ALISSON ROBERTO CAMPOS MORESCO

Análise populacional de *Melipona marginata*
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de
RFLP do DNA mitocondrial e microssatélites

SÃO PAULO

2009

ALISSON ROBERTO CAMPOS MORESCO

Análise populacional de *Melipona marginata*
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de
RFLP do DNA mitocondrial e microssatélites

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

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Cristina Arias

SÃO PAULO

2009

Ficha Catalográfica

Moresco, Alisson R. C.

Análise populacional de *Melipona marginata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de RFLP do DNA mitocondrial e microssatélites

Número de páginas: 80

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

1. *Melipona marginata* 2. DNA mitocondrial 3. Microssatélites I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profª. Dra. Maria Cristina Arias

Orientadora

DEDICATÓRIA

A minha família, mãe e Greice,
a memória de meu pai,
a Elen pelo apoio, amor e companhia

Dedico

Se

Se és capaz de manter a tua calma quando
Todo o mundo ao teu redor já a perdeu e te culpa;
De crer em ti quando estão todos duvidando,
E para esses no entanto achar uma desculpa;
Se és capaz de esperar sem te desesperares,
Ou, enganado, não mentir ao mentiroso,
Ou, sendo odiado, sempre ao ódio te esquivares,
E não parecer bom demais, nem pretensioso;

Se és capaz de pensar --sem que a isso só te atires,
De sonhar --sem fazer dos sonhos teus senhores.
Se encontrando a desgraça e o triunfo conseguires
Tratar da mesma forma a esses dois impostores;
Se és capaz de sofrer a dor de ver mudadas
Em armadilhas as verdades que disseste,
E as coisas, por que deste a vida, estraçalhadas,
E refazê-las com o bem pouco que te reste;

Se és capaz de arriscar numa única parada
Tudo quanto ganhaste em toda a tua vida,
E perder e, ao perder, sem nunca dizer nada,
Resignado, tornar ao ponto de partida;
De forçar coração, nervos, músculos, tudo
A dar seja o que for que neles ainda existe,
E a persistir assim quando, exaustos, contudo
Resta a vontade em ti que ainda ordena: "Persiste!";

Se és capaz de, entre a plebe, não te corromperes
E, entre reis, não perder a naturalidade,
E de amigos, quer bons, quer maus, te defenderes,
Se a todos podes ser de alguma utilidade,
E se és capaz de dar, segundo por segundo,
Ao minuto fatal todo o valor e brilho,
Tua é a terra com tudo o que existe no mundo
E o que mais --tu serás um homem, ó meu filho!

Rudyard Kipling, *If*
(Tradução de Guilherme de Almeida)

AGRADECIMENTOS

À Maria Cristina Arias minha orientadora, pela oportunidade concedida e pela paciência.

Ao pessoal do laboratório: Dani Silvestre, Lia, Susy, Alayne, Elaine, Paulo Henrique, Flávio, Rute, Leandro

Ao Vaquero, pelas longas conversas, as trocas de idéias e pela confiança.

À Chris pelas dicas e os bate papos no corredor, sempre muito interessantes.

Ao pessoal do laboratório de peixes: Carol, Mari, Pupis, Raquel, Felipe, Fred, Karine, Bibi, Keila.

Ao pessoal do Lab. De Sistemática Vegetal.

Ao pessoal do Lab. De Fisiologia de Gorduras do ICB.

Ao Artur pelas aparições surpresas e coração sem tamanho.

Aos professores com quem tive contato no IB.

Ao Dr. Geraldo Moretto por me abrir as portas da Ciência, um pai adotivo e pelas abelhas que me enviou.

Ao pessoal do Lab. De Genética da Furb.

Ao Carlos Chociai, Dora Jacobs, Marco Torres, Valmir Zuge, o pessoal do Lab. de Abelhas da USP e o pessoal de Ribeirão por me cederem o material biológico.

Às pessoas com quem convivi durante esse período, entre elas: Jarlei, Sandro, Karina, Fernando, Eli, Henrique, Marcelo, Fabián, He-man.

À Elen pela ajuda, dedicação, apoio, amizade e por ser o amor da minha vida.

À minha mãe e minha irmã, pela compreensão, apoio e afeto.

Aos familiares, pelo apoio.

À Deus.

ÍNDICE

1 Introdução	1
1.1 O gênero <i>Melipona</i>	1
1.1.1 A espécie <i>Melipona marginata</i> Lepeletier	1
1.2 O DNA mitocondrial (DNAMt) em animais	3
1.3 Microssatélites	4
1.4 Marcadores moleculares no estudo de abelhas	5
2 Objetivos	9
2.1 Objetivo geral	9
2.2 Objetivos específicos	9
3 Materiais e métodos	10
3.1 Extração de DNA	12
3.2 Amplificação de regiões do genoma mitocondrial via PCR	13
3.3 A digestão do produto de PCR com Enzimas de Restrição	14
3.4 Análise de microssatélites	15
3.5 Análise estatística dos dados	16
4 Resultados e discussão	18
4.1 PCR-RFLP	18
4.2 Microssatélites	38
5 Conclusões	49
6 Resumo	50
7 Abstract	51
8 Referências bibliográficas	52
9 Anexo	62

1. INTRODUÇÃO

As abelhas da tribo Meliponini ocorrem nos trópicos de todo o mundo, sendo a maioria das espécies encontradas na região Neotropical (MICHENER, 2000). Pertencem à família Apidae e subfamília Apinae. Estão organizados em aproximadamente 50 gêneros (MOURE *et al.*, 2007), composto por aproximadamente 500 espécies (COSTA *et al.*, 2005), sendo o número total de espécies da tribo Meliponini difícil de ser mensurado devido ao grande número de espécies crípticas (MICHENER, 2000).

Segundo ROUBIK (1989), as abelhas Meliponini estão entre as mais abundantes e ecologicamente importantes espécies de invertebrados sociais tropicais, devido a seu papel na polinização.

