmente com mais de 1000 ninhos identificados e mapeados. As espécies de *Scaptotrigona* que foram encontradas neste levantamento foram: *Scaptotrigona bipunctata e Scaptotrigona aff depilis*. Atualmente existem no campus da USP – RP 133 ninhos de *Scaptotrigona aff depilis.*

Scaptotrigona aff depilis é considerada uma espécie agressiva e bastante comum. Vivem em ocos de arvores e as colônias são bastante populosas, chegando à cerca 50.000 abelhas (Nogueira-Neto, 1997). No campus da USP - RP, seus ninhos são encontrados em ocos de vários tipos de árvores, incluindo o abacateiro (*Persea americana*) onde podem formar agregações (Figura 2). Segundo Roubik (1989), as operárias são de porte pequeno, medindo menos de 7mm de comprimento e tórax menor que 2mm, possuem uma coloração preta fosca com asas claras e venação

dourada, sendo conhecida popularmente como canudo ou canudo torce cabelo (Figura 3).

Estudos realizados por Yamamoto *et al*. (2007) mostraram que o mel produzido por essas abelhas pode ser explorado por constituir um mel limpo e de boa qualidade e por ter uma produção constante ao logo do ano.

Figura 2. Agregação de ninhos de *Scaptotrigona aff depilis* em tronco de árvore de abacateiro (*Persea americana*). As placas amarelas indicam o número do ninho e a sua entrada.

Figura 3. (A) Vista frontal de uma operária de *Scaptotrigona aff depilis*. (B) Vista lateral de uma operária de *Scaptotrigona aff depilis*. Fonte: Sylvia Maria Matsuda

1.3 - Microssatélites

Marcadores genéticos pode ser qualquer sítio no genoma onde existe variação na sequência de DNA, que é detectável como diferença entre indivíduos de uma população (Alberts *et al.*, 1997). Ultimamente esses marcadores vêm sendo utilizados para compreender estruturas genéticas de populações, fluxo gênico, viabilidade de populações, para quantificar os efeitos da fragmentação de habitats e como guia de estratégia de conservação (Collevatti *et al*. 2001a)

Os microssatélites ou SSR (sequências simples repetidas; Tautz, 1989) ou STRs (short tandem repeats ; Edwards *et al.,* 1991) são repetições em *tandem* de sequências constituídas de 2 a 6 nucleotídeos. São encontrados no genoma de todos os organismos conhecidos (Chambers, 2000) e estão distribuídos pela região eucromática do genoma (Schlötterer & Wiehe, 1999), mas são raros em regiões codificadoras (Hancock, 1999).

É uma classe de marcadores altamente polimórficos, uma vez que apresentam grande diversificação no tipo (mononucleotídeo à hexanucleotídeo) e no número de repetições encontrados nas diferentes espécies. Isto ocorre devido à alta taxa de mutação, variando de 10^{-2} a 10^{-6} eventos por loco por geração, comparado a regiões codificantes do genoma, que apresentam taxas de mutação entre 10^{-9} a 10^{-10} (Goldstein & Schlötterer, 1999). Para explicar as altas taxas de mutação encontrada nas regiões microssatélites, dois principais mecanismos são apontados como responsáveis:

— O primeiro mecanismo envolve o processo de recombinação desigual durante a meiose entre as cromátides irmãs (Harding *et al.,* 1992). Segundo esse modelo, a presença de sequências repetitivas aumentam a probabilidade de ocorrer um alinhamento desigual entre as cromátides irmãs durante a recombinação, originando modificações no tamanho da sequência de microssatélite.

— O segundo mecanismo envolve o processo de deslizamento da DNA polimerase durante a replicação (DNA *slippage*). Esses deslizes em regiões microssatélites acontecem quando a DNA polimerase avança ou recua durante a replicação em uma região repetitiva, aumentando ou diminuindo o número de repetições da sequência de DNA (Tachida & Lizuka, 1992).

A mutação é gerada quando o realinhamento das fitas de DNA após a replicação é imperfeito. Mas, nem todos os erros que ocorrem durante a replicação tornam-se mutações. Muitos são corrigidos pelos mecanismos de reparo como a ação de exonucleases e o *mismatch* pós-replicação (Li *et al,* 2002).

Dois modelos que explicam o processo mutacional dos *loci* microssatélites têm sido propostos: o modelo de alelo infinito (*Infinite Allele Model*, Kimura e Crow, 1964), e o modelo de mutação por passos (*Step-wise Mutation Model*, Kimura e Ohta, 1978). O modelo de alelo infinito 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 de mutação por passos é o mais aceito para microssatélites, admite que mutações em regiões microssatélites resultem na perda ou ganho de uma única unidade de repetição, e os alelos podem variar através de estados anteriormente presentes na população. Mutações ocorridas seguindo o modelo *Step-wise* podem levar à formação de alelos já existentes na população e, portanto, idênticos por estado, mas não por descendência. No caso de mutações seguindo o modelo de infinitos alelos, necessariamente dois alelos idênticos serão idênticos por descendência.

Segundo Goldstein & Schlötterer (1999), os microssatélites podem ser organizados em 4 classes: 1 – microssatélite perfeito: o motivo se repete sem interrupção de um outro motivo ou outra seqüência, 2 – Microssatélite imperfeito: apresentam outras sequências além daquelas repetidas em tandem, 3 – Microssatélite interrompido: inserção de um pequeno número de bases que não se encaixam na repetição do motivo, 4 – Microssatélite composto: são aqueles nos quais existe a repetição de mais de um tipo de motivo (Figura 4).

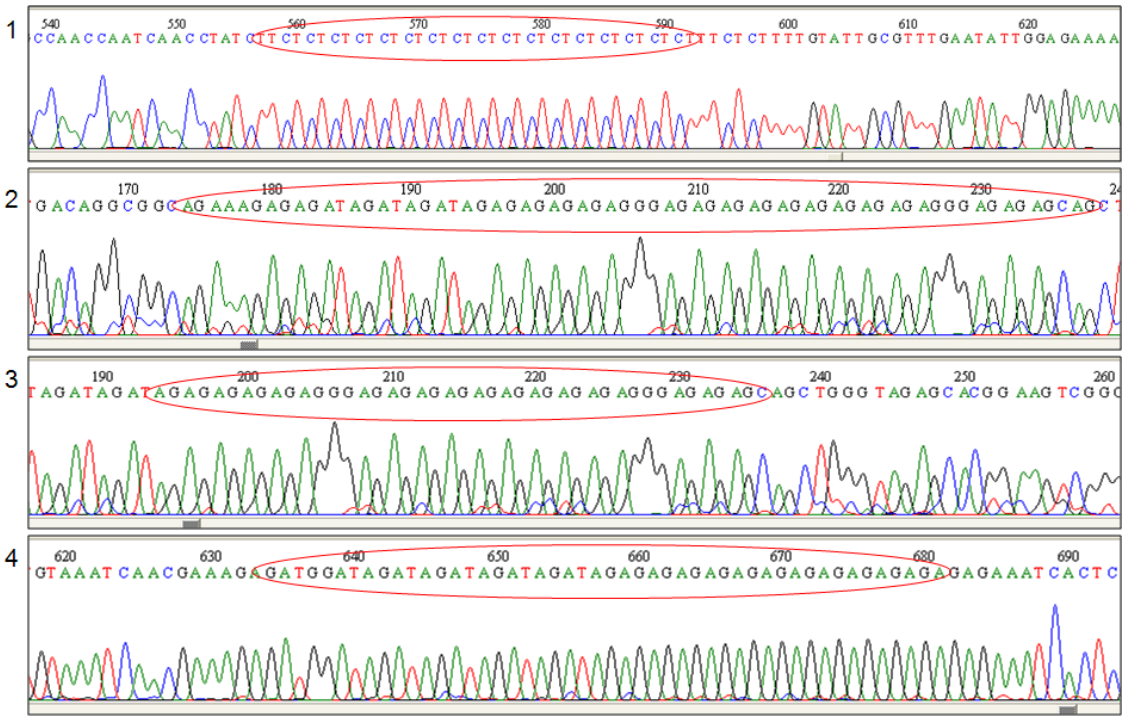

Figura 4: Classificação de microssatélites segundo Goldstein & Schlotterer (1999). 1- perfeito, 2- imperfeito, 3- interrompido e 4- composto.

Devido aos seus caracteres mendelianos, codominantes e polimórficos (Strassmann *et al*., 1996), os tornam excelentes marcadores moleculares para o estudo de mapeamento gênico, relações de parentescos (Chakraborty e Kimmel, 1999), variação intraespecífica (Moritz e Hilliz, 1996), hibridação, história populacional e filogeografia. Eles também são utilizados para avaliar o impacto do comportamento reprodutivo, estrutura social e dispersão em populações em extinção (Beaumont & Bruford, 1999). Atualmente, a utilização dos microssatélites é bastante difundida na análise de polimorfismo (Matioli & Passos-Bueno, 2001).

O estudo de microssatélites em abelhas começou em 1993, com a descrição de alguns "primers" desenhados para *Apis mellifera* e *Bombus terrestris* (ESTOUP *et al.,* 1993). Esse foi o ponto de partida para o uso desses marcadores em vários tipos de estudo.

A primeira utilização dos microssatélites como marcador em um estudo de estrutura gênica de populações de abelhas ocorreu em 1995 (ESTOUP *et al.,* 1995), envolvendo subespécies africanas e européias de *A. meliffera.* Em 1998 surgiu o primeiro trabalho com microssatélites em abelhas sem ferrão, descrevendo "primers" desenhados para *Melipona bicolor* (PETERS *et al*., 1998). Com a descrição de "primers"

desenhados para outros meliponíneos como *Scaptotrigona postica* (PAXTON *et al*., 1999a) e *Trigona carbonaria* (GREEN *et al.*, 2001), a utilização dos microssatélites em abelhas sem ferrão tomou novos rumos, com a aplicação desses marcadores em estudos comportamentais (PAXTON *et al*., 1999b, PETERS *et al*., 1999).

Até o momento foram isolados e caracterizados locos microssatélites para 10 espécies de abelhas sem ferrão: *Melipona bicolor* (Peters *et al.*, 1998), *Scaptotrigona postica* (Paxton *et al.*, 1999a), *Trigona carbonaria* (Green *et al.*, 2001), *Nannotrigona testaceicornis* (Oliveira *et al*., 2009), *Tetragonisca angustula* (Brito *et al*., 2009), *Melipona seminigra* (Francini *et al*., 2009), *Melipona rufiventris* (Lopes *et al*., 2009a) e *Melipona mondury* (Lopes *et al*., 2009b), *Plebeia remota (Francisco, et al*., 2011), *Frieseomelita Varia* (Gonçalves, *et al*., 2011) . Esse número tende a aumentar com o uso desses marcadores em estudos de impacto ambiental, comportamental, populacional entre outros.

A utilização de "*primers*" desenvolvidos para outras espécies (*primers* heterólogos), de preferência mais próximas taxonomicamente pode ser uma estratégia para iniciar um estudo antes de investir na construção de "*primers*" específicos (Queller *et al*., 1993; Parker *et al.,* 1998). Em um trabalho realizado por Tavares *et al.* (2007), para analisar a diversidade genética das espécies *Melipona mondury* e *Melipona rufiventris,* utilizando *primers* microssatélites desenhados para *Melipona bicolor* foi encontrada baixa diversidade genética e muitos locos foram monomorficos. Francisco *et al.* (2006) em seu trabalho com *primers* heterólogos em abelhas indígenas sem ferrão, também encontraram um baixo polimorfismo. Uma justificativa para esse baixo polimorfismo seria o uso de *primers* heterólogos. A utilização de *primers* heterólogos pode incorrer no aparecimento de alelos nulos, acarretando uma menor diversidade, pois qualquer mutação que ocorra na sequência de DNA complementar aos *primers* pode inibir ou impedir completamente a ligação destes (Callen *et al.,* 1993).

O aparecimento de alelos nulos é o principal responsável pela maioria das falhas ocorridas 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 (Pépin *et al.*, 1995).

Contudo, a obtenção desses *primers* tem um elevado custo e trabalho intensivo, considerando todas as etapas de seu desenvolvimento. Tradicionalmente o desenvolvimento de *primers* microssatélites envolve a construção de uma biblioteca genômica, hibridação com sondas contendo microssatélites, clonagem, sequenciamento dos clones hibridizados positivamente, desenho e teste dos primers. A etapa de seleção é trabalhosa e demorada, devido à baixa frequência de clones positivos (contendo repetições microssatélites). O número de clones positivos obtidos normalmente varia de 12% a menos de 0,04% do total de clones analisados (Zane *et al.*; 2002). Em geral, cerca de 10% a 20% dos *primers* são informativos, o que torna essa técnica trabalhosa e de custo elevado (Buso *et al.*; 2003).

O uso de bibliotecas enriquecidas e do conceito de "*primers* ancorados" tem facilitado o trabalho envolvido e reduzido o custo de obtenção de primers informativos em pelo menos cinco vezes (Buso *et al.*; 2003). A construção de uma biblioteca enriquecida também envolve um número de etapas relativamente grande, mas, a eficiência de seleção de clones positivos é bem maior que no método tradicional, sendo a eficiência de 40% a 50%. Uma vez obtidos os primers informativos para a espécie em estudo, os custos e a demanda de mão-de-obra são reduzidos e os ensaios laboratoriais são rápidos, aumentando a acessibilidade da técnica (Buso *et al.*; 2003).

A prática de enriquecimento de bibliotecas genômicas com a finalidade de identificar regiões ricas em sequências repetitivas vem sendo utilizada em estudos com várias espécies (Pinheiro, *et al.*, 2008; Brito *et al.*, 2009; Francini *et al.*, 2009, Guidugli *et al.,* 2009*;* Oliveira *et al.*, 2009;).

Segundo Oliveira *et al.*, 2009 os marcadores 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 ninhos de abelhas indígenas sem ferrão.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo desenvolver e caracterizar um conjunto de locos microssatélites de *Scaptotrigona aff depilis* para que possam ser utilizados em futuros estudos populacionais, de manejo e conservação da espécie.

A partir do objetivo geral proposto acima, o presente estudo tem por objetivos específicos:

- Isolar locos microssatélites para *S. aff depilis* através da metodologia de biblioteca genômica enriquecida;
- Caracterizar os locos microssatélites quanto ao número de alelos, heterozigose esperada e observada;
- Testar a transferibilidade dos locos microssatélites desenvolvidos para *S. aff depilis* em outras espécies de abelha indígena sem ferrão;
- Detectar a existência de alelos exclusivos de população;
- Caracterizar a distribuição das frequências alélicas dos microssatélites aqui desenvolvidos em *S. aff depilis;*
- Avaliar a diversidade genética de nove ninhos naturais através dos locos microssatélites desenvolvidos para *S. aff depilis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material Biológico

Para o desenvolvimento dos marcadores microssatélites (SSR, simple sequences repeats), foram utilizadas 20 abelhas operárias de *Scaptotrigona aff depilis* coletadas de um ninho natural na área do *Campus* da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto– SP (Figura 5).

Na caracterização dos marcadores microssatélites e na análise da diversidade genética de *S. aff depilis,* 10 indivíduos por ninho foram analisados. No total nove ninhos naturais de *S. aff depilis* de sete localidades foram amostrados (Figura 6), sendo eles: Londrina-PR (um ninho); Cornélio Procópio-PR (um ninho); Piracicaba-SP (dois ninhos); *Campus* da USP em Ribeirão Preto-SP (um ninho); Ribeirão Preto-SP (um ninho); Jardinópolis-SP (um ninho); Franca-SP (um ninho) e Uberlândia-MG (um ninho) (Tabela 1).

Figura 5: Imagem de satélite mostrando a área do *Campus* da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto. Fonte: *Google Earth.*

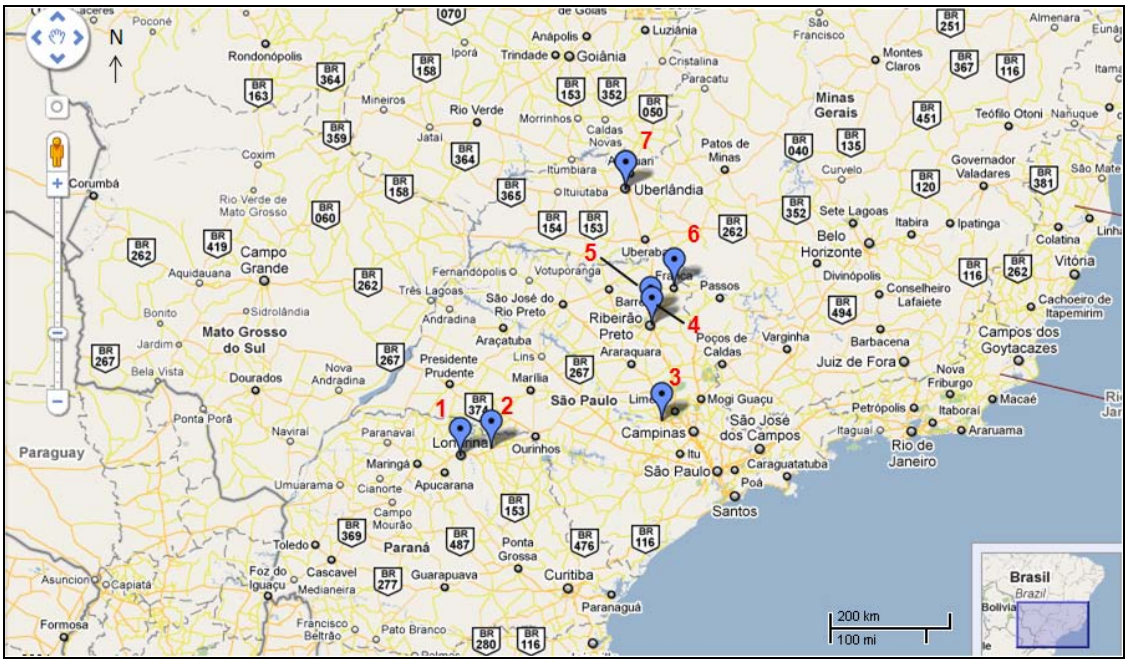

Figura 6: Mapa parcial do Brasil mostrando os pontos de coletas: 1) Londrina-PR (um ninho); 2) Cornélio Procópio-PR (um ninho); 3) Piracicaba-SP (dois ninhos); 4) Ribeirão Preto-SP (dois ninhos); 5) Jardinópolis-SP (um ninho); 6) Franca-SP (um ninho); 7) Uberlândia-MG (um ninho). Fonte: *Google maps.*

Tabela 1- Local de coleta dos ninhos e abreviação utilizada

Ninho	Abreviação
Rib. Preto - Campus USP	USP
Rib. Preto	RIB
Jardinópolis	JAR
Uberlândia	UBE
Piracicaba 1	PIR1
Piracicaba 2	PIR2
Franca	FRA
Cornélio Procópio	COP
Londrina	LON

3.2 - Extração de DNA total

Para o desenvolvimento da biblioteca o DNA genômico foi extraído de um pool de 20 abelhas, contendo cabeça e tórax. Este procedimento foi adotado para se ter a quantidade necessária de DNA no desenvolvimento da biblioteca. Na caracterização dos marcadores microssatélites a extração do DNA foi feita individualmente usando a cabeça e o tórax de cada abelha. O DNA genômico foi extraído através de um conjunto de reagentes, Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Segue abaixo o protocolo utilizado.

1) Em um tubo de microcentrifuga de 1,5ml colocar o tórax e a cabeça de 1 abelha e adicionar 60µl de EDTA (0,5M; ph=8,0) e 250µl de Nuclei Lysis Solution (Promega). Resfriar no gelo (a solução ficará turva);

2) Macerar a abelha;

3) Adicionar 10µl de *Proteinase k* (20mg/ml) à solução e agitar;

4) Deixar a solução em banho Maria à 65°C durante 2 horas;

5) Opcional: Acrescentar 1,5µl de RNAse à solução, misturando a amostra por inversão do tubo 2-5 vezes. Incubar a 37°C por 30 minutos. Após esse período deixar a amostra à temperatura ambiente por 5 minutos antes de continuar as próximas etapas;

6) Colocar 100µl de Protein Precipitation Solution (Promega). Misturar no vórtex durante 20 segundos e manter no gelo por 10 minutos;

7) Centrifugar a amostra durante 10 minutos a 13.000-15.000 rpm. As proteínas irão precipitar formando um *pelet* branco na parede do tubo;

8) Transferir o sobrenadante contendo o DNA para novos tubos e adicionar 300µl de Isopropanol (temperatura ambiente);

9) Misturar a solução invertendo o tubo gentilmente;

10) Centrifugar a amostra durante 2 minutos a 13.000-15.000 rpm. O DNA formará um *pelet* translúcido preso na parede do tubo. Descartar o sobrenadante cuidadosamente vertendo o tubo;

11) Colocar 300µl de Etanol 70% (gelado). Inverter gentilmente o tubo algumas vezes para lavar o DNA;

12) Centrifugar a amostra durante 2 minutos a 13.000-15.000 rpm;

13) Retirar cuidadosamente o sobrenadante, colocar na placa aquecedora a 40°C durante 30 minutos para evaporar o álcool;

14) Adicionar ao tubo com DNA 60-100µl de Água Mili-Q autoclavada. Incubar a 4°C *overnight.* Após este período armazenar o DNA à -20°C.

3.3 - Construção da biblioteca enriquecida em marcadores microssatélites para *S. aff depilis*

Os marcadores microssatélites foram desenvolvidos a partir de uma biblioteca genômica enriquecida, de acordo com a metodologia descrita por Billote, *et al*., 1999. Segue abaixo detalhes do processo.

3.3.1 - Digestão e ligação dos adaptadores

O DNA genômico foi digerido com uma enzima de restrição de corte frequente (*Rsa*I, Invitrogen) de forma que fossem obtidos fragmentos entre 200 e 900

pb (Figura 7). Em um tubo de microcentrífuga, adicionou-se 50 µl de água MilliQ, 10µl de tampão de reação (10X), 10 µl espermidina (40 mM), 5 µl de enzima (10u/µl) e 25 µl de DNA na concentração de 250 ng/µl (5 µg), em um total de 100 µl de reação. Ao final, incubou-se *overnight* a 37°C.

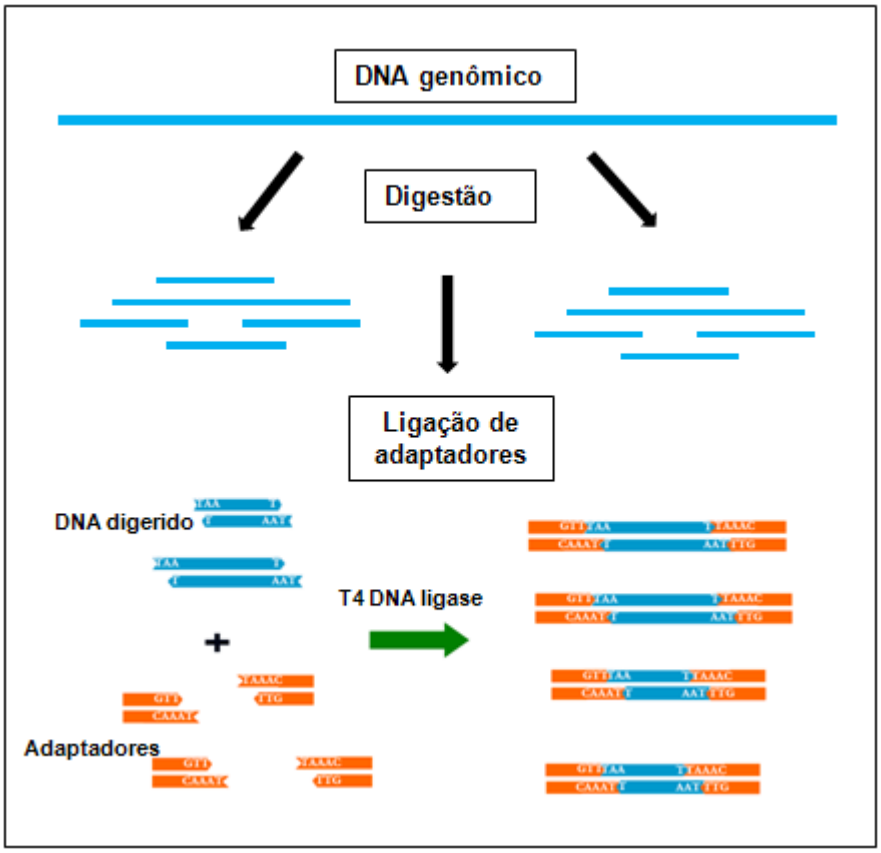

Figura 7. Etapas do desenvolvimento da biblioteca enriquecida em microssatélite: Digestão do DNA genômico e ligação dos adaptadores Rsa21 e Rsa25. Fonte: http://www.evoamazon.net/Legal_protocols/Protocolo%20Microssatelites.pdf (modificado).

Após a digestão, foram ligados adaptadores (Figura 7) com sequências conhecidas de 21 e 25 pb aos fragmentos digeridos (Figura 8). A ligação dos adaptadores tem como objetivo garantir que todos os fragmentos digeridos tenham uma terminação comum e conhecida.

Rsa21	5′	CTCTTGCTTACGCGTGGACTA	3′
Rsa25	3′	TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA	5′

Figura 8. Sequências dos adaptadores Rsa21 e Rsa25

Para a ligação dos adaptadores, adicionou-se 25 μl de água MilliQ, 5 μl de tampão de reação (10X), 2 μl Rsa21 (10μM), 2 μl Rsa25 (10μM), 4 μl da enzima T4 DNA ligase (1U/μl) e 12 μl do produto da digestão com Rsa I em um volume final de 50 μl. Ao final incubou-se no termociclador por duas horas a 20°C.

3.3.2 - Pré-amplificação via PCR

Após a ligação dos adaptadores, uma amplificação por PCR foi realizada. Esta pré-amplificação é realizada para garantir uma grande quantidade dos fragmentos e garantir que a ligação dos adaptadores tenha ocorrido.

A reação de PCR foi feita adicionando-se 27, 5 μl de água MilliQ, 5 μl de tampão (10X), 1,5 μl de $MgCl_2$ (50 mM), 4 μl de dNTP (2,5 mM), 2 μl do primer Rsa21 (10μM), 5 μl de *Taq* DNA polimerase (3u) e 5 μl do produto da ligação dos adaptadores. A reação foi submetida a uma temperatura de 95°C por 4 minutos e 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Ao final do ciclo uma elongação extra de 72°C por 8 minutos foi realizada.

3.3.3 - Purificação do DNA

Após a PCR foi realizada uma etapa de purificação do DNA resultante da pré-amplificação. Para este objetivo foi usado um Kit comercial de purificação (Quiaquick PCR purification Kit - Qiagen), seguindo o protocolo e as especificações do fabricante. Esta etapa teve como objetivo preparar o DNA para posterior seleção dos fragmentos de interesse.

3.3.4 - Seleção dos fragmentos contendo microssatélites

Após a etapa de purificação, foi feita uma seleção dos fragmentos contendo sequências de microssatélites. Os fragmentos foram selecionados por meio da hibridação com os oligonucleotídeos biotinilados $_{biotina}$IIIII$(CT)_8$ e $_{biotina}$IIIII$(GT)_8$ (sequências contendo os oligonucleotídeos CT ou GT repetidos oito vezes, cuja extremidade 5' está ligada a uma molécula de biotina) (Figura 9). Foram selecionados

fragmentos que continham as sequências repetitivas $(GA)_n$ e $(CA)_n$ (os dois motivos mais comuns em genomas eucariotos). Esses fragmentos foram recuperados pela ligação entre as moléculas de biotina e as moléculas de *streptavidina* associadas com esferas magnética - *beads* (Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles – Promega). A ligação entre a biotina e a *streptavidina* ocorre em função da alta afinidade molecular destes compostos (Figura 10).

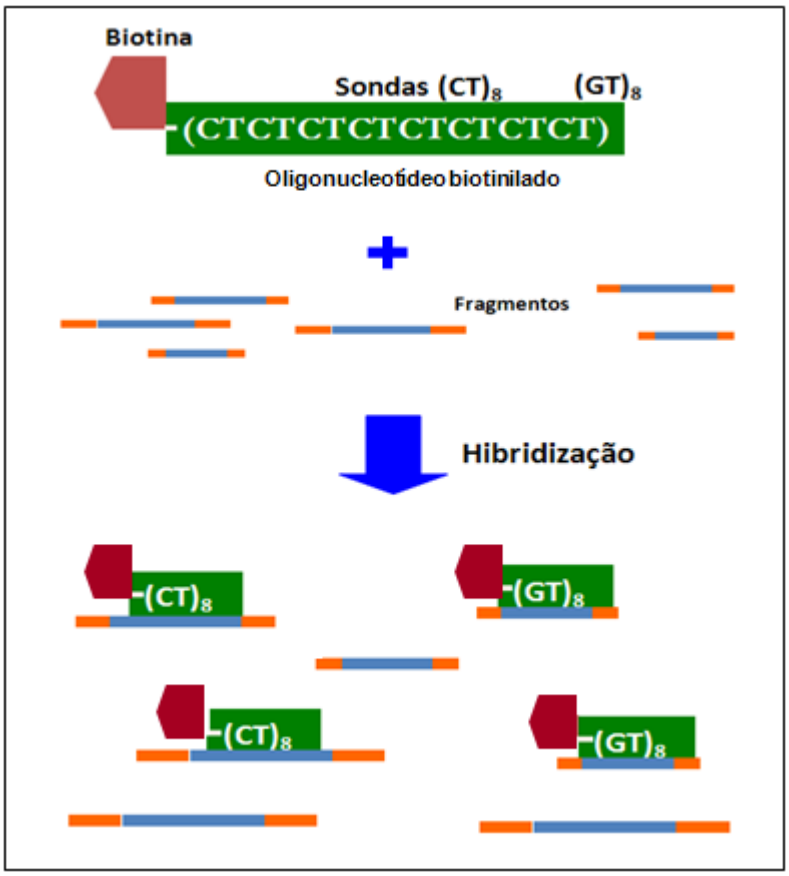

Figura 9. Etapas do desenvolvimento da biblioteca enriquecida em microssatélites: Hibridização de sondas (biotiniladas) de microssatélites com o DNA digerido e ligado a adaptadores. Fonte: http://www.evoamazon.net/Legal_protocols/Protocolo%20Microssatelites.pdf (modificado)

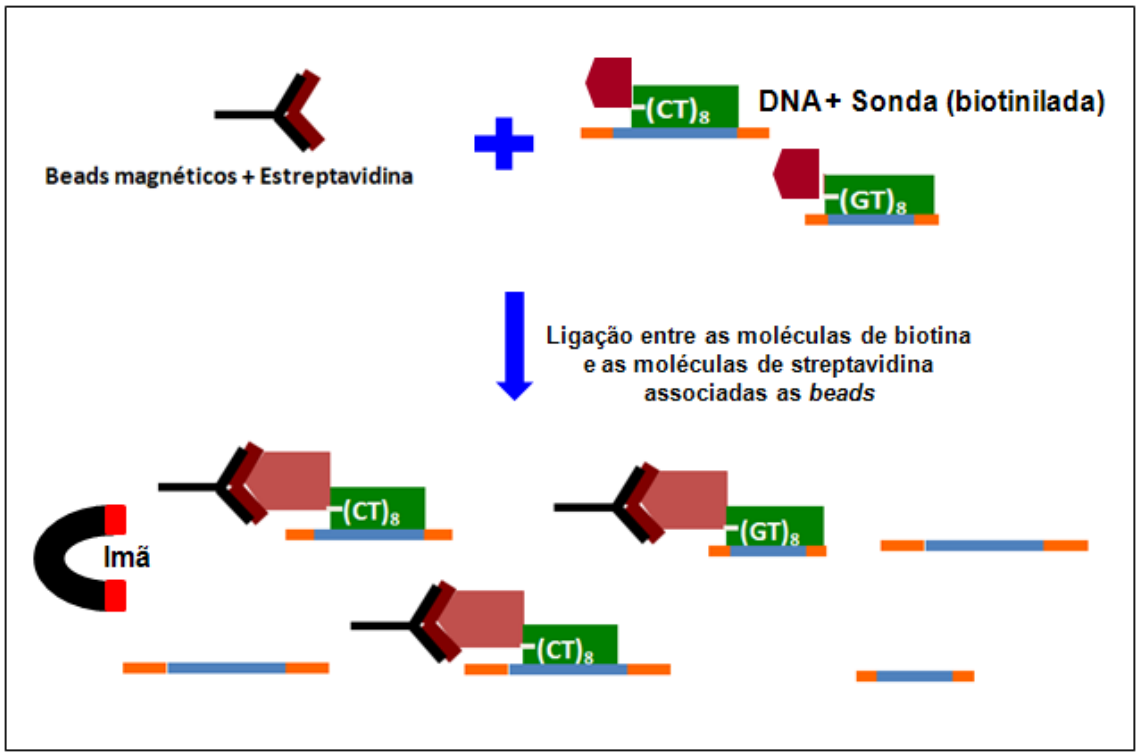

Figura 10. Etapas do desenvolvimento da biblioteca enriquecida em microssatélites: Seleção dos fragmentos por magnetização. Fonte: http://www.evoamazon.net/Legal_protocols/Protocolo%20Microssatelites.pdf (modificado).

Como as *beads* (esferas magnética marcadas com *streptavidina*) precisam de uma preparação prévia, homogeneizou-se um tubo do produto usando o vortex. Em seguida 600 µl do produto foram magnetizados (deixados aderir à parede) por 30 segundos, o sobrenadante foi aspirado e descartado. Após este processo, foram feitas três lavagens com 300 µl de SSC 0,5X. A cada lavagem, descartou-se o sobrenadante, segurando as *beads* na parede do tubo com o auxílio de uma rack Magna Separator Magnetic Particle (Promega). Ao final, as esferas foram ressuspensas em 100 µl de SSC 0,5X.

Para o preparo do DNA, juntou-se 400 µl de água MilliQ a 100 µl de DNA purificado**.** Esta solução foi incubada a 95°C por 15 minutos. Em seguida adicionou-se 13 µl de SSC 20X e 3 µl de cada sonda marcada com biotina - $_{biotina}$IIIII$(CT)_8$ e $_{biotina}$IIIII$(GT)_8$. Esta solução foi incubada à temperatura ambiente por 20 minutos, com agitação suave a cada dois minutos para que as sondas se hibridassem em regiões complementares. Após os 20 minutos, 100 µl de *beads* previamente lavadas foi adicionada a solução, sendo incubados por 10 minutos à temperatura ambiente agitando suavemente o tempo todo. Neste passo as *beads* ligaram-se a biotina das sondas, já que a *streptavidina* tem afinidade pela biotina. Após este procedimento, a

solução foi magnetizada por 30 segundos, o sobrenadante descartado e a solução ressuspensa em 300 µl de SSC 0,1X (esta etapa foi repetida por três vezes).

Para finalizar a solução foi ressuspensa em 100 µl de água MilliQ e magnetizada por 30 segundos. O sobrenadante foi reservado em um tubo de microcentrífuga e a solução foi novamente ressuspensa e magnetizada com 150 µl de água MilliQ. As duas partes foram misturadas num volume final de 250 µl e conservada a - 20°C.

3.3.5- Amplificação dos fragmentos selecionados

Após esta etapa de seleção, os fragmentos selecionados foram amplificados por PCR utilizando o *primer Rsa21,* nas seguintes condições: 20 µl dos fragmentos selecionados como DNA molde da reação, 4 µl de *primer* (10 µM), 10 µl de tampão de PCR (10X), 3 µl de $MgCl_2$ (50 mM), 8 µl de dNTP (2,5 mM), 0,5 µl de *Taq* Polimerase (3 U) (Invitrogen) e 54,5 µl de água MilliQ para completar 100 µl. A reação de PCR foi submetida a uma temperatura de 95°C por 1 minuto e 25 ciclos de: [94°C por 40 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 5 minutos]. Ao final do ciclo uma elongação extra a 72°C por 8 minutos foi realizada.

3.3.6 - Ligação do inserto ao Plasmídio, Transformação e Extração de DNA plasmidial

Os fragmentos (insertos) resultantes da reação de PCR foram ligados em plasmídeos pGEM-T Easy Vector System (Promega) (Figura 11). As reações seguiram as especificações do fabricante.

A transformação foi realizada em células competentes de *Escherichia coli* XL1-Blue de acordo com o protocolo descrito a seguir: 100 µl de células competentes foram incubadas com 8 µl de plasmídeos recombinantes e 32 µl de *transfo buffer* (proporção 1:4) por 15 minutos no gelo. Após este período 450 µl de meio LB líquido foi acrescentado e a solução foi incubada a 37°C por 50 minutos. A solução foi centrifugada a 3.000rpm por 30s e 350 µl do sobrenadante foi descartado. Este passo

foi importante para ter uma solução bem concentrada de células bacterianas para o plaqueamento. As células foram plaqueadas em meio LB-ágar com ampicilina (0,15 mg/ml) e X-Gal (0,10 mg/ml) e incubadas *overnight* a 37°C. As colônias recombinantes foram selecionadas para resistência ao antibiótico ampicilina e pelo sistema branco-azul (onde as colônias de cor branca foram transformadas e as azuis não) (Figura 12). As colônias brancas foram inoculadas em 5 ml de meio LB líquido com ampicilina e incubadas *overnight* a 37°C sob agitação. A extração plasmidial (miniprep) foi realizada através do Kit QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) seguindo especificações do fabricante.

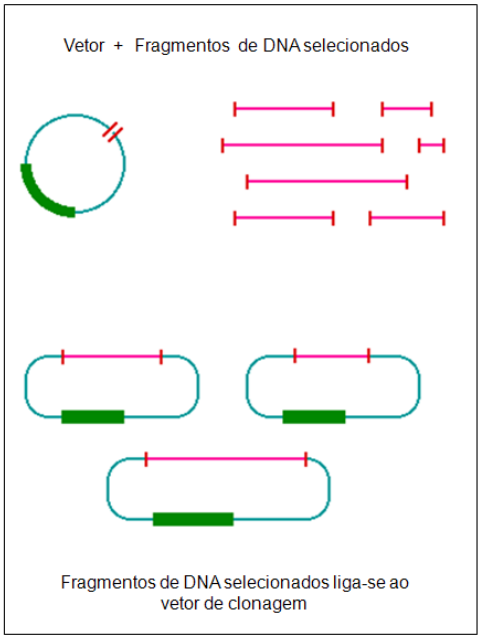

Figura 11: Etapas do desenvolvimento da biblioteca enriquecida em microssatélites: Ligação do inserto ao plasmídeo.