As fêmeas apresentam o ferrão e as estruturas associadas extremamente reduzidas (MICHENER, 2000), sendo conhecidas por isso como “abelhas sem ferrão”. Apresentam comportamento eussocial, nidificam em ocos de árvore, no chão e no caso de algumas espécies em cavidades nas paredes das casas e em muros (SILVEIRA *et al.*, 2002).

1.1 O gênero *Melipona*

O gênero *Melipona* é estritamente neotropical, compreendendo mais de 60 espécies, com sua distribuição indo do México até a Argentina (MOURE *et al.*, 2007). Atualmente são reconhecidos quatro subgêneros: *Eomelipona*, *Melikerria*, *Melipona* e *Michmelia* (MOURE *et al.*, 2007). Seus ninhos são construídos em ocos de árvore e, segundo KERR *et al.* (1994), essas abelhas apresentam uma grande importância ecológica, chegando a ser responsável por 60% a 90% da polinização, dependendo da área florestal em que se encontram.

1.1.1 A espécie *Melipona marginata* Lepeletier

A espécie *Melipona marginata* (Figura 1), conhecida popularmente como manduri, pertence ao subgênero *Eomelipona*, sendo uma das menores do gênero e também uma das mais ancestrais (NOGUEIRA-NETO, 1963).

Sua distribuição geográfica abrange os estados brasileiros do Ceará (CE), Pernambuco (PE), Bahia (BA), Goiás (GO), Espírito Santo (ES), Rio de Janeiro (RJ), Mato Grosso (MT), Minas Gerais (MG), São Paulo (SP), Paraná (PR), Santa Catarina (SC), Rio Grande do Sul (RS) e os estados de Misiones na Argentina e Caaguazú no Paraguai (MOURE *et al.*, 2007).

Como outras espécies do gênero, também nidifica em ocos de árvores (Figura 2) e em paredes de taipa (VON IHERING, 1930). A estrutura do ninho da *M. marginata* também segue o padrão dos demais meliponíneos, sendo os favos dispostos horizontalmente (Figura 3). Os

potes, local de armazenamento de mel e pólen, e o invólucro do ninho são construídos com um material resultante da combinação da cera (elaborada pelas próprias abelhas), e de resinas que as abelhas coletam das plantas, denominado cerume.

Em *M. marginata* é verificado uma variação na coloração de acordo com a altitude em que o ninho se encontra, essa característica foi notada primeiramente por Fritz Muller quando da sua descrição da atual *M. obscurior* em 1875, em Blumenau-SC, como *M. pulchella* (NOGUEIRA-NETO, 1966).

Até recentemente *M. marginata* era dividida em três subespécies: *M. marginata marginata* LEPELETIER, 1836; *M. marginata carioca* MOURE, 1971; e *M. marginata obscurior* MOURE, 1971. Entretanto, recentemente a subespécie *M. marginata obscurior* foi elevada ao caráter de espécie (MOURE *et al.*, 2007). É interessante salientar que *M. marginata* possuía várias subespécies, mas à medida que os estudos taxonômicos foram se aprofundando elas foram elevadas à espécie, como se pode verificar na classificação de MOURE *et al.* (2007).

Alguns trabalhos foram realizados com essa espécie no nível etológico. BORGES e BLOCHTEIN (2005) compararam a atividade externa dessa espécie em períodos distintos do ano; KLEINERT-GIOVANNINI e IMPERATRIZ-FONSECA (1986) estudaram a resposta da atividade de vôo em relação ao clima em duas subespécies de *M. marginata*. No nível ecológico KLEINERT-GIOVANNINI e IMPERATRIZ-FONSECA (1987) estudaram os aspectos de nicho trófico de *M. marginata*; BORGES e BLOCHTEIN (2006) verificaram que *M. marginata* é a única espécie do gênero que realiza diapausa reprodutiva, ou seja, a rainha pode parar a postura de ovos durante o inverno, ou em períodos frios.

Alguns trabalhos destacam que *M. marginata*, assim como outras espécies do gênero *Melipona* vem sofrendo com a destruição do seu ambiente natural, como exemplo, há relatos de diminuição de populações no Paraná (PRONI e MACIEIRA, 2000) e em Minas Gerais, estando praticamente extinta na região de Belo Horizonte (SILVEIRA *et al.*, 2002). Segundo o BDT, Base de Dados Tropicais, ela é considerada como espécie presumivelmente ameaçada de extinção em Minas Gerais e no Rio Grande do Sul (MARQUES *et al.*, 2004).

Aparentemente, a *M. marginata* é mais exigente que outras espécies quanto ao tamanho do fragmento florestal para se manter, sendo encontrada apenas nos fragmentos maiores, mais antigos e menos perturbados (SILVEIRA *et al.*, 2002). NOGUEIRA-NETO (1963) relata que os ninhos de *M. marginata* são pouco populosos. A criação de abelhas sem ferrão, conhecida como meliponicultura, é uma atividade hobbista que vem crescendo nos últimos anos, em alguns casos com interesse comercial para a produção de mel, sendo a espécie *M. marginata* ainda pouco utilizada para esse propósito. Pesquisadores consideram a

meliponicultura uma forma interessante de se conservar espécies nativas (NOGUEIRA-NETO, 1997), entretanto o transporte indiscriminado de colônias pode vir a descaracterizar geneticamente as populações naturais, dificultando a compreensão do processo de distribuição dessa espécie.

Dada às suas características ecológicas, o risco de extinção e a sua taxonomia ainda duvidosa *M. marginata* é uma espécie interessante para se trabalhar, podendo-se obter informações valiosas para um melhor entendimento da própria espécie e da história do gênero *Melipona*.