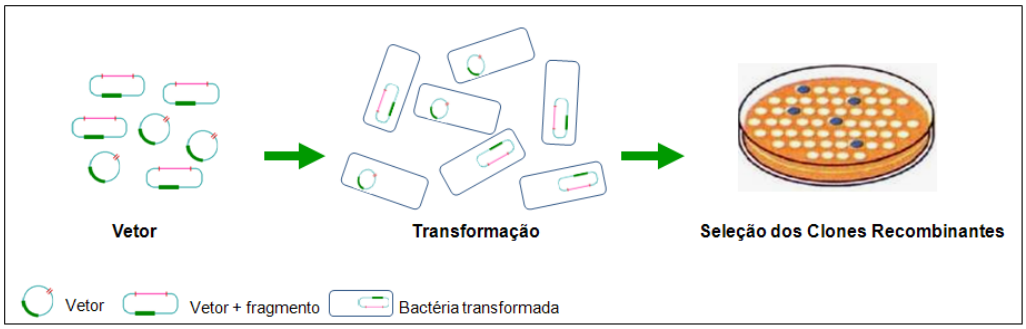

Figura 12: Etapas do desenvolvimento da biblioteca enriquecida em microssatélites: Transformação e seleção dos clones recombinantes.

3.3.7- Sequenciamento dos clones positivos

Os clones positivos foram sequenciados utilizando-se o conjunto de reagentes *"Big Dye Terminator v.3.1"* (Applied Biosystems) com os *primers* universais SP6 e T7.[1] O sequenciamento das duas fitas foi adotado visando à obtenção da seqüência correta de bases adjacentes aos microssatélites para desenho dos *primers*. As concentrações do DNA molde e dos *primers* seguiram as instruções do fabricante.

3.3.8– Análise das sequências e desenho dos *primers*

A visualização das sequências geradas pelo sequenciamento e a obtenção das fitas consenso (fragmentos sequenciados nas duas direções, ou seja, *forward* e *reverse*) foram feitas através do software Bioedit (Hall, 1999) (Figura 13). Para a identificação das regiões microssatélites, dentro das sequências obtidas, foi utilizada a ferramenta de busca "SSRIT - *The Simple Sequence Repeat Identification Tool*" (Temnykh et al., 2001) disponível na página http://www.gramene.org/db/markers/ssrtool. Essa ferramenta possibilita a localização apenas de microssatélites perfeitos, de forma que muitos potenciais locos de microssatélites imperfeitos e interrompidos podem não ser identificados. Assim buscas manuais também foram realizadas para identificação de possíveis microssatélites imperfeitos e interrompidos. As seqüências redundantes foram eliminadas.

Como critério para a seleção dos microssatélites a serem desenvolvidos, foi utilizado um número mínimo de cinco repetições para dinucleotídeos, quatro para os tri e três para os tetra, penta e hexanucleotídeos.

[1] Esta etapa foi realizada no Laboratório de biologia molecular de plantas da Universidade de São Paulo –Rib. Preto.

Figura 13: Visualização de uma das sequências geradas através do software Bioedit.

O programa Gene Runner foi utilizado para encontrar os adaptadores e os possíveis sítios da enzima *Rsa*I. Uma vez editadas, as seqüências foram transferidas para o programa PRIMER 3.0 (Rozen & Skaletsky, 2000) para desenho dos *primers.* Os critérios utilizados para o desenho dos *primers* foram: não conter bases redundantes; estar a uma distância adequada dos microssatélites (entre 20 a 60 pb); começar em 5' e terminar em 3' com duas bases G (guanina), ou C (citosina), ou G e C, se possível; porcentagem mínima de 30% de G e C e máxima de 60%; produtos de PCR com comprimento entre 120 e 250 pb; tamanho mínimo do primer de 18 pb e máximo de 22 pb e ter temperatura de pareamento entre 50°C e 60°C, com diferença máxima de 2°C entre as temperaturas dos *primers forward* e *reverse*, de modo que possam ser usados na mesma reação e não hibridem um com o outro, ou sofram auto-hibridação. Os *primers* foram sintetizados pela empresa IDT (Promega).

3.4 - Ensaios de amplificação dos marcadores microssatélites desenvolvidos para *S. aff depilis*

O DNA de nove abelhas operárias de *S. aff depilis* foi utilizado para testar e padronizar as condições de amplificação dos locos microssatélites. Foram realizados ensaios de temperaturas de pareamento entre 50°C - 60°C a fim de avaliar a melhor temperatura para amplificação de cada loco. A sequência geral das condições de amplificação foi a seguinte: 1 ciclo: 94°C por 3 minutos, 30 ciclos: 94°C por 1 minuto, 50-60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, 1 ciclo: 72°C por 10 minutos, 4°C indefinidamente.

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 15 µl contendo: 6,8 µl de água MilliQ autoclavada, 7,0 µl de GoTaq® Colorless Master Mix – Promega (1X), 0,2 µl de cada *primer* (2,5 µM) e 0,5 µl de DNA genômico. Os produtos amplificados

foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (uréia) e corados com nitrato de prata de acordo com o protocolo adaptado de Sanguinetti *et al.* (1994).

3.5 - Ensaios de amplificação heteróloga

Uma vez padronizada as condições de amplificação dos marcadores microssatélites desenvolvidos para *S. aff depilis*, testes de transferibilidade para sete espécies de abelha indígena sem ferrão foram realizados. Para esses experimentos, utilizaram-se amostras de DNA de dois indivíduos de cada espécie coletadas no *campus* da USP de Ribeirão Preto-SP. O DNA genômico foi extraído seguindo a metodologia descrita no item 3.2. As espécies utilizadas para o teste foram: *Oxytrigona tataira, Trigona spinipes, Plebeia droryana, Trigona hyalinata, Scaptotrigona bipunctata, Trigona recursa, Lestrimelitta limao.* No total 14 indivíduos foram utilizados para ensaios de amplificação heteróloga.

3.6 - Estudo de polimorfismo dos locos microssatélites desenvolvidos para *S. aff depillis*

A fim de avaliar o polimorfismo dos marcadores microssatélites desenvolvidos neste trabalho, realizou-se a genotipagem de 10 indivíduos por ninho de *S. aff depilis* (N=90), descritas anteriormente no subitem 3.1.

3.6.1 - Eletroforese

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese sob condições não desnaturantes e desnaturantes em géis de poliacrilamida 10%. Para a escolha da temperatura de pareamento dos *primers* microssatélites e confirmação da região de amplificação esperada, os produtos de PCR foram primeiro aplicados em géis de poliacrilamida 10% não-desnaturantes contendo um padrão de peso molecular de 50pb (Invitrogen) e 10pb (Invitrogen). Os géis não desnaturantes 10% (20 mL) possuíam: 1,4 mL de glicerol, 9,72 mL de H_2O destilada, 6,7 mL de solução acrilamida/bis-acrilamida (29:1), 2,0 mL de TBE (10X – 108,0 g de Tris; 53,0 g de ácido

bórico; 40,0 mL de solução de EDTA pH 8,0; completar o volume para 1 litro de H_2O), 15 μL de TEMED (tetrametiletilenodiamina- Pharmacia Biotech) e 300 μL de solução de persulfato de potássio.

Após a escolha da temperatura de pareamento e a confirmação da região de amplificação, as separações dos produtos de PCR foram feitas em géis de poliacrilamida 10% sob condições desnaturantes para a determinação fenotípica. Tais géis (20 mL) continham: 9,6 g de uréia, 6,67 mL solução de acrilamida/bis-acrilamida (29:1), 2,0 mL de TBE (10X), 15 μL de TEMED, 300 μL de solução de persulfato de potássio e água destilada.

Os géis polimerizados foram montados em cuba de eletroforese vertical contendo tampão TBE (1X – 100 mL Tampão TBE (10X); 900 mL H_2O) em ambos os pólos (porção superior e inferior). Esta cuba foi conectada a uma fonte de voltagem, Amershan Pharmacia Biotech (EPS 1001), ajustada à corrente elétrica de 24 mA constante durante 2h, necessária para uma boa separação dos fragmentos amplificados.

Antes da aplicação das amostras (fragmentos amplificados) nos géis desnaturantes, estas foram submetidas às condições de desnaturação em um tratamento prévio contendo formamida. Foram colocados 7 μL de tampão de amostra (900 μL de bromofenol, 900 μL xilenocianol, 900 μL TBE (10X), 4,5 mL de Ficol 30 % diluído em água destilada, 1,8 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0, 3,6 g de sacarose; na proporção de 3:1 com formamida) em tubo *eppendorf*, junto com 5 μL do produto amplificado. Estes tubos foram aquecidos a 94°C por 7 minutos e subsequentemente colocados em banho de gelo (tratamento desnaturante), seguindo-se à aplicação no gel.

3.6.2 - Coloração do gel com nitrato de prata e secagem

Com o término da corrida eletroforética, os géis de poliacrilamida 10% desnaturantes e não desnaturantes foram retirados cuidadosamente das placas de vidro e corados com nitrato de prata de acordo com o protocolo adaptado de Sanguinetti *et al.* (1994):

— **Fixação:** após a retirada das placas de vidros e dos espaçadores, o gel foi colocado em um recipiente de vidro contendo 100 mL de solução fixadora (160 mL de etanol (PA), 7,0 mL de ácido acético glacial (PA) e 833 mL de água destilada);

— **Impregnação com nitrato de prata:** adicionou-se 1,5 mL de solução de nitrato de prata 20% (2 g de nitrato de prata, 10 mL de água destilada) e agitou-se por 5 minutos. A solução foi então descartada adequadamente e o gel lavado em água pré-aquecida (40°C) por cerca de 10 segundos, agitando levemente e, ao final, descartou-se a água;

— **Revelação:** 100 mL solução reveladora (22 g de NaOH, 1 litro de água destilada) foram despejadas cuidadosamente no recipiente contendo o gel juntamente com 750µL mL de formaldeído, sendo submetido à agitação por alguns minutos até que as bandas aparecessem nitidamente. A solução reveladora foi pré-aquecida para facilitar a reação de coloração;

— **Bloqueio da reação:** após o gel ter sido revelado, a solução reveladora foi descartada e a reação bloqueada adicionando-se diretamente ao gel 100 mL de solução fixadora.

Após a conclusão do processo de revelação dos fragmentos amplificados, os géis foram secos em papel celofane para análise e posterior armazenagem.

3.6.3 - Determinação fenotípica

Os alelos de todos os locos microssatélites foram identificados por ordem crescente de tamanho, definida pela migração eletroforética, ou seja, os fragmentos de DNA com menor peso molecular (pb) migram mais rápido que os de maior peso (pb).

3.7 - Análises estatísticas

3.7.1 - Caracterização da diversidade genética com os marcadores desenvolvidos

As frequências alélicas e genotípicas de cada loco foram obtidas a partir da leitura dos fragmentos obtidos nos géis e estimadas por contagem direta utilizando-se o programa GDA versão 1.1 (Lewis & Zaykin, 2000). Os locos polimórficos foram caracterizados considerando o número total de alelos (*K*), número médio de alelos por loco (*A*), heterozigosidade observada (H_O), heterozigosidade esperada segundo expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_E) e número efetivo de alelos por loco (A_e=1/(1-H_E)).

Também foi estimado o índice de fixação (F), conforme Weir (1996) usando o programa GDA 1.1 (Lewis & Zaykin, 2000):

$$\hat{F} = 1 - \frac{\hat{H}_o}{\hat{H}_e},$$

Além disso, calculou-se a probabilidade de exclusão do primeiro [$\Pr(Ex_1)$] e segundo parentes [$\Pr(Ex_2)$]. Estes parâmetros de diversidade e probabilidade de exclusão de paternidade foram obtidos utilizando o programa CERVUS 3.0 (Kalinowski *et al*., 2007).

3.7.2 - Estimativa do desequilíbrio de ligação

O teste de desequilíbrio de ligação foi realizado entre todos pares de locos com base em estatística *G* de razões de logaritmos de máxima-verossimilhança. As probabilidades de significância do teste foram obtidas por permutação (10.000) e aplicando uma correção sequencial de Bonferroni para múltiplas comparações (95%, $\alpha = 0,05$). Tais análises foram calculadas com o programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002). Esses testes permitem determinar quais locos são adequados para as análises genéticas populacionais.

3.7.3 - Análise de diversidade genética, equilíbrio de Hardy-Weinberg e endogamia

A diversidade genética dos ninhos de *S. aff depilis* foi caracterizada para a heterozigosidade observada (H_O), heterozigosidade esperada segundo expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_E). A aderência das frequências genotípicas observadas às proporções teóricas do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificada pelo teste exato de Fisher, utilizando o programa GDA versão 1.1 (Lewis & Zaykin, 2000).

Para verificar excesso ou deficiência de heterozigotos foi realizado o teste U através do programa GENEPOP, versão 3.0 (Raymond &Rousset, 1995).

As estatísticas *F* de Wright (F_{IS} *e* F_{ST}) segundo o método de Weir e Cockerham (1984) foi realizada através do programa GDA versão 1.1 (Lewis & Zaykin, 2000).

4. RESULTADOS

4.1 - Construção da biblioteca enriquecida e desenho dos *primers*

Na construção da biblioteca enriquecida para a repetição CT/GT foram obtidos 120 clones contendo o inserto. A partir desses clones, 40 foram selecionados ao acaso para extração do DNA plasmidial e sequenciamento.

Do total de 40 clones positivos sequenciados, 23 sequências consenso apresentaram microssatélites (57,5%). O número de repetições variou de cinco em tetranucleotídeos a 22 em dinucleotídeos. Como esperado, a classe de microssatélites mais frequente foi a de dinucleotídeos, a qual corresponde 20 dos microssatélites encontrados (87%), enquanto a classe do tetra- estave presente em apenas 3 microssatélites (13 %). Dessas 23 sequências, cinco não foram utilizadas ou porque as sequências microssatélites estavam muito próximas ao vetor ou porque as sequências das regiões flanqueadoras não estavam adequadas para o desenho dos *primers.* Das 18 sequências restantes, duas apresentaram dois microssatélites

A partir dessas sequências, foram desenhados 20 pares de *primers* (87%) (Tabela 2). Desta forma, o rendimento total de sequências que puderam ser utilizadas para desenho de *primers* a partir do total de clones sequenciados (40) foi de 45%.

As sequências obtidas apresentaram três tipos de microssatélites classificados segundo Goldstein & Schlotterer (1999). Foram obtidos treze microssatélites perfeitos (65%), dois compostos (10%) e cinco imperfeitos (25%) (Tabela 3). Os *primers* foram identificados utilizando o prefixo Sde (de *Scaptotrigona aff depilis*) em ordem crescente (Sde01 a Sde20).

Tabela 2. Relação dos locos microssatélites desenvolvidos para *S. aff depilis*

Loco Microssatélite	Motivo Repetitivo	Tamanho esperado do fragmento (pb)	T_a predita (°C)
Sde01	$(GATA)_5(GA)_{14}$	128	55,3
Sde02	$(TC)_{18}$	170	57,3
Sde03	$(AG)_{11}$	133	55,9
Sde04	$(CG)_{14}$	134	55,8
Sde05	$(TC)_{18}$	200	53,7
Sde06	$(TC)_{16}$	199	54,8
Sde07	$(CT)_4TT(CT)_7$	189	54,8
Sde08	$(GA)_3TA(GA)_4AA(GA)_{19}$	226	55,3
Sde09	$(GA)_3(TAGA)_3(GA)_4GG(GA)_{10}GG(GA)_3$	226	57,5
Sde10	$(CA)_2TA(CA)_{11}$	199	56,0
Sde11	$(CT)_{10}$	205	56,9
Sde12	$(TG)_2(TA)_4(TG)_{11}(TA)_2$	210	52,7
Sde13	$(GA)_{16}$	199	54,3
Sde14	$(CA)_{16}$	199	56,0
Sde15	$(TC)_{18}$	258	56,4
Sde16	$(AG)_{22}$	226	56,3
Sde17	$(AG)_{22}$	225	55,6
Sde18	$(AG)_{17}$	169	59,3
Sde19	$(TC)_{16}$	190	57,6
Sde20	$(TG)_3\,CG\,(TG)_{12}$	196	58,1

T_a – temperatura de pareamento

Tabela 3. Tipos de microssatélites encontrados e classificados segundo Goldstein e Schlotterer (1999) para *S. aff depilis* e número de repetições dos motivos.

Loco Microssatélite	Repetição do motivo	Classificação
Sde01	$(GATA)_5(GA)_{14}$	Composto
Sde02	$(TC)_{18}$	Perfeito
Sde03	$(AG)_{11}$	Perfeito
Sde04	$(CG)_{14}$	Perfeito
Sde05	$(TC)_{18}$	Perfeito
Sde06	$(TC)_{16}$	Perfeito
Sde07	$(CT)_4TT(CT)_7$	Imperfeito
Sde08	$(GA)_3TA(GA)_4AA(GA)_{19}$	Imperfeito
Sde09	$(GA)_3(TAGA)_3(GA)_4GG(GA)_{10}GG(GA)_3$	Imperfeito
Sde10	$(CA)_2TA(CA)_{11}$	Imperfeito
Sde11	$(CT)_{10}$	Perfeito
Sde12	$(TG)_2(TA)_4(TG)_{11}(TA)_2$	Composto
Sde13	$(GA)_{16}$	Perfeito
Sde14	$(CA)_{16}$	Perfeito
Sde15	$(TC)_{18}$	Perfeito
Sde16	$(AG)_{22}$	Perfeito
Sde17	$(AG)_{22}$	Perfeito
Sde18	$(AG)_{17}$	Perfeito
Sde19	$(TC)_{16}$	Perfeito
Sde20	$(TG)_3\,CG\,(TG)_{12}$	Imperfeito

4.2 - Otimização dos locos microssatélites

Considerando os 20 pares de *primers* desenhados e sintetizados, três pares, Sde04, Sde12 e Sde14, não amplificaram para nenhum dos indivíduos testados. Os *primers* Sde01, Sde05 e Sde17 não amplificaram para três, seis e dois ninhos respectivamente. Nos demais *primers* a amplificação ocorreu em todos os ninhos. A tabela 4 mostra as temperaturas de pareamento padronizadas para cada *primer.*

Tabela 4. Marcadores microssatélites desenvolvidos para *S. aff depilis*, cujas Temperaturas de pareamento foram padronizadas

Loco Microssatélite	T_a predita (°C)
Sde06, Sde07	53
Sde09	54
Sde01, Sde03, Sde05, Sde08, Sde11, Sde13, Sde17	55
Sde10	56
Sde02, Sde15, Sde16, Sde19, Sde20	57
Sde18	59

T_a – temperatura de pareamento

4.3 - Caracterização dos locos microssatélites

Apesar das falhas ocorridas na amplificação de alguns ninhos pelos locos Sde01, Sde05 e Sde17, eles não foram excluídos das análises estatísticas por apresentarem polimorfismo alélico nos ninhos onde houve amplificação.

Do total de 17 locos observados em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata (excluindo, portanto os locos Sde04, Sde12 e Sde 14, que não amplificaram), somente o loco Sde03 apresentou-se monomórfico para os 90 indivíduos analisados. Todos os demais foram polimórficos, de fácil visualização e apresentaram variação no tamanho dos alelos.

Um total de 106 alelos foram identificados, sendo que o número de alelos por loco variou de três (Sde09 e 20) a 11 (Sde10 e 13) com uma média de 6,23 alelos por loco (Tabela 5). O número efetivo de alelos por loco foi menor do que o número de alelos por loco nos 17 marcadores, variando de 1,53 (Sde20) a 7,30 (Sde13) alelos, com

média de 3,62 alelos/loco. Isso indica que muitos alelos são raros (frequências menores ou iguais a 5%) (Tabela 5). De fato, apenas 30 alelos (28%) nos 17 locos tiveram frequência superior a 20% (Figura 14). O loco Sde03 não foi representado na Figura 14 por ser monomórfico.

A heterozigose observada variou de 0,226 (Sde08) a 0,938 (Sde10) com uma média de 0,514, enquanto que, a estimativa da heterozigose esperada foi mais alta. O menor valor de heterozigose esperada foi atribuído ao loco Sde20 (0,345) enquanto o loco Sde13 (0,863) apresentou o maior valor desta estimativa (tabela 5).

O índice de fixação foi positivo e significativamente diferente de zero em quase todos os locos e para média dos locos, variando de 0,023 (Sde13) a 0,676 (Sde08), com média de 0,196, sugerindo que os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, possam ser devido a excesso de homozigotos (Tabela 5).

O poder de exclusão total para identificação de um candidato a pai em uma progênie arbitrária, quando nenhum dos pais é conhecido ($Pr(Ex1)$) foi estimado em 0,997807. Quando é conhecido o genótipo de um dos pais, a probabilidade de exclusão ($Pr(Ex2)$) do conjunto de locos é de 0,999977 (Tabela 5).

Na tabela 6 são mostradas as frequências alélicas encontrada nos 17 locos analisados. Nota-se que as frequências alélicas foram bastante variadas entre os locos, entretanto, observa-se que em todos os marcadores ao menos um alelo apresentou frequência superior a 20%. No anexo I os gráficos de 1 a 16 mostram as frequências alélicas por loco e ninho.

Tabela 5. Características de 17 locos microssatélites em *S aff depilis.* Número de indivíduos analisados (N); número total de alelos *(K)*; número efetivo de alelos nos locos *(A_e)*; é a heterozigose observada (H_o); heterozigose esperada (H_e); índice de fixação (*F*), probabilidades de excluir o primeiro parente (*Pr*(*Ex*1)) e probabilidades de excluir o segundo parente *(Pr*(*Ex*2)).

Locos	N	K	A_e	H_O	H_E	*F*	Pr(Ex1)	Pr(Ex2)
Sde01	55	09	6,74	0,818	0,852	0,039	0,480	0,312
Sde02	82	06	3,58	0,744	0,721	-0,320	0,704	0,535
Sde03	90	01	1,00	-	-	-	1,000	0,995
Sde05	30	07	3,78	0,533	0,736	0,278	0,676	0,502
Sde06	77	06	2,27	0,299	0,559	0,467	0,833	0,690
Sde07	83	07	3,12	0,301	0,679	0,558	0,731	0,551
Sde08	84	06	3,28	0,226	0,695	0,676	0,719	0,550
Sde09	73	03	1,95	0,534	0,486	-0,100	0,884	0,765
Sde10	81	11	4,97	0,938	0,799	-0,175	0,569	0,392
Sde11	80	04	2,17	0,388	0,540	0,284	0,852	0,715
Sde13	83	11	7,30	0,843	0,863	0,023	0,443	0,282
Sde15	87	05	3,11	0,621	0,678	0,085	0,733	0,558
Sde16	86	07	6,07	0,628	0,835	0,249	0,511	0,339
Sde17	63	10	5,44	0,460	0,816	0,438	0,537	0,364
Sde18	87	06	2,70	0,448	0,629	0,289	0,781	0,612
Sde19	76	04	2,61	0,579	0,617	0,062	0,786	0,625
Sde20	80	03	1,53	0,375	0,345	-0,086	0,937	0,825
Média	---	6,23	3,62	0,514	0,638	0,196*	---	---
Total	90	106					0,997807	0,999977

** P<0,05*

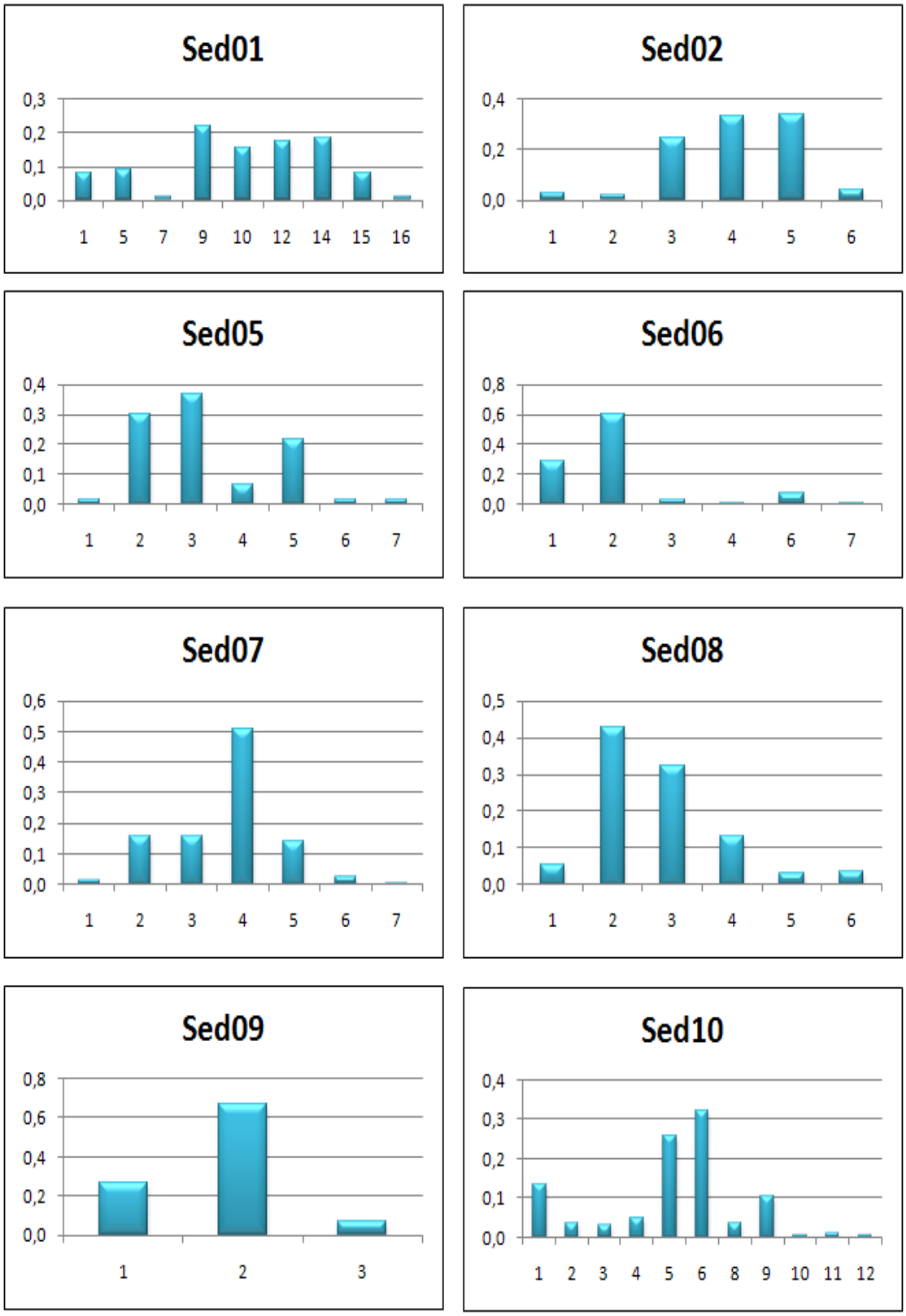

Figura 14. Distribuição das frequências alélicas para 16 locos polimórficos desenvolvidos para *S. aff depilis*. O eixo das ordenadas indica as frequências alélicas e o eixo das abscissas indica os alelos encontrados para cada loco.

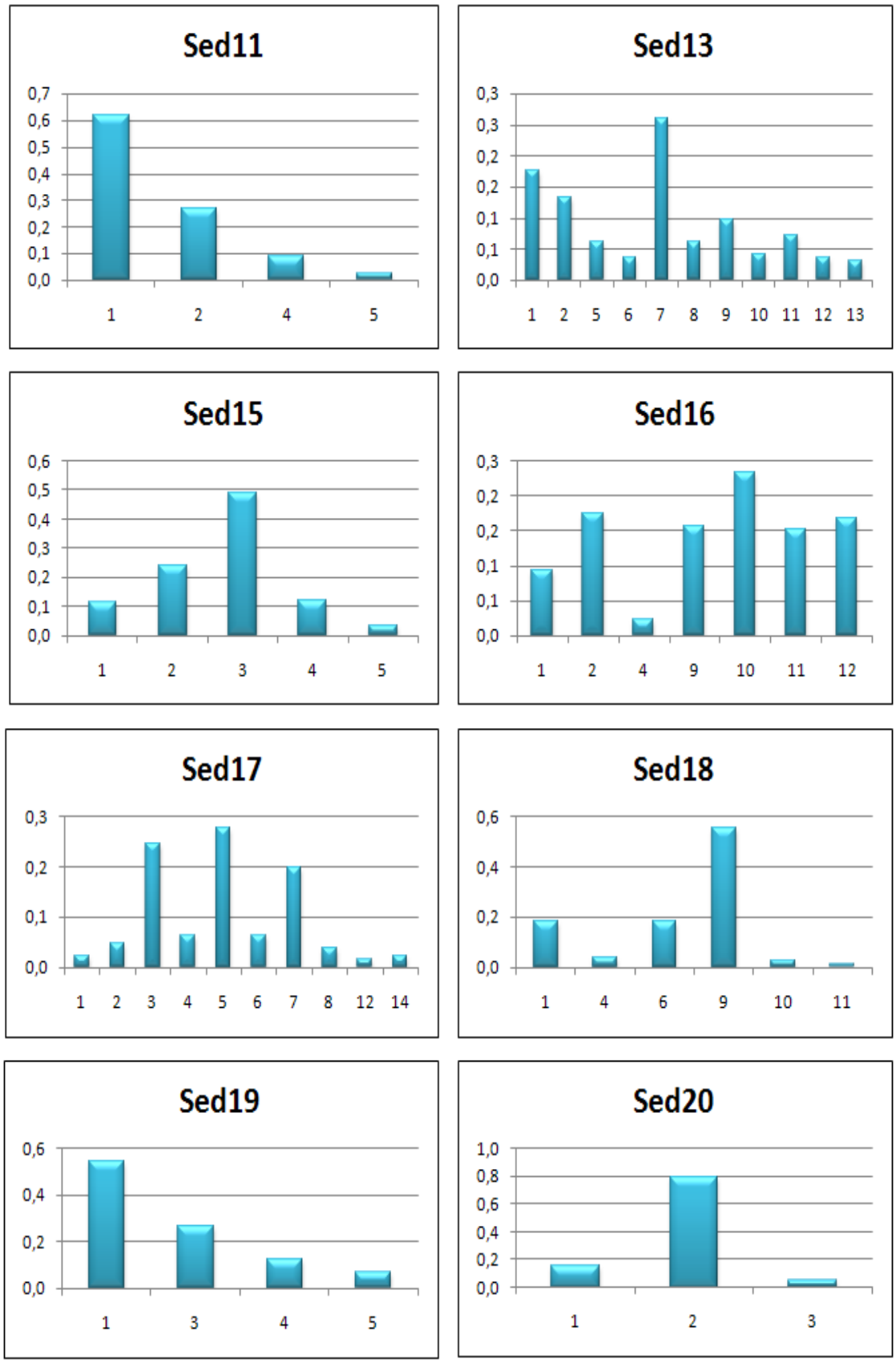

Figura 14. Distribuição das frequências alélicas para 16 locos polimórficos desenvolvidos para *S. aff depilis*. O eixo das ordenadas indica as frequências alélicas e o eixo das abscissas indica os alelos encontrados para cada loco (continuação).

Tabela 6. Frequência alélica encontrada nos 17locos microssatélites analisados nos nove ninhos de *S. aff depilis*.

		LOCOS																
		Sed01	**Sed02**	**Sed03**	**Sed05**	**Sed06**	**Sed07**	**Sed08**	**Sed09**	**Sed10**	**Sed11**	**Sed13**	**Sed15**	**Sed16**	**Sed17**	**Sed18**	**Sed19**	**Sed20**
	1	0,0818	0,0305	**1,0000**	0,0167	**0,2857**	0,0120	0,0536	**0,2671**	0,1358	**0,6188**	0,1747	0,1149	0,0930	0,0238	0,1839	**0,5461**	0,1563
	2		0,0183		**0,3000**	**0,5974**	0,1566	**0,4286**	**0,6644**	0,0370	**0,2688**	0,1325	**0,2414**	0,1744	0,0476			
	3		**0,2439**		**0,3667**	**0,0325**	0,1566	**0,3214**	0,0685	0,0309			**0,4885**		**0,2460**		**0,2632**	
A	**4**		**0,3293**		0,0667	0,0065	**0,5060**	0,1310		0,0494	0,0875		0,1207	0,0233	0,0635	0,0402	0,1250	
L	**5**	0,0909	**0,3354**		**0,2167**		0,1386	0,0298		**0,2593**	0,0250	0,0602	0,0345		**0,2778**		0,0658	**0,7938**
E	**6**		0,0427		0,0167	0,0714	0,0241	0,0357		**0,3210**		0,0361			0,0635	0,1839		0,0500
L	**7**	0,0091			0,0167	0,0065	0,0060					**0,2590**			0,1984			
O	**8**									0,0370		0,0602			0,0397			
S	**9**	**0,2182**								0,1049		0,0964		0,1570		**0,5517**		
	10	0,1545								0,0062		0,0422		**0,2326**		0,0287		
	11									0,0123		0,0723		0,1512		0,0115		
	12	0,1727								0,0062		0,0361		0,1686	0,0159			
	13											0,0301						
	14	0,1818													0,0238			
	15	0,0818																
	16	0,0091																

Os números em negrito indicam frequências acima de 20%.

4.4 – Desequilíbrio de ligação

Dos 136 testes realizados entre os pares de locos avaliados, nenhum par mostrou indícios de desequilíbrio gamético (Tabela 7), após a correção de Bonferroni (α=0,05).

Tabela 7. Desequilíbrio de ligação entre os locos microssatélites de *S. aff depilis.* Os valores na tabela são as probabilidades após 10.000 permutações. O valor limite de significância após correção de Bonferroni é 0,000041.

	Sde01	Sde02	Sde03	Sde05	Sde06	Sde07	Sde08	Sde09	Sde10	Sde11	Sde13	Sde15	Sde16	Sde17	Sde18	Sde19	Sde20
Sde01																	
Sde02	0,5938																
Sde03	-	-															
Sde05	-	1,0000	-														
Sde06	1,0000	1,0000	-	0,3357													
Sde07	0,4342	0,2159	-	0,0008	0,1317												
Sde08	0,3668	0,4848	-	0,0027	1,0000	0,0016											
Sde09	0,2161	0,8548	-	0,1744	0,7981	0,2859	0,2872										
Sde10	1,0000	0,1332	-	0,0262	0,5950	0,0107	0,0230	0,2777									
Sde11	0,3390	0,3975	-	0,0227	0,9660	0,1929	0,0326	0,5484	0,1572								
Sde13	0,8674	0,1146	-	0,0043	0,3226	0,0076	0,1094	0,9407	0,3724	0,3450							
Sde15	0,8787	0,2262	-	0,0085	0,0443	0,0236	0,0003	0,8789	0,0159	0,0675	0,0302						
Sde16	0,7795	0,0044	-	1,0000	0,8067	0,1750	0,3051	0,5214	0,6856	0,9581	0,6204	0,1210					
Sde17	0,7191	0,0123	-	-	0,3600	0,6469	0,4402	0,8316	0,9090	0,5846	0,0623	0,0163	0,1384				
Sde18	1,0000	0,2436	-	1,0000	0,1527	0,5097	0,9080	0,1036	0,5396	0,9835	0,4110	0,4417	0,8840	0,3546			
Sde19	0,1511	0,3327	-	1,0000	0,3440	0,6427	0,8729	0,1373	0,8238	0,5497	0,0595	0,2179	0,2883	0,4801	0,3759		
Sde20	1,0000	0,3435	-	1,0000	0,2456	0,9674	0,5373	0,4236	0,7938	0,8716	0,3072	0,7814	0,6679	0,8706	0,1121	0,4014	

4. 5 - Ensaios de amplificação heteróloga

Os 17 pares de *primers* desenvolvidos para *S. aff depilis* foram testados para amplificar o DNA genômico de sete espécies de abelha indígena sem ferrão: *Oxytrigona tataira, Trigona spinipes, Plebeia droryana, Trigona hyalinata, Scaptotrigona bipunctata, Trigona recursa e Lestrimelitta limao.* As condições de temperatura de pareamento dos *primers* foram as mesmas utilizadas na caracterização dos *primers.*

Os pares de *primers* Sde02, 05, 07 e 20 não amplificaram em nenhuma das espécies testadas (Tabela 8). O *primer* Sde01 e Sde13 foram os únicos que amplificaram em todas as espécies testadas (Tabela 8).

A espécies que tiveram mais sucesso na amplificação dos *primers* foram *Scaptotrigona bipunctata* e *Plebeia droryana* (10 pares de *primers*), diferente de *Oxytrigona tataira* que teve seu DNA genômico amplificado apenas por 6 *primers* (Tabela 8).

Tabela 8. Transferibilidade de 17 locos microssatélites desenvolvidos para *S. aff depilis* para sete espécies de Abelhas indígena sem ferrão.

Loco	*Lestrimelitta limao*	*Scaptotrigona bipunctata*	*Plebeia droryana*	*Trigona spinipes*	*Trigona recursa*	*Oxytrigona tataira*	*Trigona hyalinata*
Sde 01	+	+	+	+	+	+	+
Sde 02	-	-	-	-	-	-	-
Sde 03	+	+	+	-	-	+	-
Sde 05	-	-	-	-	-	-	-
Sde 06	+	-	+	-	+	+	+
Sde 07	-	-	-	-	-	-	-
Sde 08	-	+	+	+	+	-	+
Sde 09	+	-	+	+	-	-	+
Sde 10	-	+	-	-	-	-	-
Sde 11	-	+	+	+	+	+	-
Sde 13	+	+	+	+	+	+	+
Sde 15	+	+	-	+	+	+	+
Sde 16	+	+	+	+	+	-	+
Sde 17	-	+	+	+	-	-	-
Sde 18	+	+	+	-	+	-	-
Sde 19	+	-	-	-	+	-	+
Sde 20	-	-	-	-	-	-	-

Houve amplificação: + / Não houve amplificação: -

4. 6 - Diversidade Genética de *S. aff depilis*

A tabela 9 mostra um resumo da variação genética entre os ninhos de *S. aff depilis*. O número médio de alelos por ninho variou de 2,0 (ninho de Londrina) a 3,6 (ninho de Franca) com uma média de 2,4. A heterozigose observada, no conjunto amostral, variou de 0,330 (Ninho de Cornélio Procópio) a 0,589 (Ninho de Ribeirão Preto). As estimativas de diversidade (heterozigoses esperadas) apresentaram valores menores. O menor valor de heterozigose esperada foi atribuído ao ninho de Londrina (0,324) enquanto o ninho de Franca (0,563) apresentou o maior valor desta estimativa (Tabela9).

Dos 17 locos analisados nos 9 ninhos, 13 locos apresentaram mais de três alelos em pelo menos um ninho. O ninho de Franca foi o que apresentou o maior número de alelos por loco em seis locos analisados, variando de quatro a sete alelos (Tabela 10).

Tabela 9. Características de nove ninhos de *S aff depilis*. *N* é o número de indivíduos analisados; *A* é o número médio de alelos; H_o é a heterozigose observada e H_e é a heterozigose esperada.

Pop	N	A	H_o	H_e
USP	9	2,250	0,558	0,402
JAR	9	2,125	0,532	0,423
UBE	8	2,187	0,558	0,431
RIB	9	2,500	0,589	0,446
PIR1	9	2,437	0,532	0,391
PIR2	9	2,125	0,491	0,364
FRA	9	3,600	0,569	0,563
COP	9	2,400	0,330	0,394
LON	8	2,000	0,461	0,324
Média	-	2,403	0,513	0,415

Tabela 10. Número de alelos por ninho e loco (A). Heterozigose esperada (H_e) e observada (H_o) por ninho e loco.