Figura 1: *Melipona marginata*: A – vista frontal. B – vista lateral

Figura 2: Entrada do ninho de *M. marginata*

Figura 3: Interior de ninho de *M. marginata*. seta identifica a rainha

1.2. O DNA mitocondrial (DNAmf) em animais

O DNA mitocondrial animal é uma molécula circular e pequena (em média possui 16000 pares de bases), apresenta o conteúdo gênico conservado, possuindo apenas 37 genes. Sua organização gênica é simples, pois não possui introns, transposons, pseudogenes e DNA repetitivo. Seu modo de herança é materna na maioria dos animais e não sofre recombinação (MORITZ *et al.* 1987). Dos seus 37 genes constituintes, 24 codificam produtos que atuam na própria tradução do genoma mitocondrial, sendo 22 RNA transportadores e 2 RNA ribossômicos (16S e 12S). Os outros 13 genes codificam para subunidades protéicas da cadeia de transporte de elétrons (BALLARD E WHITLOCK, 2004).

Outra característica do DNAm_t é sua alta taxa de evolução por mutação, fazendo com que o DNAm_t evolua 10 vezes mais rápido que o DNA nuclear. Essa alta taxa de mutação se deve ao ambiente rico em radicais livres da mitocôndria, e à ineficiência do mecanismo de reparo (AVISE, 2000).

Devida às suas características, o DNAm_t tem sido muito empregado em análises populacionais e, aliado a técnicas como o RFLP, constitui-se em uma ótima ferramenta para estudos filogeográficos. Segundo Avise *et al.* (1987), a filogeografia “trata do estudo dos princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas”, auxiliando na interpretação da história de populações e dos processos envolvidos na sua história.

1.3 Microssatélites

Os microssatélites são um poderoso marcador nuclear, amplificados via PCR (reação em cadeia da polimerase), muito usado para testes de identidade, estudos populacionais, evolutivos, análises de ligação e mapeamento genético (QUELLER *et al.*, 1993; WEBER E WONG, 1993).

Os marcadores microssatélites são constituídos por seqüências repetidas *in tandem* de uma a 10 bases, aleatoriamente distribuídas ao longo das regiões eucromáticas (HILLIS *et al.*, 1996). Os alelos de microssatélite são diferenciados pelo tamanho (número de repetições), portanto eles são mais fáceis de serem identificados do que marcadores que diferem pela seqüência, podendo ser descritos pelo tamanho das bandas amplificadas (MCDONALD E WAYNE, 1997). São considerados codominantes, seletivamente neutros, altamente polimórficos, e apresentam herança mendeliana (HILLIS *et al.*, 1996, STRASSMANN *et al.*, 1996).

As repetições mais comuns são constituídas por mono-, di-, tri-, tetra-, penta- e hexanucleotídeos. Segundo CHAMBERS E MACAVOY (2000), os microssatélites podem ser classificados em 6 classes, de acordo com a sua composição de bases:

- puro: (AC)_n
- puro interrompido: (AC)_nTA(AC)_n
- composto: (CT)_n(CA)_n
- composto interrompido: (AC)_nAGAA(AG)_n
- complexo: (TTTC)_n(T)_n(CT)_n(CYKY)_nCTCC(TTCC)_n

-complexo interrompido: alelos com algumas interrupções dentro das unidades de repetição.

Os locos de microssatélites têm sido encontrados em todos os organismos estudados até o momento, distribuídos uniformemente ao longo dos cromossomos, sendo raros nas regiões codificantes (HANCOCK, 1999).

A taxa de mutação dos microssatélites varia muito, dependendo da composição das unidades de repetição (ESTOUP E CORNUET, 1999), do número de repetições, do tipo de genoma (EISEN, 1999), do grupo taxonômico, e também da posição no cromossomo (BALLOUX E LUGON-MOULIN, 2002).

As mutações mais freqüentes nos microssatélites são no número de repetições (EISEN, 1999), e podem ser originadas por dois mecanismos de mutação. O primeiro é denominado *slipped-strand mispairing*, e por esse modelo as mutações ocorrem devido a um deslize da DNA polimerase durante a duplicação do DNA e pode acrescentar ou diminuir repetições. O segundo seria por um *crossing-over* desigual, pois devido à presença das repetições a probabilidade de ocorrerem erros no emparelhamento dos cromossomos homólogos é maior, podendo causar uma deleção em uma das moléculas e uma inserção na outra (EISEN, 1999).

1.4 Marcadores moleculares no estudo de abelhas

Até a metade da década de 1960 as análises populacionais eram baseadas em características fenotípicas, sendo as análises morfométricas responsáveis pela maioria dos estudos de filogenia, taxonomia e sistemática das abelhas Apidae. Na abelha *Apis mellifera* a análise multivariada de caracteres morfológicos associada às características comportamentais e ecológicas permitiu a descrição das inúmeras subespécies presentes no Velho Mundo (RUTTNER, 1986, 1988). Entretanto, a pressão dos efeitos ambientais na expressão dos caracteres morfológicos das abelhas (MORITZ *et al.*, 1994; FRANCK *et al.*, 2000) e a distância entre as populações amostradas (RADLOFF *et al.*, 1998), são aventados como fatores que podem levar a discrepâncias nos estudos de filogenia e classificação das subespécies de *Apis mellifera*.

Os marcadores moleculares se mostraram muito úteis em estudos de genética de populações, tendo um grande impulso com o surgimento da técnica de eletroforese de proteínas, primeiramente utilizada por HARRIS (1966) em humanos e HUBBY E LEWONTIN (1966) em *Drosophila pseudoobscura*. Em abelhas um dos primeiros trabalhos realizados foi por MESTRINER (1969) onde se verificou a variabilidade alélica em locos isoenzimáticos em amostras de *Apis mellifera ligustica* introduzidas no Brasil.

DEL LAMA *et al.* (1990) verificaram a freqüência alélica em duas populações de abelhas africanizadas, uma coletada no Brasil e a segunda na América Central e em duas

populações de origem européia, coletadas na Itália (*A. mellifera ligustica*) e na Alemanha (*A. mellifera carnica*). Os resultados demonstraram alta similaridade genética entre as populações africanizadas, e que há um fluxo gênico mais significativo das raças européias nas amostras da América Central do que nas populações do Brasil.

No entanto, os locos isoenzimáticos apresentam baixa variabilidade em certos organismos e seu uso não é tão recomendado (PAMILO E CROZIER, 1981), como no caso dos insetos sociais.

Logo após o desenvolvimento do método de análise das isoenzimas, se descobriu as enzimas de restrição (LINN E ARBER, 1968; MESELSON E YUAN, 1968), o que possibilitou o desenvolvimento da técnica de RFLP (polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição), muito utilizada nos últimos anos e que tem se mostrado eficiente em diversos estudos.

Em abelhas a técnica de RFLP tem sido amplamente utilizada. SHEPPARD *et al.* (1996) verificaram a variabilidade do DNAm_t em 9 subespécies de *A. mellifera* do velho mundo, detectando 20 haplótipos distintos quando utilizada a enzima *Hinf* I. COLLET *et al.* (2007) verificaram a variação do gene mitocondrial 16S em *Apis mellifera*. por PCR-RFLP, em amostras africanizadas do Brasil, Uruguai, Colômbia e Venezuela, detectando 3 padrões distintos, apresentando um alto conteúdo de A+T e alta razão de transversão para transição similar a outras regiões do DNAm_t de *Apis mellifera*.

Em Meliponini, FRANCISCO *et al.* (2001) caracterizaram o genoma mitocondrial de 5 espécies do gênero *Plebeia*, construindo um mapa de restrição gerado pelo RFLP do DNAm_t. Trabalho similar foi desenvolvido para sete espécies de *Melipona* (WEINLICH *et al.*, 2004). Posteriormente, BRITO E ARIAS (2005) caracterizaram o genoma mitocondrial de *Partamona helleri* e *P. mulata*. SOUZA *et al.* (2008) utilizaram PCR-RFLP do gene mitocondrial citocromo B, para diferenciar molecularmente as subespécies *M. quadrifasciata anthidioides* e *M. q. quadrifasciata*.

Como forma de acessar a biodiversidade, FRANCISCO *et al.* (2008), utilizaram ferramentas moleculares (RFLP do DNAm_t), bioquímicas e morfológicas em *P. remota*, verificando diferenciação entre populações de Cunha (SP) e Prudentópolis (PR), aventado a hipótese de serem espécies distintas.

Os primeiros marcadores microssatélites para as abelhas sem ferrão foram descritos por PETERS *et al.* (1998), identificando 33 locos obtidos de *M. bicolor*. PAXTON *et al.* (1999) também descreveram marcadores microssatélites para abelhas sem ferrão, mais

especificamente 5 locos para *Scaptotrigona postica*. Para *Bombus*, FUNK *et al.* (2006) descreveram 44 locos de microssatélite.

FRANCISCO *et al.* (2006) compararam as características de locos de microssatélites, em três espécies de abelhas sem ferrão (*Plebeia remota*, *Partamona mulata* e *Partamona helleri*), utilizando *primers* desenhados originalmente para *Melipona bicolor* e *Scaptotrigona postica*, acima mencionados. Os autores verificaram baixo nível de polimorfismo para os locos amplificados com os *primers* derivados de *M. bicolor*, no entanto, quanto aos derivados de *Scaptotrigona postica* apenas *P. remota* apresentou baixo nível de polimorfismo.

Microssatélites e caracteres morfológicos foram utilizados por QUEZADA-EUÁN *et al.* (2007) para analisar a estrutura genética de populações de *Melipona beecheii* nos dois extremos da abrangência geográfica da espécie. Os resultados demonstraram que as populações da Costa Rica e da Península de Yucatán (México) exibem diferenciação substancial, tanto para os microssatélites como para os caracteres morfológicos.

Para se verificar a divergência genética entre populações de *Melipona rufiventris*, TAVARES *et al.* (2008) utilizaram alozimas, microssatélites e RAPD, verificando que as populações de uruçú-amarela encontradas na região do cerrado constituem uma espécie diferente (*M. rufiventris*) das populações da Mata Atlântica (*M. mondury*).

Analizando a estrutura genética de machos de *Scaptotrigona mexicana* com microssatélites KRAUS *et al.* (2008) verificaram que os machos contribuem para o fluxo gênico entre grandes distâncias.

Os estudos pioneiros com abelhas utilizando DNAm e microssatélites associados foram realizados com a espécie *Apis mellifera*. FRANCK, *et al.* (1998) utilizaram as duas técnicas para verificar a origem das subespécies de *Apis mellifera* do oeste europeu, confirmando as linhagens evolutivas descritas por RUTTNER (1988). FRANCK *et al.* (2000) analisaram populações de *A. mellifera* da África, Europa e América do Norte, para verificar a diversidade genética da espécie, encontrando as linhagens evolutivas já conhecidas e propondo a existência de uma nova linhagem.

WIDMER *et al.* (1998) analisaram a estrutura genética de *Bombus terrestris* e a história de sua colonização nas Ilhas Canárias e Madeira, os resultados obtidos com os microssatélites para as amostras das Ilhas Canárias demonstraram uma baixa variabilidade no número de alelos e de heterozigotos, quando comparadas com as populações do continente europeu, enquanto os haplótipos de DNAm encontrados nas Ilhas Canárias divergem daqueles do continente. Segundo os autores o resultado observado com os dois marcadores sugere uma colonização antiga, e uma longa história da população residente nessas ilhas. Já para a Ilha da

Madeira os resultados foram outros, a variabilidade dos locos microssatélites foi similar à das populações do continente europeu e das ilhas do Mediterrâneo, assim como o haplótipo mitocondrial amostrado na Ilha da Madeira, também foi encontrado nas outras populações.

FRANCISCO (2002) analisou 4 populações de *Plebeia remota* e verificou tanto por RFLP do DNAm quanto por microssatélites, um grande isolamento da população de Prudentópolis (PR). Por outro lado, os dois marcadores também apresentaram resultados divergentes, pois nas análises do DNAm verificou-se diferenciação entre todas as populações analisadas, enquanto as análises de microssatélites não demonstraram diferenciação entre as populações de São Paulo e Curitiba (PR), e entre as populações de Curitiba (PR) e SC.