Locus		USP	JAR	UBE	RIB	PIR1	PIR2	FRA	COP	LON	Total de alelos
Sde01	A	2	2	2	**4**	**5**	3	-	-	-	9
	He	0,529	0,526	0,529	0,725	0,712	0,195	-	-	-	
	Ho	1,000	1,000	1,000	0,875	1,000	0,100	-	-	-	
Sde02	A	**4**	2	2	2	**4**	3	2	3	2	6
	He	0,708	0,526	0,264	0,100	0,758	0,601	0,395	0,637	0,526	
	Ho	0,875	1,000	0,286	0,100	1,000	0,889	0,500	1,000	1,000	
Sde03	A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	He	0,000	0,000	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	0,000	0,000	
Sde05	A	-	-	-	-	-	-	**7**	2	2	7
	He	-	-	-	-	-	0,000	0,800	0,526	0,526	
	Ho	-	-	-	-	-	0,000	0,600	0,000	1,000	
Sde06	A	2	2	2	1	**5**	1	**4**	1	2	6
	He	0,395	0,503	0,409	0,000	0,758	0,000	0,592	0,000	0,337	
	Ho	0,500	0,556	0,500	0,000	1,000	0,000	0,375	0,000	0,000	
Sde07	A	2	2	2	2	2	3	**4**	2	2	7
	He	0,442	0,526	0,400	0,529	0,500	0,574	0,595	0,526	0,233	
	Ho	0,000	0,000	0,000	1,000	0,750	0,100	0,700	0,000	0,250	
Sde08	A	**4**	**4**	3	3	1	1	3	3	1	6
	He	0,314	0,647	0,416	0,584	0,000	0,000	0,591	0,637	0,000	
	Ho	0,222	0,500	0,500	0,300	0,000	0,000	0,167	0,300	0,000	
Sde09	A	2	3	3	3	1	2	2	2	1	3
	He	0,533	0,621	0,592	0,692	0,000	0,471	0,527	0,294	0,000	
	Ho	1,000	0,833	1,000	0,875	0,000	0,667	0,286	0,333	0,000	
Sde10	A	2	2	2	2	3	3	**7**	**5**	2	11
	He	0,533	0,471	0,533	0,529	0,660	0,658	0,821	0,800	0,526	
	Ho	1,000	0,667	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,800	1,000	
Sde11	A	2	1	2	2	1	3	3	**4**	1	4
	He	0,526	0,000	0,471	0,189	0,000	0,644	0,542	0,758	0,000	
	Ho	1,000	0,000	0,667	0,000	0,000	1,000	0,500	0,714	0,000	
Sde13	A	3	2	3	3	2	3	**6**	**5**	**4**	11
	He	0,637	0,500	0,714	0,611	0,442	0,468	0,826	0,800	0,675	
	Ho	1,000	0,750	0,714	1,000	0,600	0,600	0,900	1,000	1,000	
Sde15	A	3	3	2	**4**	3	2	**4**	3	2	5
	He	0,574	0,468	0,366	0,642	0,658	0,479	0,679	0,658	0,100	
	Ho	1,000	0,600	0,000	0,875	1,000	0,700	0,800	0,500	0,100	
Sde16	A	2	2	3	2	3	1	3	1	2	7
	He	0,529	0,294	0,660	0,521	0,511	0,000	0,574	0,000	0,526	
	Ho	1,000	0,333	1,000	0,900	0,600	0,000	0,800	0,000	1,000	
Sde17	A	**4**	2	2	2	**4**	2	-	-	2	10
	He	0,712	0,395	0,471	0,366	0,725	0,400	-	-	0,209	
	Ho	0,333	0,500	0,667	0,444	0,556	0,500	-	-	0,222	
Sde18	A	1	2	1	**4**	1	2	3	2	2	6
	He	0,000	0,503	0,000	0,689	0,000	0,529	0,542	0,268	0,395	
	Ho	0,000	0,778	0,000	1,000	0,000	1,000	0,700	0,300	0,300	
Sde19	A	1	2	2	3	2	2	3	1	**4**	4
	He	0,000	0,337	0,442	0,532	0,529	0,529	0,560	0,000	0,697	
	Ho	0,000	0,400	0,600	0,500	1,000	1,000	0,714	0,000	1,000	
Sde20	A	1	2	3	2	1	2	2	1	2	3
	He	0,000	0,442	0,637	0,425	0,000	0,268	0,400	0,000	0,429	
	Ho	0,000	0,600	1,000	0,556	0,000	0,300	0,500	0,000	0,500	
Total	A	36	34	36	40	39	34	54	36	30	106
Valor Médio	He	0,402	0,423	0,431	0,446	0,391	0,364	0,563	0,394	0,324	
	Ho	0,558	0,532	0,558	0,589	0,532	0,491	0,569	0,330	0,461	

Os números em negrito indicam mais de três alelos por ninho

4.6.1 - Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Todos os 17 locos analisados com o teste exato de Fisher para verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg apresentaram desvio do equilíbrio em pelo menos três ninhos (Tabela 11). Quando consideramos todos os ninhos como uma única população, sete locos ajustaram-se às proporções do EHW, enquanto que os demais locos mostraram-se em desequilíbrio (Tabela 12).

Para verificar se o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos ninhos de *S. aff depilis* 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 $P<0,05$ e excesso de heterozigotos para $P<0,05$. De acordo com o teste "U" para déficit de heterozigoto, dos nove grupos amostrais nenhum apresentou deficiência de heterozigotos. Dos nove ninhos analisados para verificar o excesso de heterozigoto apenas os ninhos de Franca e Cornélio Procópio não foram estatisticamente significativo para $P<0,05$).

Tabela 11. Probabilidades obtidas com o teste exato de Fisher para verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg em *S.aff depilis.*

		LOCOS																
		Sde01	**Sde02**	**Sde03**	**Sde05**	**Sde06**	**Sde07**	**Sde08**	**Sde09**	**Sde10**	**Sde11**	**Sde13**	**Sde15**	**Sde16**	**Sde17**	**Sde18**	**Sde19**	**Sde20**
Ninhos	**USP**	0,016*	0,453	0,000*	0,000*	0,966	0,000*	0,000*	0,039*	0,037*	0,012*	0,009*	0,010*	0,021*	0,003*	0,000*	0,000*	0,000*
	JAR	0,012*	0,012*	0,000*	0,000*	0,697	0,000*	0,112	0,476	0,583	0,000*	0,448	0,696	0,345	0,977	0,288	0,611	0,682
	UBE	0,021*	0,153	0,000*	0,000*	0,551	0,000*	0,975	0,033*	0,041*	0,581	0,656	0,000*	0,018*	0,574	0,000*	0,695	0,010*
	RIB	0,562	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,023*	0,016*	0,466	0,020*	0,000*	0,011*	0,18	0,064	0,69	0,011*	0,443	0,937
	PIR1	0,062	0,21	0,000*	0,000*	0,056	0,452	0,000*	0,000*	0,022*	0,000*	0,684	0,011*	0,692	0,114	0,000*	0,020*	0,000*
	PIR2	0,000*	0,105	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,558	0,039*	0,252	0,695	0,403	0,000*	0,772	0,020*	0,020*	0,305
	FRA	0,000*	0,953*	0,000*	0,031*	0,039*	0,713	0,000*	0,024*	0,06	0,392	0,608	0,621	0,252	0,000*	0,392	0,664	0,778
	COP	0,000*	0,010*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,012*	0,353	0,768	0,481	0,189	0,152	0,000*	0,000*	0,309	0,000*	0,000*
	LON	0,000*	0,010*	0,000*	0,010*	0,000*	0,125	0,000*	0,000*	0,013*	0,000*	0,044*	0,000*	0,012*	0,125	0,091	0,025*	0,293

*Desvio significativo (P<0,05)

Tabela 12. Probabilidades obtidas com o teste exato de Fisher para verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg em *S.aff depilis* considerando todos os ninhos como uma única população

Sde01	Sde02	Sde03	Sde05	Sde06	Sde07	Sde08	Sde09	Sde10	Sde11	Sde13	Sde15	Sde16	Sde17	Sde18	Sde19	Sde20
0,369	0,733	0,000*	0,008*	0,000*	0,000*	0,000*	0,380*	0,000*	0,002*	0,453	0,195	0,000*	0,000*	0,000*	0,346	0,462

*Desvio significativo (P<0,05)

4.6.2 - Coeficiente de endogamia (F_{is}) e Diferenciação Populacional (F_{st})

O coeficiente de endogamia (F_{is}) foi calculado por loco. O valor médio foi estatisticamente significativo para um intervalo de confiança a 95% de probalidade. Os valores negativos indicam uma frequência maior de heterozigotos e os valores positivos indicam baixa frequência de heterozigoto (Tabela 13).

O parâmetro de diferenciação populacional F_{st}, apresentou valores médios significativamente diferentes de zero entre os ninhos analisados demonstrando que estes são geneticamente diferentes entre si (Tabela 13).

Tabela 13. Coeficiente de endogamia (F_{is}). Parâmetros de diferenciação genética (F_{ST}) entre as populações segundo Weir e Cockerham(1984).

Locos	F_{is}	F_{st}
Sed01	-0,6108	0,4440
Sed02	-0,5415	0,3547
Sed03	-	-
Sed05	0,1429	0,2140
Sed06	0,0553	0,4627
Sed07	0,3967	0,2887
Sed08	0,3622	0,5188
Sed09	-0,3918	0,2276
Sed10	-0,5628	0,2680
Sed11	-0,2486	0,4533
Sed13	-0,3683	0,3083
Sed15	-0,2263	0,2746
Sed16	-0,6097	0,5600
Sed17	0,0180	0,4619
Sed18	-0,4121	0,5228
Sed19	-0,4737	0,3886
Sed20	-0,3850	0,2345
Média	-0,2410	0,3810
Limite superior	-0,0655	0,3259
Limite inferior	-0,4015	0,4358

4.6.3 - Alelos exclusivos

Dentre os nove ninhos estudados, somente o ninho de Londrina não apresentou alelos exclusivos. O loco com maior número de alelos exclusivos é o Sde10, com sete alelos encontrados em quatro ninhos diferentes. O ninho que apresentou o maior número de alelos exclusivos foi o de Franca, com 10 alelos exclusivos distribuídos em cinco locos. A distribuição e os valores das frequências dos alelos exclusivos estão descritos na tabela 14. No anexo II é possível observar os alelos encontrados por ninho e loco e a freqência alélica.

Tabela 14: Frequência dos alelos exclusivos e seus respectivos ninhos

Ninho	Loco	Alelo	Frequência
COP	Sed10	02	0,3000
COP	Sed10	03	0,2500
COP	Sed11	05	0,2857
COP	Sed13	10	0,3500
FRA	Sed05	07	0,0500
FRA	Sed05	04	0,2000
FRA	Sed05	06	0,0500
FRA	Sed05	01	0,0500
FRA	Sed06	04	0,0625
FRA	Sed07	01	0,1000
FRA	Sed10	12	0,0500
FRA	Sed10	10	0,0500
FRA	Sed10	11	0,1000
FRA	Sed13	13	0,2500
JAR	Sed01	05	0,5000
JAR	Sed10	08	0,3333
JAR	Sed17	08	0,2500
JAR	Sed18	04	0,3889
PIR1	Sed01	16	0,0556
PIR1	Sed01	07	0,0556
PIR1	Sed02	02	0,1875
PIR1	Sed06	07	0,0714
PIR1	Sed17	14	0,1667
PIR1	Sed17	12	0,1111
PIR1	Sed17	06	0,4444
PIR2	Sed07	07	0,0500
RIB	Sed18	11	0,1000
RIB	Sed18	10	0,2500
UBE	Sed07	06	0,2500
UBE	Sed16	04	0,2222
UBE	Sed17	02	0,3333
USP	Sed01	01	0,5000
USP	Sed10	04	0,5000
USP	Sed17	04	0,4444

5. DISCUSSÃO

5.1 - Caracterização dos locos

Dos 40 clones sequenciados, 23 sequências continham microssatélites (57,5%). Também foi encontrado mais de 50% de sequências contendo microssatélites em *Nannotrigona testaceicornis* (73%) (Oliveira *et al.,* 2009).

Como esperado, a classe de microssatélite mais frequente foi a dos dinucleotídeos, a qual corresponde por 13 dos microssatélites encontrados (87%). Essa predominância também foi encontrada para outras espécies de abelhas tais como *Melipona rufiventris* (Lopes, 2009a), *Nannotrigona testaceicornis* (Oliveira *et al.,* 2009) e *Tetragonisca angustula* (Brito *et al.,* 2009). A maioria dos microssatélites encontrados foi do tipo perfeito (65%). Em *Nannotrigona testaceicornis* (Oliveira *et al.,* 2009) e *Tetragonisca angustula* (Brito, 2009) também foi observado uma frequência maior de microssatélites perfeitos.

Dos 20 pares de *primers* desenhados e sintetizados para *S. aff depilis*, três pares não amplificaram para nenhum dos indivíduos testados (Sde04, Sde12 e Sde 14). A ocorrência de mutações ou deleções no sítio de pareamento desses *primers* ou mesmo condições de temperatura, são fatores que podem ter impedido a amplificação dessas regiões. Erros durante o sequenciamento nas regiões flanqueadoras, também podem ter ocorrido, o que faz com que o *primer* desenhado não se ligue ao sítio de pareamento devido à falta de complementaridade das bases. Outra possibilidade que deve ser considerada é a ocorrência de clones quiméricos.

O número médio de alelos encontrado neste trabalho (6,23 alelos/locos) foi semelhante àquele encontrado em outras espécies de abelha como *Lasioglossum malachurum* (6,22) (Paxton *et al*., 2003), *Nannotrigona testaceicornis* (5,65) (Oliveira *et al.,* 2009), *Tetragonisca angustula* (8,8) (Brito *et al*., 2009). Para outras espécies de abelhas foram encontrados valores menores como *Trigona carbonaria* (4) (Grenn *et al.,* 2001), para *Melipona rufiventris* (2,63) (Lopes *et al.*, 2009a), para *Melipona mondury* (3) (Lopes *et al.*, 2009b) *Melipona interrupta manaosensis* (2,77) (Francini *et al*., 2009).

Dentre os 17 locos estudados, todos apresentaram o número efetivo de alelo por loco menor do que o número de alelos por loco (tabela 5), com exceção do loco Sde03 que é monomórfico. Isso indica que muitos alelos são raros (frequências

menores ou iguais a 5%). De fato, poucos alelos nos 17 locos tiveram frequência superior a 20% (Tabela 6). Um estudo realizado por Fonseca (2010), em *Nannotrigona testaceicornis* também encontrou poucos alelos com frequência superior a 20% nos oito marcadores estudados.

O índice de diversidade genética em *S aff depilis* (6,23) foi menor que o encontrado por Brito *et al*. (2009) em *Tetragonisca angustula* (8,94), mas é maior que os relatados em outras espécies de abelha indígena sem ferrão: *Melipona bicolor* (3.88), *Scaptotrigona postica* (5,67), *Trigona carbonaria* (3,60) e *Nannotrigona testaceicornis* (5,58). (Peters *et al*. 1998; Paxton *et al*. 1999a; Green *et al*. 2001, Oliveira *et al.* 2009)

A média da heterozigose observada (0,514) foi menor que a média da heterozigose esperada (0,638) segundo equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 5). Uma explicação para a perda de variação genética demonstrada pela análise da heterozigose pode ser o baixo número de indivíduos amostrado por região (N=10) que não seriam suficientes para representar a variação genética da espécie. Estudos realizados com *Nannotrigona testaceicornis, Tetragonisca angustula, Trigona carbonária, Melipona interrupta manaosensis e Melipona rufiventris e Melipona mondury,* também observaram que a heterozigose observada era menor que a heterozigose esperada em alguns locos (Oliveira *et al.,* 2009; Brito *et al*., 2009; Green *et al*. 2001; Francini *et al*., 2009; Lopes *et al.,* 2010).

Em relação ao índice de fixação observou-se que o valor médio diferiu estatisticamente de zero, sugerindo desvios das proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg (tabela 5). Este índice pode ser superestimado em razão de erros de amostragem, pois com tamanho de amostras pequenas é quase impossível capturar todos os possíveis genótipos de cada um dos locos (Collevatti *et al*., 2001), pelo efeito *Wahlund* (redução da heterozigose devido à população estar estruturada em subpopulações) e presença de alelos nulos nos locos microssatélites (aumento do número de indivíduos supostamente homozigotos, visto que apenas um dos alelos amplifica em caso de individuo heterozigoto para o alelo nulo). Green *et al*. (2001) observou presença de alelo nulo para um marcador específico de *Trigona carbonaria*.

Os locos desenvolvidos apresentaram valores de exclusão de paternidade ideais para análise de parentesco e análises de paternidade (Tabela 5).

5.2 – Desequilíbrio de ligação

O equilíbrio de ligação em locos marcadores é uma das pressuposições básicas para sua utilização em análise de diversidade, estrutura genética e análise de paternidade. O teste para detecção de desequilíbrio de ligação entre pares de locos de *S. aff depilis* (tabela 7) revelou que ocorre segregação independentemente entre os locos. Este resultado foi inesperado, pois era previsto desequilíbrio de ligação em pelo menos um loco. Segundo Packer e Owen (1990), desequilíbrio de ligação é facilmente detectado em espécies da ordem Hymenoptera devido ao sistema sexual haplodiplóide. Em abelhas este fato pode ocorrer devido os machos serem haplóides, e transferir para sua prole 100% de seu patrimônio genético, simulando assim uma "ligação" entre todos os seus locos. Em *Tetragonisca angustula* (Brito *et al.,* 2009) e *Frieseomelitta varia* (Gonçalves, 2010), foi observado desequlibrio de ligação em alguns locos.

De acordo com os resultados do teste de desequilíbrio de ligação os marcadores desenvolvidos para *S. aff depilis* poderão ser usados em estudos de estrutura, diversidade genética, estrutura genética espacial e estudos de parentesco visto que não vão gerar vícios nessas estimativas.

5. 3 - Ensaios de amplificação heteróloga

O teste de transferibilidade entre *S. aff depilis* e outras espécies de abelhas indígenas sem ferrão, demonstrou que as sequências que flanqueiam as regiões de microssatélites são conservadas, uma vez que 10 pares de *primers* amplificaram em pelo menos quatro espécies (Tabela 8). Além disso, todos *primers* amplificaram na mesma temperatura otimizada para *S. aff depilis*. Apesar de ter sido comprovado a transferibilidade dos *primers,* para que eles possam ser utilizados é necessário um estudo de caracterização para observar se esses locos são polimórficos nas espécies onde houve amplificação dos mesmos. Quanto aos *primers* que não amplificaram, é possível que testes com outras temperaturas de pareamento revertam essa situação (Innis *et al.,* 1990).

A possibilidade de transferibilidade de locos microssatélites entre espécies é uma grande vantagem tendo em vista o alto custo para o desenvolvimento desses marcadores. Brito *et. al.* 2009 e Oliveira *et al.* 2009 também obtiveram sucesso na transferência dos *primers* de *Tetragonisca angustula* e *Nannotrigona testaceicornis* para algumas espécies de abelhas indígenas sem ferrão.