Populações de *Partamona helleri* e *P. mulata* foram analisadas por BRITO (2005), e verificou-se nas análises de microssatélites uma baixa variabilidade genética em cada espécie e uma discreta estruturação populacional. Nas análises do DNAm verificou-se uma baixa diversidade em *Partamona mulata*, enquanto que em *Partamona helleri* foi possível identificar alto polimorfismo e o isolamento de uma das populações (Bahia).

INSUAN *et al.* (2007) verificaram a diferenciação genética em *Apis dorsata* na Tailândia, coletando indivíduos nas regiões norte, nordeste, central, peninsular e na ilha Samui, revelando uma diversidade genética limitada ao se analisar o DNAm, ocorrendo o contrário ao se analisar as mesmas amostras com marcadores microssatélites.

O uso conjunto das análises de locos microssatélites e polimorfismos do DNAm tem sido aplicado em estudos de grande variedade de organismos, com resultados surpreendentes, fornecendo informações sobre a biologia, comportamento, dinâmica da população e evolução das espécies (ARIAS *et al.*, 2006).

Além dos estudos de caráter evolutivo-biológico, as abelhas têm ganhado destaque na “era” da genômica. O primeiro genoma mitocondrial sequenciado de um Hymenoptera foi o de *Apis mellifera* (CROZIER E CROZIER, 1993). A obtenção da sequência desse genoma possibilitou um grande desenvolvimento das pesquisas, principalmente por ter facilitado o desenho de *primers* para a amplificação de regiões específicas (SIMON *et al.*, 1994). Recentemente, essa mesma espécie teve o genoma nuclear totalmente sequenciado (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006), sendo o quarto inseto a ter o genoma publicado.

Os marcadores moleculares têm sido amplamente usados na biologia para resolver questões relacionadas com a ecologia, genética e evolução, e seu uso aumentou muito nos últimos anos graças ao desenvolvimento e aperfeiçoamento dessas técnicas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Estudar a estrutura populacional da espécie *Melipona marginata*.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os haplótipos mitocondriais existentes ao longo da distribuição geográfica da espécie e inferir as relações genéticas e filogenéticas entre os haplótipos
- Inferir a dinâmica populacional da espécie pela análise conjunta de locos de microssatélites e RFLP do genoma mitocondrial.

3. Materiais e métodos

Neste trabalho foram analisados indivíduos de *M. marginata* coletados em cinco estados brasileiros (Figura 4), Minas Gerais (MG), São Paulo (SP), Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS), totalizando nove localidades e 54 colméias, assim distribuídas:

- Cristiano Otoni (MG): 7 colméias (MG 1 a 7) originalmente coletadas em Cristiano Otoni, porém mantidas na Estação Ambiental de Peti em São Gonçalo do Rio Abaixo.
- Cunha (SP): 11 colméias originárias de Cunha sendo duas (SP1 e SP2) mantidas no Laboratório de Abelhas do Departamento de Ecologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 6 amostras (SP3, SP4, SP5, SP7, SP8, SP9) foram retiradas de material depositado em freezer -80°, provenientes de ninhos não mais existentes, que eram mantidos no Laboratório de Abelhas do Departamento de Ecologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, e 3 (SP10, SP11 e SP12) mantidas no Laboratório de Genética de Abelhas da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto.
- São Paulo (SP): uma colméia (SP6) mantida no Parque da Água Branca.
- Prudentópolis (PR): 15 colméias mantidas em um meliponário em troncos naturais (PR1 a 15).
- Blumenau (SC): 12 colméias (SC1 a 12), originárias da região do Vale do Itajaí e mantidas no Meliponário do Campus da Universidade Regional de Blumenau.
- Itaiópolis (SC): duas colméias (SC15 e 16) originárias de Itaiópolis e mantida no Meliponário do Campus da Universidade Regional de Blumenau.
- Apiúna (SC): uma colméia (SC13), mantida em um meliponário.
- Nova Trento (SC): uma colméia (SC14), mantida em um meliponário.
- Boqueirão do Leão (RS): duas colméias (RS1 e RS2), mantidas em um meliponário.
- Porto Alegre (RS): duas colméias (RS3 e RS4), mantidas de um meliponário.

Figura 4: Mapa indicando as cidades de origem dos ninhos de *M. marginata* amostrados.

Para a obtenção de amostras de algumas localidades foram estabelecidos contatos telefônicos com meliponicultores, verificando se os mesmos possuíam *M. marginata* e a sua disponibilidade em enviar amostras, sendo assim foram enviados tubos com álcool 70% para a coleta e envio de amostras. As amostras recebidas via correio foram lavadas e posteriormente acondicionadas a -80° até o momento da extração de DNA, sendo esse o caso das amostras de MG, PR, RS e SC. As amostras do IB/USP foram coletadas e armazenadas a -80° .

3.1 Extração do DNA

Para a extração de DNA total foi adotado primeiramente o método Chelex (WALSH *et al.*, 1991) e posteriormente foi utilizado o método compilado por SHEPPARD E MCPHERON (1991) com modificações. Abaixo segue a descrição do protocolo utilizado:

1. Macerar um tórax de abelha em um tubo de 1,5ml contendo 100µl do tampão A de extração (2 mM Tris-HCL pH 8,0; 10% SDS; 5M NaCl, 50% sucrose, 0,5Ml EDTA (pH 8,0), adicionando 0,5µl de proteinase-K na concentração de 20mg/ml);
2. Incubar a 55°C por 30 minutos;
3. Acrescentar 100µl de tampão B (2M Tris-HCL pH 8,0; 50% sucrose, 0,5M EDTA (pH 8,0); 10% SDS)
4. Incubar no gelo durante 10 minutos;
5. Adicionar 200µl de fenol;
6. Incubar no gelo por 3 minutos;
7. Centrifugar por 5 minutos a 14.000 rpm a 4°C;
8. Recolher 200µl do sobrenadante e em um tubo novo adicionar 100µl de fenol e 100µl clorofórmio/álcool isoamílico (24:1);
9. Misturar bem e colocar no gelo por 3 minutos;
10. Centrifugar por 5 minutos a 14.000 rpm a 4°C;
11. Recolher 200µl do sobrenadante e em um tubo novo adicionar 200µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) (200µl);
12. Centrifugar por 5 minutos a 14.000 rpm a 4°C;
13. Remover o sobrenadante (200µl) e em um tubo novo adicionar 15µl de Acetato de amônia e 500µl de etanol 100%;
14. Inverter o tubo gentilmente 10 vezes e incubar a -20°C por 12 horas;
15. Centrifugar por 20 minutos a 4°C;

16. Remover o sobrenadante (fixando os tubos num suporte e descartando em uma pia) e adicionar 30µl de etanol 70%;
17. Centrifugar por 10 minutos;
18. Cuidadosamente remover o sobrenadante (fixando os tubos num suporte e descartando em uma pia) e secar o pellet no vácuo;
19. Redissolver o pellet em 50µl TE (1X).

3.2 Amplificação de regiões do genoma mitocondrial via PCR

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se 0,5 µl de DNA extraído pelo método descrito por SHEPPARD E MCPHERON (1991). À solução foram adicionados 5 µl de tampão PCR, 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 1,5 µl de cada *primer* 20 µM, 5 µl de dNTPs 2 mM cada, 0,5 µl de Taq DNA polimerase em um volume total de 50 µl. Cada reação de PCR, inicialmente, foi submetida a uma desnaturação a 94°C/5min., seguida de 35 ciclos (desnaturação a 94°C/1min., anelamento a 1 min. e 20s a uma temperatura específica para cada par de *primers* conforme tabela 1 e elongação a 64°C/2min.). No final do ciclo foi realizado uma elongação extra a 64°C durante 10 minutos.

Para a amplificação de regiões específicas do DNA mitocondrial das abelhas *M. marginata* foram utilizados oito pares de *primers* (tabela 1). Entre esses *primers* vários são derivados do genoma mitocondrial de insetos (UBC Insect Mitochondrial DNA *Primers* Kit) (SIMON *et al.*, 1994), outros derivados do genoma mitocondrial de *Apis mellifera* (HALL e SMITH, 1991 e FRANCISCO *et al.*, 2001) e um derivado do genoma mitocondrial da abelha *Melipona bicolor* (FRANCISCO *et al.*, 2001).

Os produtos das reações de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corados em brometo de etídeo, visualizados em um transluminador de luz UV e fotografados com uma câmera digital.

Tabela 1. Pares de *primers* para amplificação de regiões do genoma mitocondrial de *M. marginata*: nome, sequência, genes (regiões amplificadas) e temperatura de anelamento.

Nome	Sequência (5'→3')	Referência	Genes Principais	Temp. (°C)
MtD2 MtD9	GCTAAATAAGCTAACAGGTTTCAT CCCGGTAAAATTAAAATATAAACTTC	(SIMON <i>et al.</i> , 1994)	ND2 e COI	42
MtD8 MtD12	GGATCACCTGATATAGCATTCCTC GATCAATATCATTGATGACC	(SIMON <i>et al.</i> , 1994)	COI	42
COI-IIIF MtD18	TCTATACCACGACGTTATTC CCACAAATTTCTGAACATTGACCA	(HALL E SMITH, 1991) + (SIMON <i>et al.</i> , 1994)	COI e COII	42
MtD19 MtD22	GAAATTTGTGGAGCAAATCATAG TCAACAAAGTGTCAGTATCA	(SIMON <i>et al.</i> , 1994)	ATPases 8 e 6 e COIII	42
MtD24 MtD28	GGAGCTTCAACATGAGCTTT ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT	(SIMON <i>et al.</i> , 1994)	ND4, ND6 e CytB	42
MtD26 MtD30	TATGTACTACCATGAGGACAAATATC ATTCAGGATCGTAAAGGTCC	(SIMON <i>et al.</i> , 1994)	CytB e ND1	42
Mel 3 16SF	TAAAGTTAAAAAAGCAACTC CACCTGTTTATCAAAAACATGTCC	(FRANCISCO <i>et al.</i> , 2001) + (HALL E SMITH, 1991)	ND1 e 16S	42
Seq6 MtD36	CGTCGATTGAACTCAAATCATG AAACTAGGATTAGATACCCTATTAT	(FRANCISCO <i>et al.</i> , 2001) + (SIMON <i>et al.</i> , 1994)	16S e 12S	42

3.3 A digestão do produto de PCR com Enzimas de Restrição

Para verificar a existência dos sítios de restrição, os fragmentos de DNAm_t amplificados via PCR foram digeridos durante um período de no mínimo seis horas com as enzimas de restrição descritas na tabela 2.

Os resultados das digestões foram analisados em gel de agarose com a concentração podendo variar de 0,8% a 2,0% ou em gel de poliacrilamida 5,6%, sendo estes últimos corados com nitrato de prata para a visualização dos fragmentos.

Tabela 2: Enzimas de restrição utilizadas na digestão do DNAm das abelhas *M. marginata* e seus respectivos sítios de restrição (/ indica o local de corte).

Enzimas	Sítio de Restrição
	5' → 3'
<i>Ase</i> I	AT / TAAT
<i>Bcl</i> I	T / GATCA
<i>Bgl</i> II	A / GATCT
<i>Cla</i> I	AT / CGAT
<i>Dra</i> I	TTT / AAA
<i>EcoR</i> I	G / AATTC
<i>EcoR</i> V	GAT / ATC
<i>Hae</i> III	GG / CC
<i>Hinf</i> I	G / ANTC
<i>Hind</i> III	A / AGCTT
<i>Pst</i> I	CTGCA / G
<i>Ssp</i> I	AAT / ATT

3.4 Análise de microssatélites

Para as análises dos locos de microssatélites, um indivíduo por ninho foi genotipado. Foram utilizados 8 pares de *primers* derivados de *M. bicolor* (PETERS *et al.* 1998) (tabela 3). Os resultados dos marcadores microssatélites foram analisados em géis de poliacrilamida 5,6% ou 9%, posteriormente corados com prata.