5. 4 - Diversidade Genética de *S. aff depilis*

Um dos parâmetros que é usado em estudos de diversidade genética das populações é a análise da diversidade alélica. De acordo com as análises realizadas neste trabalho, o nível de diversidade alélica observado nos ninhos, que variou de 2,0 a 3,6 com média de 2,4 (Tabela 9), ficou abaixo do que o observado em alguns trabalhos (Green *et al*., 2001; Brito *et al*., 2009; Oliveira *et al.,* 2009). Uma justificativa para o baixo índice de diversidade alélica encontrado é o baixo número de indivíduos analisados por região (N=10), pois em uma amostra pequena é quase impossível capturar todos os possíveis alelos que cada loco possa ter. Estudo realizado com 20 indivíduos de *Melipona rufiventris* também encontrou uma diversidade alélica baixa (2,63) (Lopes *et a.*, 2009a).

Todos os ninhos apresentaram valores de Heterozigose observada (H_o) superiores a Heterozigose esperada (H_e) (Tabela 9). Isto pode ter ocorrido por apresentar um maior número de heterozigotos. Estes resultados foram diferentes dos já descritos na literatura onde o H_e é mais alto que o H_o e a presença de homozigotos é mais alta. (Green *et al*., 2001; Lopes *et al.*, 2009a; Brito *et al*., 2009; Oliveira *et al.,* 2009; Francini *et al.,* 2009; Fonseca, 2010)

Em meliponini as rainhas acasalam apenas uma única vez e são consideradas monoândricas (acasalam apenas com um macho) (Sakagami, 1982; Engels e Engels, 1988; Peters *et al*., 1999), diferente das abelhas do gênero *Apis* que são poliândricas (acasalam com mais de um macho) (Estoup *et al*., 1994). Levando em consideração a monoandria dessas abelhas, quando é feita a analise do número de alelos encontrados em um loco microssatélite o esperado é no máximo três alelos de um mesmo loco por ninho, se considerarmos que a rainha seja heterozigota para o loco analisado e o macho (haplóide) possuir um alelo diferente do da rainha. Mas as análises mostram

resultados diferentes do esperado. Dos nove ninhos analisados com os 17 locos microssatélites, pelo menos 13 locos apresentaram mais de três alelos por loco em um mesmo ninho (tabela 10). Uma das explicações para estes resultados seria a poliandria facultativa. Paxton (2000), empregando marcadores microssatélites demonstrou que a poliandria é facultativa em *Scaptotrigona postica. E*studos realizados com *Nannotrigona testaceicornis* também sugerem que a poliandria pode ser facultativa na espécie (Fonseca, 2010). Mas para afirmar que a poliandria esteja ocorrendo em *Scaptotrigona aff depilis,* estudos mais apurados devem ser feitos, pois outros fatores podem justificar esses achados, como 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).

5.5 - Equilíbrio de Hardy-Weinberg, Coeficiente de endogamia (F_{is}) e Diferenciação Populacional (F_{st})

Os locos também foram testados quanto à aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). De acordo com Weir (1990), a análise de dados genéticos deve ser baseada em algum modelo ou teoria. O modelo clássico que embasa a genética de populações é chamado de Teorema de Hardy-Weinberg, que presume que uma população de tamanho infinito, onde os indivíduos se acasalam aleatoriamente e que não sofre ação de forças perturbadoras (mutação, migração, seleção), estabelece frequências genotípicas binomiais que não irão se alterar nas gerações subsequentes. Os desvios das proporções esperadas pelo EHW significam que uma ou mais das pressuposições do modelo foi alterada (Futuyma, 1992).

Neste estudo, os 17 locos apresentaram desvio do EHW em pelo menos três ninhos (Tabela 11). Quando consideramos todos os ninhos como uma única população, sete locos ajustaram-se às proporções do EHW, enquanto que nos demais ocorreu desvio do EHW (Tabela 12). Quando o teste U foi aplicado para verificar o excesso ou déficit de heterozigotos, observou-se que dos nove ninhos analisados, sete apresentaram um excesso de heterozigoto os outros dois ninhos (Franca e Cornélio Procópio) não apresentaram nem déficit nem excesso de heterozigotos. Desvios do EHW em locos supostamente neutros como os microssatélites, implicam que na

população estudada estes desvios podem estar sendo causados por diversos fatores como 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 (Hartl e Clarck, 2007). Como consequência da endogamia, temos o aumento da homozigose.

Fonseca (2010) observou ocorrência de endogamia entre as agregações de *Nannotrigona testaceicornis,* devido ao excesso de genótipos homozigotos e a deficiência de genótipos heterozigotos. Neste trabalho não foi observado a ocorrência de endogamia entre os ninhos (Tabela 13). Os resultados médios de F_{is} que foram negativos revelaram um excesso de 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 maior do que a esperada devido ao excesso de heterozigotos.

As análises de diferenciação populacional mostraram que as populações estão diferenciadas, pois os valores de F_{st} foram diferentes de zero, indicando alterações na estrutura genética entre os ninhos. Essas alterações podem ser causadas por seleção natural, deriva genética e migração. Contudo, descarta-se a seleção, considerando-se que essas diferenças foram observadas a partir de um marcador neutro, microssatélite.

Com relação à presença de alelos exclusivos, foi constatado um número expressivo (34) nos ninhos (tabela14). A presença de alelos exclusivos pode indicar um fluxo gênico exclusivo restrito entre os ninhos, levando a uma divergência genética devido à seleção ou deriva genética. Estes resultados são importantes para definir estratégias de coletas para futuros estudos populacionais de *S. aff depilis*, pois quanto mais localidades de ocorrência da espécie forem amostradas, mais abrangente serão os resultados de diversidade genética da espécie.

6. CONCLUSÕES

1. A caracterização dos locos microssatélites desenvolvidos para *Scaptotrigona aff depilis* possibilitou chegar às seguintes conclusões:

- Os locos são polimórficos, apresentam alto poder de exclusão de paternidade e segregação mendeliana;

- A diversidade genética dos locos nas amostras estudadas foi maior que as encontradas em muitas espécies de abelhas indígenas sem ferrão;

- Não foram detectados indícios significativos de ligação entre os locos desenvolvidos. Isto mostra que eles são adequados para estudos de diversidade genética, estrutura genética espacial, estudo de conservação e estudos de parentesco visto que não vão gerar vícios nessas estimativas. Além disso, muitos desses marcadores também podem ser utilizados em outras espécies de abelhas indígenas sem ferrão.

2. O estudo de variabilidade genética de *Scaptotrigona aff depilis* por meio dos marcadores desenvolvidos para a espécie possibilitou chegar às seguintes conclusões:

- A diversidade alélica observada nos ninhos estudados de *Scaptotrigona aff depilis* ficou abaixo do observado em alguns trabalhos com abelhas indígenas sem ferrão. Este resultado pode ter ocorrido devido ao baixo número de indivíduos amostrados por região

- A heterozigose observada foi maior que a esperada devido ao excesso de indivíduos heterozigotos. Os desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg também ocorreram por esse excesso;

- O indício de acasalamento da rainha com mais de um macho, mostrado neste trabalho, sugere que novos estudos devem ser realizados para um melhor entendimento do comportamento reprodutivo da espécie;

- As análises do coeficiente de endogamia (F_{is}) indicam uma frequência maior de heterozigotos

- As análises de diferenciação populacional (F_{st}) mostraram que as populações são diferentes entre si;

- Os resultados obtidos através da presença de alelos exclusivos são importantes para definir estratégias de coletas para futuros estudos populacionais de *S. aff depilis*, pois quanto mais localidades de ocorrência da espécie forem amostradas, mais abrangentes serão os resultados de diversidade genética da espécie.

7. 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.

BEAUMONT M. A. E.; BRUFORD M. W. (1999). **Microsatellites in conservation genetics.** In: Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press, New York. 165-182.

BILLOTTE, N.; LAGODA, P. J. R.; RISTERUCCI A. M.; BAURENS F. C. (1999). Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits.** 54: 277–288.

BRITO, R. M., FRANCISCO, F. O., DOMINGUES-YAMADA, A. M. T., GONÇALVES, P. H. P., PIOKER, F. C., SOARES, A. E. E., ARIAS, M. C. (2009). Characterization of microsatellite loci of *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Conservation Genetics Resources**. DOI: 10.1007/s12686-009-9045-4.

BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. M.; AMARAL, Z. P. S.; BRONDANI, R. V. (2003). Desenvolvimento e Caracterização de marcadores microssatélites em espécies vegetais tropicais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.** 30: 46-50.

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. **The American Journal of Human Genetics.** 52: 922-927.

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.

CHAKRABORTY, R.; KIMMEL, M. (1999) **Statistics of microsatellite loci: estimation of mutation rate and pattern of population expansion.** In: Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press, New York. 139-150.

CHAMBERS, G. K.; MACAVOY, E. S. (2000). Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B.** 126: 455-476.

COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. (2001). Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology.**10: 349-356.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D. W.; DOLLIN, A.; HEARD, T.; AGUILAR, I. B.; VENTURIERI, G.; EARDLEY, C.; NOGUEIRA-NETO, P. (2006). Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie.** 37(2): 275-292.

EDWARDS, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H.A.; CASKEY, C. T. (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric an tetrameric tandem repeats. **American Journal of Human Genetic**. 49: 746-756.

ENGELS, E.; ENGELS, W. (1988). Age-dependent queen attractiveness for drones and mating in the stingless bee, *Scaptotrigona postica*. **Journal of Apicultural Research.** 27: 3-8.

ENGELS, W.; ENGELS, E.; FRANCKE, W. (1997). Ontogeny of cephalic volatile patterns in queens and mating biology of the neotropical stingless bee, *Scaptotrigona postica*. **Invertebrate Reproduction and Development.** 30: 251-256.

ESTOUP, A.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J. M. (1995). Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* l.) Populations: Hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. **Genetics.** 140: 679-695.

ESTOUP, A., SOLIGNAC, M., HARRY, J. M. CORNUET. (1993). Characterization of (GT)n and (CT)n microssatellites in two insect species: *Apis mellifera* AND *Bombus terrestris*. **Nucleic Acids**. 21: 1427-1431.

ESTOUP, A.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J. M. (1994). Precise assessment of the number of patrilines and of genetic relatedness in honeybee colonies. **Proceedings of the Royal Society B.** 258: 1-7.

FONSECA, A. S. (2010). **Diversidade genética em agregações de** *Nannotrigona testaceicornis Cockerell*, **1922 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) através de marcadores microssatélites.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Genética - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 86p.

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 manaosensis* (Apidae: Meliponini). **Conservation Genetics Resources.** DOI 10.1007/s12686-009-9113-9.

FRANCISCO, F. O. (2002). **Diversidade genética da abelha sem ferrão *Plebeia remota*: análise do DNA mitocondrial e microssatélites**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 140p.

FRANCISCO, F. O.; BRITO, R. M.; ARIAS, M. C. (2006). Alelle number and heterozigosity for microsatellite loci in different stingless bee species (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Neotropical Entomology.** 35(5): 638-643.

FRANCISCO, F. O.; BRITO, R. M.; SANTIAGO, L. R.; GONÇALVES, P. H. P.; PIOKER, F.; DOMINGUES-YAMADA, A. M. T.; ARIAS, M. C. (2011). Isolation and characterization of 15 microsatellite loci in the stingless bee *Plebeia remota* (Apidae: Meliponini) **Conservation Genet Resour.** DOI 10.1007/s12686-010-9369-0

FREITAS, G. S. (2001). **Levantamento de ninhos de meliponíneos (Hymenoptera, Apidae) em área urbana: Campus da USP, Ribeirão Preto/SP**. Dissertação de

Mestrado. Departamento de Entomologia - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 81p.

FUTUYMA, D. J. (1992). **Biologia evolutiva.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq. 631 p.

GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER, C. (1999). **Microsatellites: Evolution and Applications**. Oxford University Press, New York. 368p.

GONÇALVES, P. H. P. (2010). **Análise da variabilidade genética de uma pequena população de** *Frieseomelitta varia* **(Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de análise do DNA mitocondrial, microssatélites e morfometria geométrica das asas.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 140p.

GONÇALVES, P. H. P.; FRANCISCO, F. O.; BRITO, R. M.; DOMINGUES-YAMADA, A. M. T.; PIOKER, F. SOARES, A. E. E.; ARIAS, M. C. (2011) A scientific note on the isolation and characterization of microsatellite loci of *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Apidologie.** DOI: 10.1007/s13592-011-0008-x

GOUDET, J. (2002) **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices**. Version 2.9.3. Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland. Disponível em: http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm.

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.

GUIDUGLI, M. C.; CAMPOS, T.; SOUSA, A. C. B.; FERES, J. M.; SEBBENN, A. M.; MESTRINER, M. A.; CONTEL, E. P. B.; ALZATE-MARIN, A. L. (2009). Development and characterization of 15 microsatellite loci for *Cariniana estrellensis* and

transferability to *Cariniana legalis*, two endangered tropical tree species. **Conservation Genetics.** 10: 1001-1004.

HALL, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series.** 41: 95-98.

HANCOCK, J. M. (1999). **Microsatellites and other simple sequences: Genomic context and mutational mechanisms,** In: Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press, New York. 1-9.

HARDING, R. M.; BOYCE, A. J.; CLEGG, J. B. (1992). The evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules. **Genetics.** 132**:** 847-859.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. (2007). **Principles of population genetics**. 4ª ed. Sinauer, MA.

INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (1990). **PCR Protocols. A Guide to Methods and Applicatons**. Academic Press, Inc. San Diego. 482p.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER. M. L.; MARSHALL, T. C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology.** 16: 1099–1106.

KERR, W. E.; CARVALHO G. A.; NASCIMENTO, V. A. (1996). **Abelha Uruçu: biologia, manejo e conservação.** Fundação Acangaú, Belo Horizonte. 144p.

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. Nati. Acad. Scd.** 75(6): 2868-2872.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. (2002). GDA - **Genetic Data Analysis.** Version 1.1 for Windows 95/NT. http://www.lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/.

LI, YOU-CHUN; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanism: a review. **Molecular Ecology.** 11: 2453-2465.

LITT, M. & LUTY, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **The American Journal of Human Genetics.** 44(3):397-401.

LOPES, E. M., SILVA, F. O., FERNANDES-SALOMÃO, T. M., CAMPOS, L. A. O., TAVARES M. G. (2009a). Microsatellite loci for the stingless bee *Melipona rufiventris* (Hymenoptera: Apidae)**. Mol. Ecology Resources.** 9: 923-925.

LOPES, D. M., SILVA F. O., FERNANDES-SALOMÃO, T. M., CAMPOS, L. A. O., TAVARES M. G. (2009b). A scientific note on the characterization of microsatellite loci for *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae). **Apidologie** DOI: 10.1051/apido/2009067.

LOPES, D. M.; CAMPLOS, L. A. O.; SALOMÃO, T. M. F.; TAVARES, M. G. 2010. Comparative study on the use of specific and heterologous microsatellite primers in the stingless bees *Melipona rufiventris* and *M. mondury* (Hymenoptera, Apidae) **Genetics and Molecular Biology.** 33(2): 390-393.

MATIOLI, S. R; PASSOS-BUENO, M. R. S. (2001) Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: Biologia Molecular e Evolução. **Holos**. 153-161.

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.

MORITZ C. E.; HILLIS D.M. (1996) **Molecular systematics: context and controversies.** In: Molecular Systematics. Sinauer Associates, Massachusetts. 1-13.

NOGUEIRA-NETO, P. (1970). **A criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae).** Editora Chácaras e Quintais, São Paulo.

NOGUEIRA-NETO P. (1997). **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. Ed. Nogueirapis, São Paulo. 445p.

OLIVEIRA, E. J. F. (2005). **Estrutura genética espacial do Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*)**. Tese de doutorado. Departamento de Genética - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 93p.

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 Recources.** 1(1): 97-99.

PACKER, L.; OWEN, R. E. (1990). Allozyme variation, linkage disequilibrium and diploid male production in a primitively social bee *Augochlorella striata* (Hymenoptera; Halictidae). **Heredity.** 65: 241-248.

PARKER, P. G.; SNOW, A. A.; SCHUNG, M. D.; BOOTON, G. C.; FUREST, P. A. (1998). What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker**. Ecology**. 79: 182-361 p.

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.; ARÉVALO, E.; FIELD, J. (2003). Microsatellite loci for the eusocial *Lasioglossum malachurum* and other sweat bees (Hymenoptera, Halictidae). **Molecular Ecology Notes.** 3: 82-84.

PAXTON, R. J.; WEIBSHUH, N.; QUEZADA-EUÁN, J. J. G. (1999a). Characterization of dinucleotide microsatellite loci for stingless bee**. Molecular Ecology**. 8: 690-692.

PAXTON, R. J.; WEIBSHUH N.; ENGLES, W.; HARTFELDER, K.; QUEZADA-EUÁN, J. J. G.; (1999b). **Not only single mating in stingless bees**. Naturwissenschaften. 86, 143-146 p.

PÉPIN, L.; AMIGUES, Y.; LÉPINGLE, A.; BERTHIER, J-L.; BENSAID, 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.

PETERS, J. M.; QUELLER, D. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; STRASSMANN, J. E. (1998). Microsatellite loci for stingless bees. **Molecular Ecology.** 7: 783-792.

PETERS, J. M.; QUELLER, D. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D. W.; STRASSMANN, J. E. (1999). Mater number, kin selection and social conflicts in stingless bee and honeybees. **Proceedings of the Royal Society of London B.** 266: 379-384.

PINHEIRO, F.; SANTOS, E. M. O.; BARROS, E. F.; MEYER, E. D.; SALATINO, E. A.; SOUZA, E. A. P.; COZZOLINO, E. S. (2008). Isolation and characterization of microsatellite loci in the Brazilian orchid *Epidendrum fulgens*. **Conservation Genetics.** 9: 1661–1663.

QUELLER, D. C.; STRASSMANN, J. E.; RUGHE, C. R. (1993). **Microsatellites and kinship**. **Trends in Ecology & Evolution**. 8: 285-288.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. (1995). GENEPOP, population genetics software for exact tests and ecumenicism. Version 1.2. **Journal of Heredity**, 86: 248-249.

ROUBIK, D. W. (1989). **Ecology and Natural history of tropical bees**. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 514p.

ROUBIK, D. W. (2006). Stingless bee nesting biology. **Apidologie.** 37: 124–143.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. (2000). **Primer3 on the www for general users and for biologist programmers.** In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. Humana Press, Totowa. 365–386. Disponível em: http://frodo.wi.mit.edu/primer3/.

SAKAGAMI, S. F. (1982). **Stingless bee. In: Social Insects.** Academic Press, New York. 361-423.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS, E. N.; SIMPSON, A. J. G. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, 17: 914 -921.

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. 238-248.

SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I.; GOTTSBERGER, G. (1998). **A polinização de plantas do cerrado.** Revista Brasileira de Biologia. 48(4): 651-663.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. (2002). **Abelhas Brasileiras - Sistemática e Identificação.** Ed. IDM Composição e Arte, Belo Horizonte. 253p.

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: Molecular Zoology: Advances, strategies, and protocols. Wiley-Liss. 163-180.

TACHIDA H.; LIZUKA, M. (1992). Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. **Genetics.** 131: 471-478.

TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**. 17: 6463-71.

TAVARES, M. G.; DIAS, L. A. S.; BORGES, A. A.; LOPES, D. M.; BUSSE, A. H. P.; COSTA, R. G.; SALOMÃO, T. M. F.; CAMPOS, L. A. O. (2007). Genetic divergence between populations of the stingless bee uruçu amarela (*Melipona rufiventris* group, Hymenoptera, Meliponini): Is there a new *Melipona* species in the Brazilian state of Minas Gerais? **Genetics and Melecular Biology.** 30: 667-675.

8. ANEXO

Anexo I. Gráficos de 01 a 16

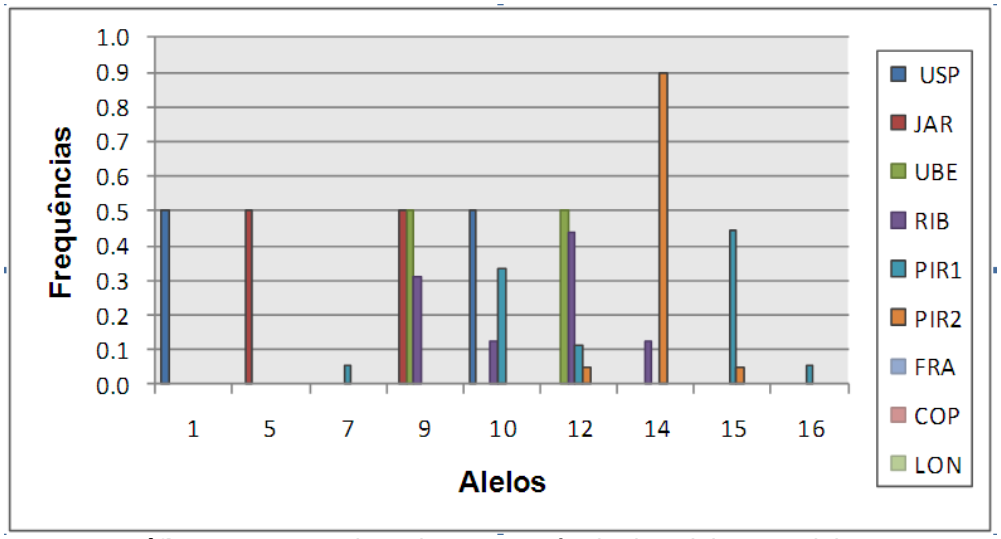

Gráfico 01 - Marcador Sde01. Frequência dos alelos por ninho.

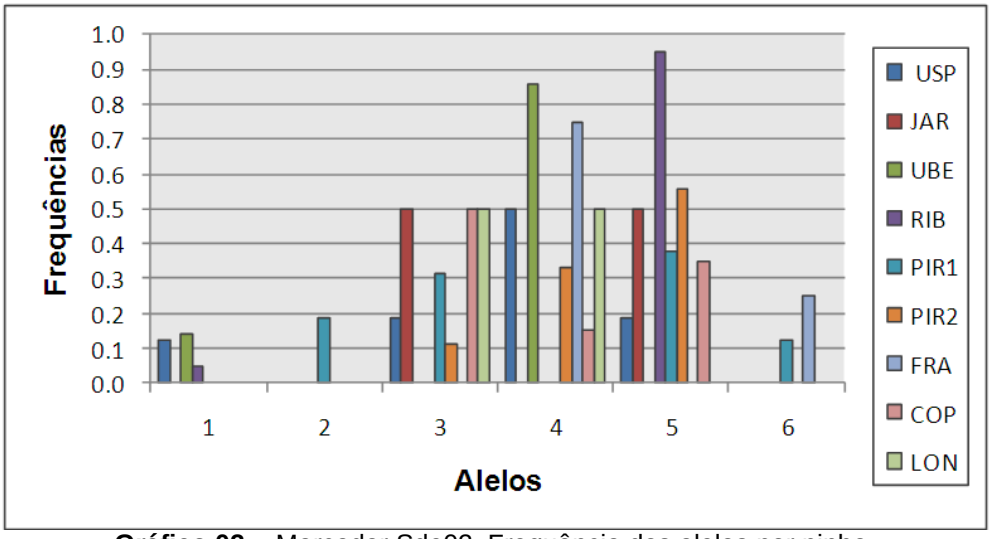

Gráfico 02 - Marcador Sde02. Frequência dos alelos por ninho.

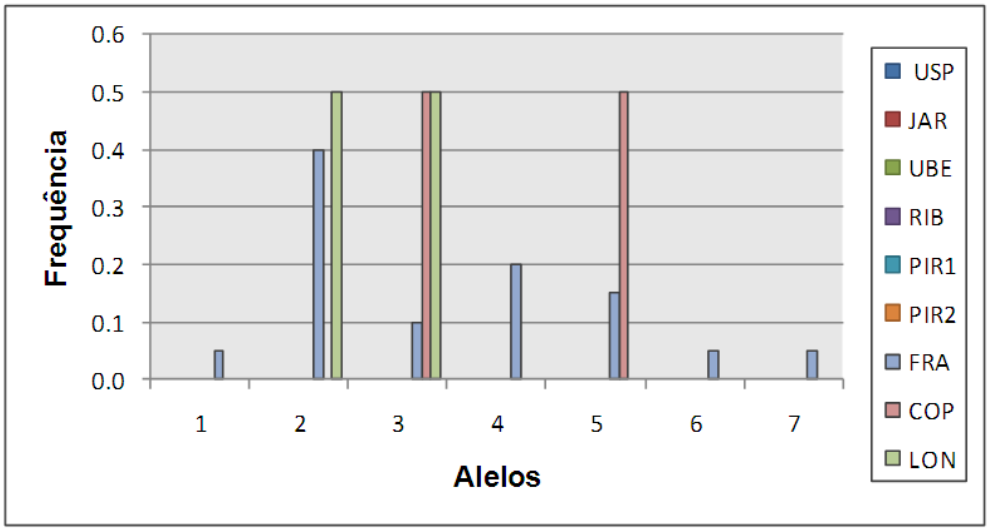

Gráfico 03 - Marcador Sde05. Frequência dos alelos por ninho.

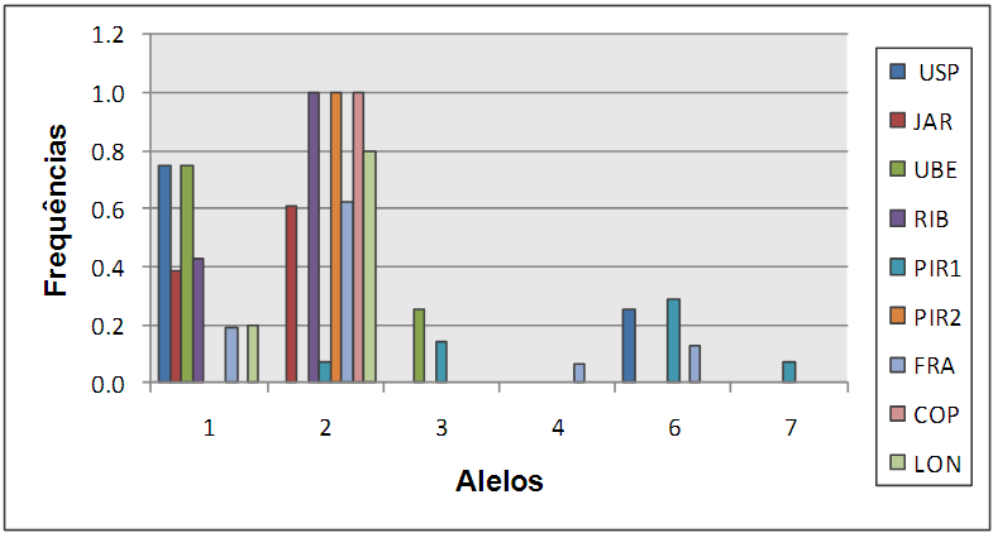

Gráfico 04 - Marcador Sde06. Frequência dos alelos por ninho.

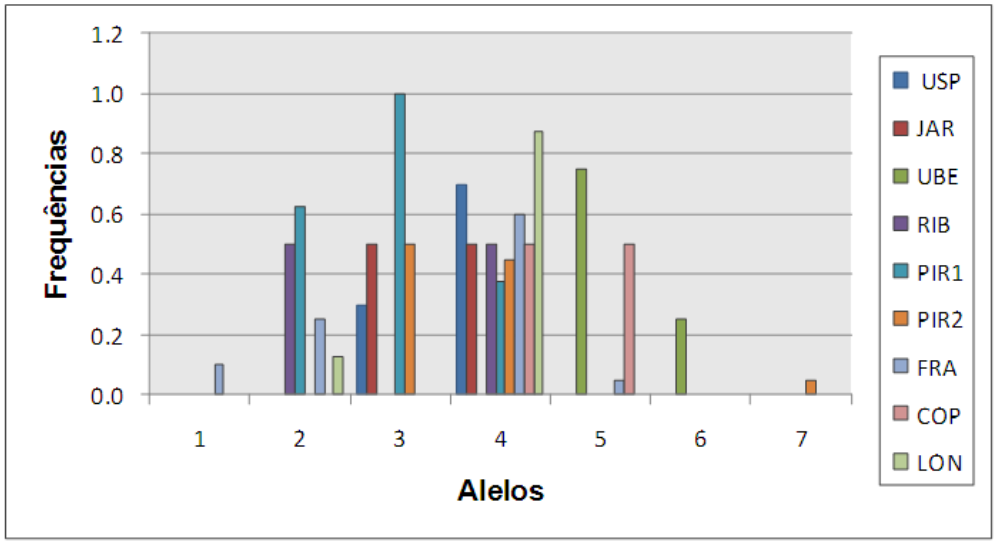

Gráfico 05 - Marcador Sde07. Frequência dos alelos por ninho.

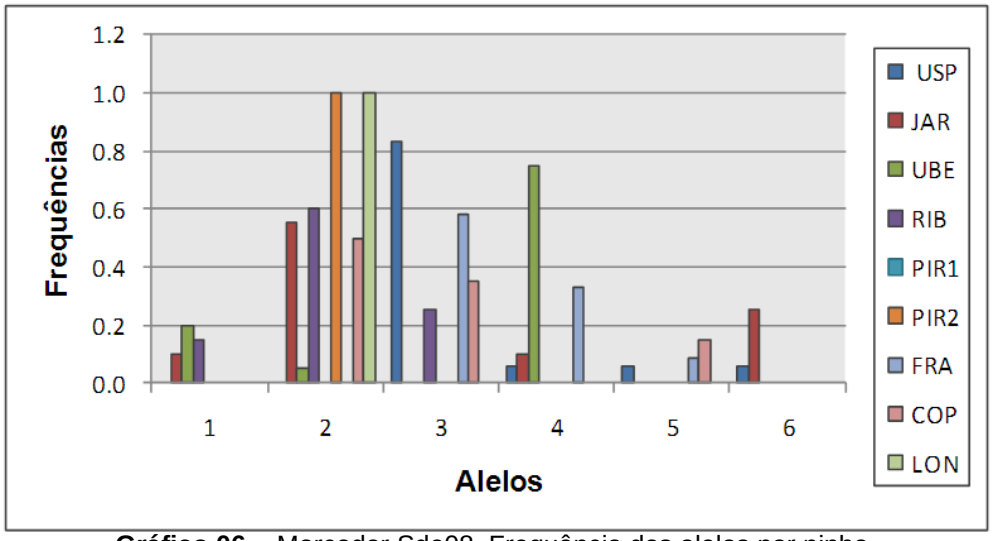

Gráfico 06 - Marcador Sde08. Frequência dos alelos por ninho.

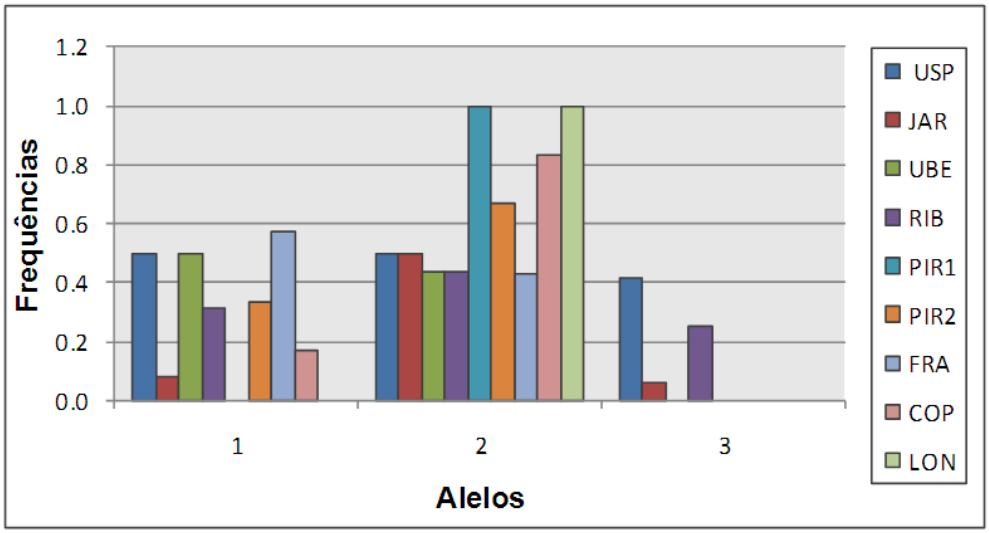

Gráfico 07 - Marcador Sde09. Frequência dos alelos por ninho.

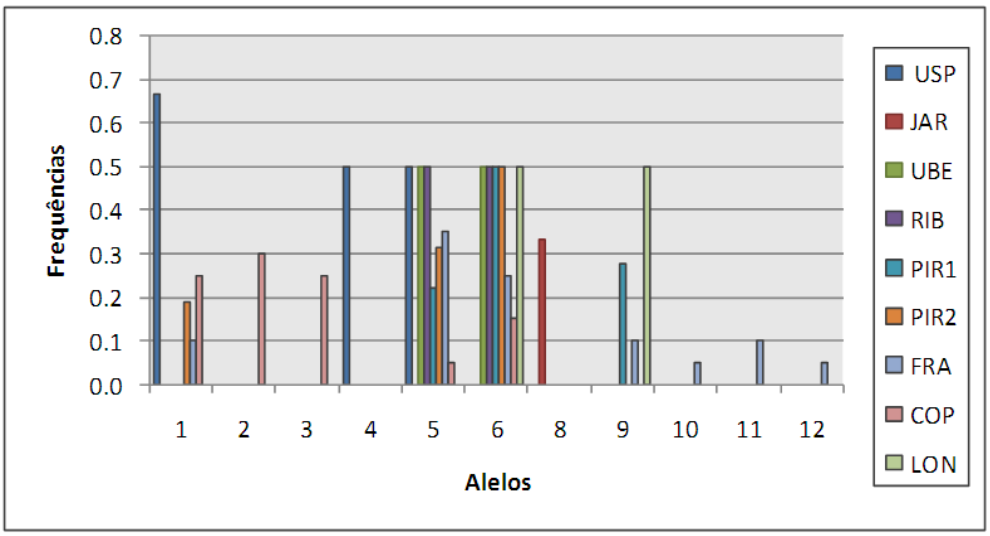

Gráfico 08 - Marcador Sde10. Frequência dos alelos por ninho.

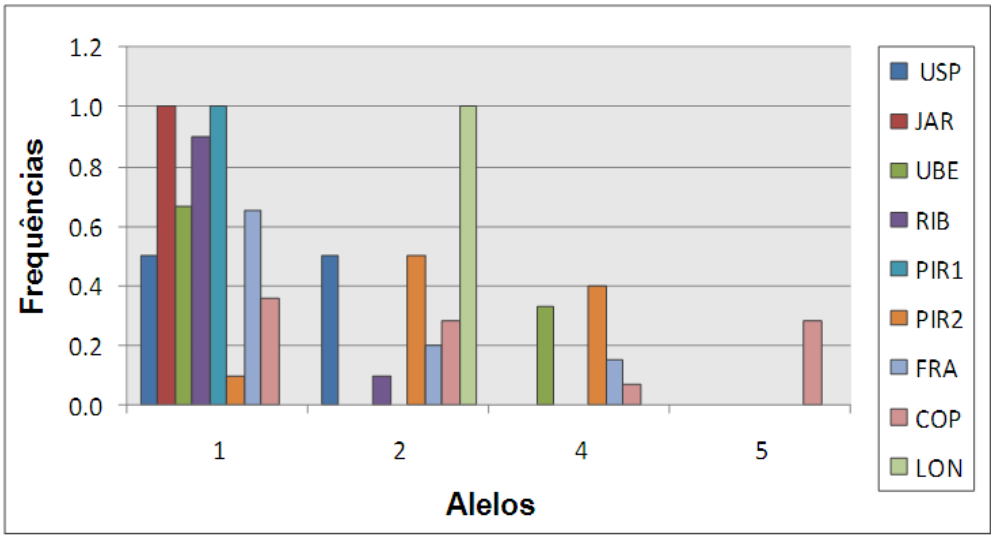

Gráfico 09 - Marcador Sde11. Frequência dos alelos por ninho.

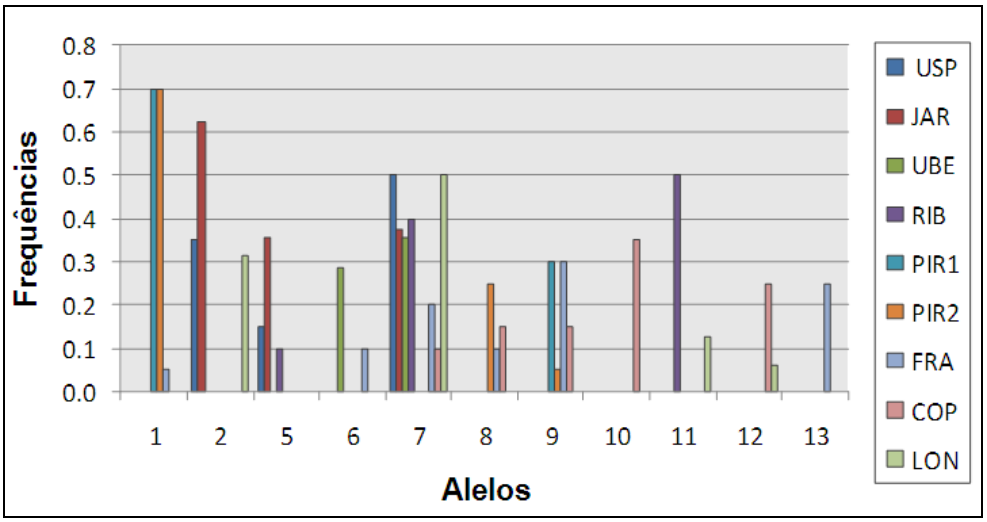

Gráfico 10 - Marcador Sde13. Frequência dos alelos por ninho.

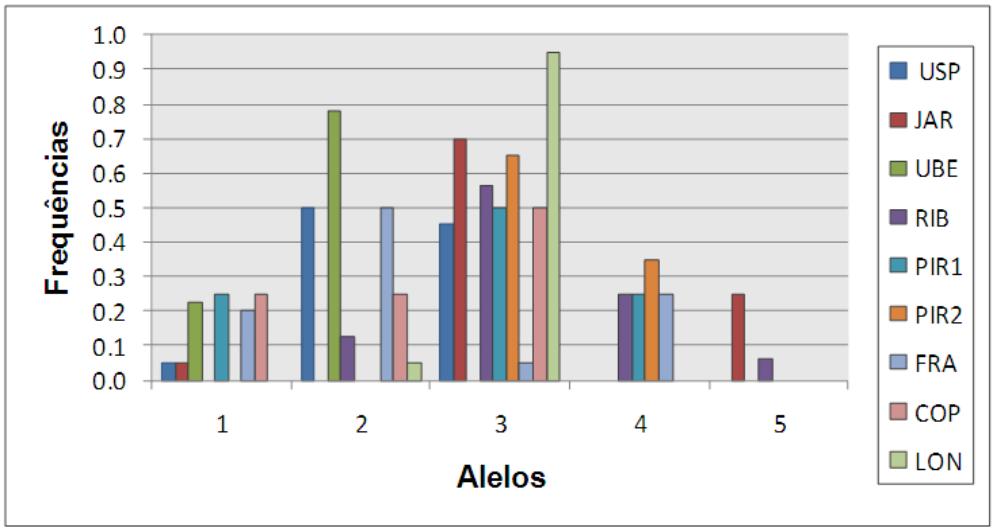

Gráfico 11 - Marcador Sde15. Frequência dos alelos por ninho.