Tabela 3: *Primers* derivados de *M. bicolor* (Mbi) testados para a amplificação de locos microssatélites em *M. marginata*, tamanho do fragmento em pares de base (Tf) e respectiva repetição. Ta: temperatura de anelamento.

<i>Primers</i>	Tf esperado	Repetição	Ta °C
Mbi 11	152	(GC) ₃ ...(GGCT) ₈ (ACC) ₈ ATC(GCC) ₅	55
Mbi 32	154	(GGA) ₄ (GGAGAA) ₅	60
Mbi 201	152	(CTT) ₁₀ CTC(CTT) ₅ (CCT) ₉ (CTT) ₂	60
Mbi 215	92	(TTC) ₆	60
Mbi 232	128	(CTT) ₁₃	50
Mbi 233	119	(GAA) ₁₅	57,5
Mbi 256	127	(AGA) ₉	57,5
Mbi 278	113	CTT(CTC) ₂ CTTCTCTGCTTCC	60

3.5 Análise estatística dos dados

Para facilitar a visualização e a análise dos resultados do RFLP foram definidos, por letras, os padrões de corte de cada enzima (tabela 32 a 38 em anexo). Para a determinação dos haplótipos compostos, compilou-se os padrões de corte, por exemplo para enzima *EcoR* I, em cada uma das 8 regiões mitocondriais amplificadas. Essa combinação única foi denominada por uma letra, como abaixo:

EcoR I - AAAAAAAAA – A
AAAABAA – B

Dessa forma definiu-se o haplótipo composto (hap) com todas as enzimas, sendo cada letra correspondente aos padrões de restrição compilados por enzima. Sendo assim, a primeira letra representa a compilação dos padrões de *EcoR* I, e assim por diante.

hap1 ABAACDE
hap2 BBBBDEC

A partir da análise dos fragmentos gerados por cada enzima, em cada região separadamente, o programa GENERATE construiu uma matriz de presença/ausência de fragmento. A partir dessa matriz, o programa DSE gerou uma matriz de distância genética entre os haplótipos (*d*), baseados nos cálculos de NEI e TAJIMA (1981) e NEI e MILLER (1990), também calculando o seu erro padrão de acordo com NEI e TAJIMA (1983) e NEI (1987).

Com o programa DA foram calculados os índices de diversidade haplotípica (*h*), estimado segundo NEI (1987), os valores de diversidade nucleotídica (π) dentro de cada população (*p*) e a divergência de sequência de nucleotídeos entre todos os pares de população (*d*), ambos estimados segundo NEI e TAJIMA (1981) e NEI (1987). Todos esses programas fazem parte do pacote de programas REAP (“Restriction Enzyme Analysis Package”) v4.0 (MCELROY *et al.*, 1992).

O programa ARLEQUIN v2.000 (SCHNEIDER *et al.*, 2000) foi empregado para se verificar as diferenças entre as populações, baseada nas frequências haplotípicas, realizando o teste exato, juntamente com o método da cadeia de Markov. Com esse programa também foram feitos cálculos da estrutura populacional através da análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER *et al.*, 1992) e também permitiu cálculos do índice F_{st} entre pares de populações, e o valor estatístico Φ_{ST} , que é definido como a correlação entre haplótipos retirados ao acaso de uma população, em relação ao total de haplótipos da espécie (EXCOFFIER *et al.*, 1992). O programa MEGA v2.1 (KUMAR *et al.*, 2001) foi usado para inferências das relações genéticas e filogenéticas entre os haplótipos.

O programa GENEPOP v4.0 (ROUSSET, 2008) foi utilizado para processar os dados de microssatélites. Foram realizados e calculados: o equilíbrio de Hardy-Weinberg, teste exato de Fisher, diversidade gênica, desequilíbrio de ligação, taxas de heterozigose (H), frequência alélica e diferenciação populacional (alélica e fenotípica) e F_{ST} (correlação entre dois alelos retirados ao acaso de sub-populações com relação a alelos amostrados ao acaso da população total).

4. Resultados e discussão

4.1 PCR-RFLP do DNA mitocondrial

Os resultados das reações de PCR podem ser observados na Tabela 4. O tamanho das regiões amplificadas variou de 800 a 2400 pb, sendo que o tamanho foi igual ao esperado em *A. mellifera* para todas as regiões, exceto para a região que compreende a região intergênica de *Apis mellifera* que é ausente em Meliponini. A soma desses fragmentos, diminuindo os locais de sobreposição dos *primers* corresponde a aproximadamente 65,05% do genoma mitocondrial (Figura 5), tendo como base o genoma mitocondrial de *Apis mellifera ligustica*, cujo tamanho é de 16343pb (CROZIER E CROZIER, 1993).

Tabela 4: Regiões amplificadas via PCR e seus respectivos tamanhos.

Genes Principais	Tamanho da região amplificada (pb)
ND2 e COI	2100
COI	900
COI e COII	950
ATPases 8 e 6 e COIII	1700
ND4, ND6 e CytB	2400
CytB e ND1	1700
ND1 e 16S	800
16S e 12S	1300

FRANCISCO *et al.*, 2001, BRITO *et al.*, 2005), e que foram considerados característicos para a tribo.

Comparando os sítios de restrição encontrados para *M. marginata* com os verificados por WEINLICH *et al.* (2004) em sete espécies de *Melipona* entre ela *M. marginata*, vários sítios foram confirmados, enquanto alguns não foram detectados.

Verificou-se um sítio de restrição com a enzima *Hind* III no gene COIII, em todos os 54 ninhos analisados (Tabela 8). WEINLICH *et al.* (2004) detectou esse sítio em seis das sete espécies de *Melipona* analisadas, apenas não o encontrando em *M. marginata*. Alguns padrões de restrição encontrados podem ser observados nas Figuras 11 a 18 em anexo.