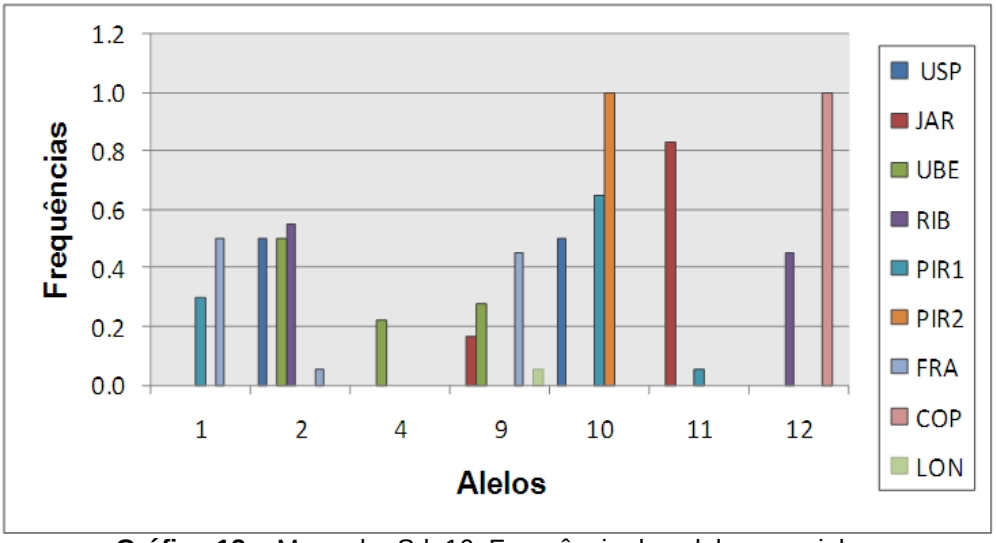

Gráfico 12 - Marcador Sde16. Frequência dos alelos por ninho.

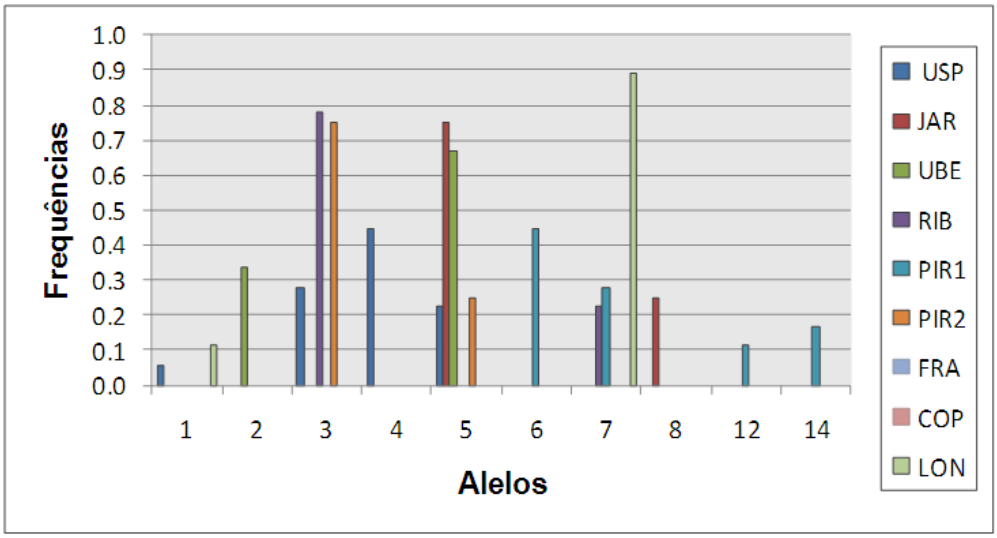

Gráfico 13 - Marcador Sde17. Frequência dos alelos por ninho.

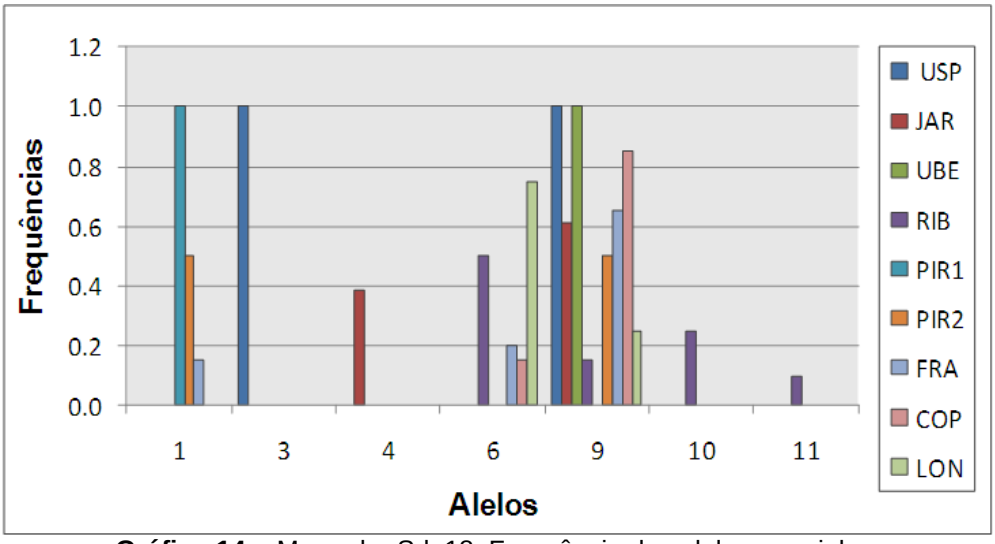

Gráfico 14 - Marcador Sde18. Frequência dos alelos por ninho.

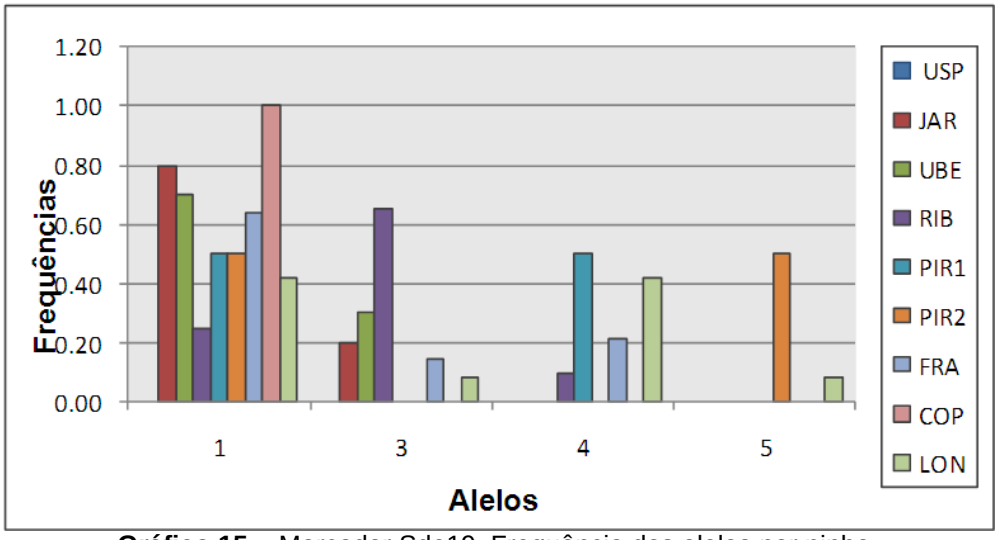

Gráfico 15 - Marcador Sde19. Frequência dos alelos por ninho.

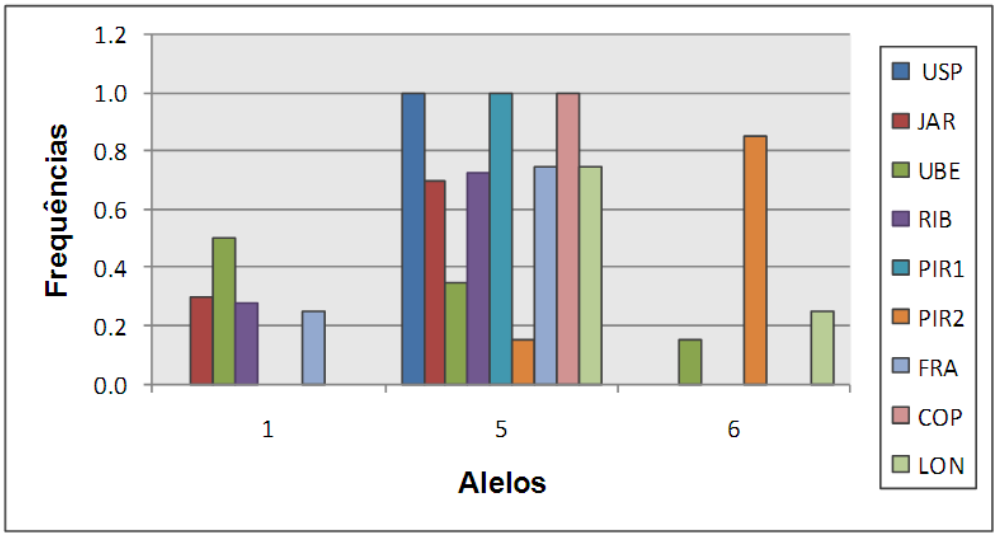

Gráfico 16 - Marcador Sde20. Frequência dos alelos por ninho.

Anexo II. Tabelas de 01 a 09

Tabela 01. Ninho USP. Alelos encontrados por loco e suas freqüências.

Locos	Alelo	Frequência
sed01	10	0,5000
sed01	01	0,5000
sed02	01	0,1250
sed02	05	0,1875
sed02	03	0,1875
sed02	04	0,5000
sed03	01	1,0000
sed06	06	0,2500
sed06	01	0,7500
sed07	03	0,3000
sed07	04	0,7000
sed08	05	0,0556
sed08	03	0,8333
sed08	06	0,0556
sed08	04	0,0556
sed09	02	0,5000
sed09	01	0,5000
sed10	05	0,5000
sed10	04	0,5000
sed11	02	0,5000
sed11	01	0,5000
sed13	05	0,1500
sed13	07	0,5000
sed13	02	0,3500
sed15	03	0,4500
sed15	02	0,5000
sed15	01	0,5000
sed16	10	0,5000
sed16	02	0,5000
sed17	05	0,2222
sed17	04	0,4444
sed17	01	0,0556
sed17	03	0,2778
sed18	09	1,0000
sed19	03	1,0000
sed20	05	1,0000

Tabela 02. Ninho JAR. Alelos encontrados por loco e suas freqüências.

Locos	Alelo	Frequência
sed01	09	0,5000
sed01	05	0,5000
sed02	05	0,5000
sed02	03	0,5000
sed03	01	1,0000
sed06	02	0,6111
sed06	01	0,3889
sed07	03	0,5000
sed07	04	0,5000
sed08	02	0,5500
sed08	01	0,1000
sed08	06	0,2500
sed08	04	0,1000
sed09	03	0,4167
sed09	02	0,5000
sed09	01	0,0833
sed10	08	0,3333
sed10	01	0,6667
sed11	01	1,0000
sed13	07	0,3750
sed13	02	0,6250
sed15	05	0,2500
sed15	03	0,7000
sed15	01	0,0500
sed16	09	0,1667
sed16	11	0,8333
sed17	08	0,2500
sed17	05	0,7500
sed18	04	0,3889
sed18	09	0,6111
sed19	01	0,8000
sed19	03	0,2000
sed20	01	0,3000
sed20	05	0,7000

Tabela 03. Ninho UBE. Alelos encontrados por loco e suas freqüências.

Locos	Alelo	Frequência
sed01	09	0,5000
sed01	12	0,5000
sed02	01	0,1429
sed02	04	0,8571
sed03	01	1,0000
sed06	03	0,2500
sed06	01	0,7500
sed07	06	0,2500
sed07	05	0,7500
sed08	02	0,0500
sed08	01	0,2000
sed08	04	0,7500
sed09	03	0,0625
sed09	02	0,4375
sed09	01	0,5000
sed10	06	0,5000
sed10	05	0,5000
sed11	04	0,3333
sed11	01	0,6667
sed13	06	0,2857
sed13	05	0,3571
sed13	07	0,3571
sed15	02	0,7778
sed15	01	0,2222
sed16	04	0,2222
sed16	09	0,2778
sed16	02	0,5000
sed17	02	0,3333
sed17	05	0,6667
sed18	09	1,0000
sed19	01	0,7000
sed19	03	0,3000
sed20	06	0,1500
sed20	01	0,5000
sed20	05	0,3500
sed20	05	0,3500

Tabela 04. Ninho RIB. Alelos encontrados por loco e suas freqüências.

Locos	Alelo	Frequência
sed01	14	0,1250
sed01	12	0,4375
sed01	09	0,3125
sed01	10	0,1250
sed02	01	0,0500
sed02	05	0,9500
sed03	01	1,0000
sed06	02	1,0000
sed07	02	0,5000
sed07	04	0,5000
sed08	02	0,6000
sed08	01	0,1500
sed08	03	0,2500
sed09	03	0,2500
sed09	02	0,4375
sed09	01	0,3125
sed10	06	0,5000
sed10	05	0,5000
sed11	02	0,1000
sed11	01	0,9000
sed13	11	0,5000
sed13	05	0,1000
sed13	07	0,4000
sed15	04	0,2500
sed15	05	0,0625
sed15	03	0,5625
sed15	02	0,1250
sed16	12	0,4500
sed16	02	0,5500
sed17	07	0,2222
sed17	03	0,7778
sed18	11	0,1000
sed18	10	0,2500
sed18	06	0,5000
sed18	09	0,1500
sed19	04	0,1000
sed19	01	0,2500
sed19	03	0,6500
sed20	01	0,2778
sed20	05	0,7222

Tabela 05. Ninho PIR1. Alelos encontrados por loco e suas freqüências.

Locos	Alelo	Frequência
sed01	16	0,0556
sed01	07	0,0556
sed01	15	0,4444
sed01	12	0,1111
sed01	10	0,3333
sed02	06	0,1250
sed02	02	0,1875
sed02	05	0,3750
sed02	03	0,3125
sed03	01	1,0000
sed06	07	0,0714
sed06	03	0,1429
sed06	02	0,0714
sed06	06	0,2857
sed06	01	0,4286
sed07	02	0,6250
sed07	04	0,3750
sed08	03	1,0000
sed09	02	1,0000
sed10	09	0,2778
sed10	06	0,5000
sed10	05	0,2222
sed11	01	1,0000
sed13	09	0,3000
sed13	01	0,7000
sed15	04	0,2500
sed15	03	0,5000
sed15	01	0,2500
sed16	01	0,3000
sed16	11	0,0500
sed16	10	0,6500
sed17	14	0,1667
sed17	12	0,1111
sed17	06	0,4444
sed17	07	0,2778
sed18	01	1,0000
sed19	04	0,5000
sed19	01	0,5000
sed20	05	1,0000

Tabela 06. Ninho PIR2. Alelos encontrados por loco e suas freqüências.

Locos	Alelo	Frequência
sed01	15	0,0500
sed01	14	0,9000
sed01	12	0,0500
sed02	05	0,5556
sed02	03	0,1111
sed02	04	0,3333
sed03	01	1,0000
sed06	02	1,0000
sed07	07	0,0500
sed07	03	0,5000
sed07	04	0,4500
sed08	02	1,0000
sed09	02	0,6667
sed09	01	0,3333
sed10	06	0,5000
sed10	01	0,1875
sed10	05	0,3125
sed11	04	0,4000
sed11	02	0,5000
sed11	01	0,1000
sed13	08	0,2500
sed13	09	0,0500
sed13	01	0,7000
sed15	04	0,3500
sed15	03	0,6500
sed16	10	1,0000
sed17	05	0,2500
sed17	03	0,7500
sed18	01	0,5000
sed18	09	0,5000
sed19	05	0,5000
sed19	01	0,5000
sed20	06	0,1500
sed20	05	0,8500

Tabela 07. Ninho LON. Alelos encontrados por loco e suas freqüências.

Locos	Alelo	Frequência
sed02	03	0,5000
sed02	04	0,5000
sed03	01	1,0000
sed05	02	0,5000
sed05	03	0,5000
sed06	02	0,8000
sed06	01	0,2000
sed07	02	0,1250
sed07	04	0,8750
sed08	02	1,0000
sed09	02	1,0000
sed10	09	0,5000
sed10	06	0,5000
sed11	02	1,0000
sed13	12	0,0625
sed13	11	0,1250
sed13	07	0,5000
sed13	02	0,3125
sed15	03	0,9500
sed15	02	0,0500
sed16	09	0,0500
sed16	11	0,0500
sed17	07	0,8889
sed17	01	0,1111
sed18	06	0,7500
sed18	09	0,2500
sed19	05	0,0833
sed19	04	0,4167
sed19	01	0,4167
sed19	03	0,0833
sed20	06	0,2500
sed20	05	0,7500

Tabela 08. Ninho COP. Alelos encontrados por loco e suas freqüências.

Locos	Alelo	Frequência
sed02	05	0,3500
sed02	03	0,5000
sed02	04	0,1500
sed03	01	1,0000
sed05	05	0,5000
sed05	03	0,5000
sed06	02	1,0000
sed07	05	0,5000
sed07	04	0,5000
sed08	02	0,5000
sed08	05	0,1500
sed08	03	0,3500
sed09	02	0,8333
sed09	01	0,1667
sed10	02	0,3000
sed10	03	0,2500
sed10	06	0,1500
sed10	01	0,2500
sed10	05	0,0500
sed11	05	0,2857
sed11	04	0,0714
sed11	02	0,2857
sed11	01	0,3571
sed13	12	0,2500
sed13	10	0,3500
sed13	08	0,1500
sed13	09	0,1500
sed13	07	0,1000
sed15	03	0,5000
sed15	02	0,2500
sed15	01	0,2500
sed16	12	1,0000
sed18	06	0,1500
sed18	09	0,8500
sed19	01	1,0000
sed20	05	1,0000

Tabela 09. Ninho FRA. Alelos encontrados por loco e suas freqüências.

Locos	Alelo	Frequência
sed02	06	0,2500
sed02	04	0,7500
sed03	01	1,0000
sed05	07	0,0500
sed05	04	0,2000
sed05	06	0,0500
sed05	01	0,0500
sed05	02	0,4000
sed05	05	0,1500
sed05	03	0,1000
sed06	04	0,0625
sed06	02	0,6250
sed06	06	0,1250
sed06	01	0,1875
sed07	01	0,1000
sed07	02	0,2500
sed07	05	0,0500
sed07	04	0,6000
sed08	05	0,0833
sed08	03	0,5833
sed08	04	0,3333
sed09	02	0,4286
sed09	01	0,5714
sed10	12	0,0500
sed10	10	0,0500
sed10	11	0,1000
sed10	09	0,1000
sed10	06	0,2500
sed10	01	0,1000
sed10	05	0,3500
sed11	04	0,1500
sed11	02	0,2000
sed11	01	0,6500
sed13	13	0,2500
sed13	08	0,1000
sed13	09	0,3000
sed13	01	0,0500
sed13	06	0,1000
sed13	07	0,2000
sed15	04	0,2500
sed15	03	0,0500
sed15	02	0,5000
sed15	01	0,2000
sed16	01	0,5000
sed16	09	0,4500
sed16	02	0,0500
sed18	01	0,1500
sed18	06	0,2000
sed18	09	0,6500
sed19	04	0,2143
sed19	01	0,6429
sed19	03	0,1429
sed20	01	0,2500
sed20	05	0,7500