Tabela 5: Padrões de clivagem (identificados pelas letras maiúsculas à esquerda) para as amostras das 5 populações usando sete enzimas de restrição. Tamanhos das bandas em pares de base. Região correspondente aos genes ND2 e COI, com o tamanho de 2100pb.

Pop	<i>EcoR</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Bcl</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Bgl</i> II	<i>Pst</i> I	<i>Cla</i> I
MG	A 1400-700	A 2100	A 1550-550	A 2100	A 2100	A 1900-200	A 2100
PR	A 1400-700	A 2100	A 1550-550	B 2000-100	A 2100	A 1900-200	A 2100
SC	A 1400-700	A 2100	A 1550-550	A 2100	A 2100	A 1900-200	A 2100
SP	A 1400-700	A 2100	A 1550-550 B 1500-600	A 2100 B 2000-100	A 2100	A 1900-200	A 2100
RS	A 1400-700	A 2100	A 1550-550	A 2100	A 2100	A 1900-200	A 2100

Tabela 6: Padrões de clivagem (identificados pelas letras maiúsculas à esquerda) para as amostras das 5 populações usando dez enzimas de restrição. Tamanhos das bandas estão em pares de base. Região correspondente ao gene COI, com o tamanho de 900pb.

Pop	<i>EcoR</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Bcl</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Dra</i> I	<i>Ase</i> I	<i>Ssp</i> I	<i>Bgl</i> II	<i>Pst</i> I	<i>Cla</i> I
MG	A 900	A 650-250	A 600-300	A 900	A 780-120	A 570-330	A 435-320-145	A 900	A 900	A 900
PR	A 900	A 650-250	A 600-300	A 900	A 780-120	A 570-330	B 440-175-145-140	A 900	A 900	A 900
SC	A 900	A 650-250	A 600-300	A 900	A 780-120	A 570-330	B 440-175-145-140	A 900	A 900	A 900
SP	A 900	A 650-250	A 600-300	A 900	A 780-120	A 570-330	B 440-175-145-140 A 435-320-145	A 900	A 900	A 900
RS	A 900	A 650-250	A 600-300	A 900	A 780-120	A 570-330	B 440-175-145-140	A 900	A 900	A 900

Tabela 7: Padrões de clivagem (identificados pelas letras maiúsculas à esquerda) para as amostras das 5 populações usando dez enzimas de restrição. Tamanhos das bandas estão em pares de base. Região correspondente ao gene COI e COII, com o tamanho de 950pb.

Pop	<i>EcoR</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Bcl</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Dra</i> I	<i>Ase</i> I	<i>Ssp</i> I	<i>Bgl</i> II	<i>Pst</i> I	<i>Cla</i> I
MG	A 950	A 600-350	A 950	A 950	A 380-185-150-145-90	A 310-230-135-95-85-65	A 325-165-145-105-85-75-50	A 950	A 950	A 950
PR	A 950	B 350-300-250	A 950	A 950	A 380-185-150-145-90	A 310-230-135-95-85-65	A 325-165-145-105-85-75-50	A 950	A 950	A 950
SC	A 950	A 600-350 B 350-300-250	A 950	A 950	A 380-185-150-145-90	A 310-230-135-95-85-65	A 325-165-145-105-85-75-50	A 950	A 950	A 950
SP	A 950	A 600-350 B 350-300-250	A 950	A 950	A 380-185-150-145-90	A 310-230-135-95-85-65	A 325-165-145-105-85-75-50	A 950	A 950	A 950
RS	A 950	B 350-300-250	A 950	A 950	A 380-185-150-145-90	A 310-230-135-95-85-65	A 325-165-145-105-85-75-50	A 950	A 950	A 950

Tabela 8: Padrões de clivagem (identificados pelas letras maiúsculas à esquerda) para as amostras das 5 populações usando oito enzimas de restrição. Tamanhos das bandas estão em pares de base. Região correspondente aos genes ATPases 8, 6 e COIII, com o tamanho de 1700pb.

Pop	<i>EcoR</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Bcl</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Dra</i> I	<i>Bgl</i> II	<i>Pst</i> I	<i>Cla</i> I
MG	A 1600-100	A 900-800 B 1200-500	A 1700	A 900-800	A 800-500-400	A 1700	A 1700	A 1700
PR	A 1600-100	A 900-800	A 1700	A 900-800	B 400-340-320-150-140-125	A 1700	A 1700	A 1700
SC	A 1600-100	A 900-800	A 1700	A 900-800	B 400-340-320-150-140-125	A 1700	A 1700	A 1700
SP	A 1600-100	A 900-800 B 1200-500	A 1700	A 900-800	A 800-500-400 B 400-340-320-150-140-125	A 1700	A 1700	A 1700
RS	A 1600-100	B 1200-500	A 1700	A 900-800	B 400-340-320-150-140-125	A 1700	A 1700	A 1700

Tabela 9: Padrões de clivagem (identificados pelas letras maiúsculas à esquerda) para as amostras das 5 populações usando sete enzimas de restrição. Tamanhos das bandas estão em pares de base. Região correspondente aos genes ND4, ND6 e CytB, com o tamanho de 2400pb.

Pop	<i>EcoR</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Bcl</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Bgl</i> II	<i>Pst</i> I	<i>Cla</i> I
MG	A 2400	A 2200-200	A 2400	A 2400	A 2400	A 1900-500	A 2200-200
PR	B 1600-800	A 2200-200	A 2400	A 2400	A 2400	A 1900-500	A 2200-200
SC	B 1600-800	A 2200-200	A 2400	A 2400	A 2400	A 1900-500	A 2200-200
SP	B 1600-800	A 2200-200	A 2400	A 2400	A 2400	A 1900-500	A 2200-200
RS	B 1600-800	A 2200-200	A 2400	A 2400	A 2400	A 1900-500	A 2200-200

Tabela 10: Padrões de clivagem (identificados pelas letras maiúsculas à esquerda) para as amostras das 5 populações usando oito enzimas de restrição. Tamanhos das bandas estão em pares de base. Região correspondente aos genes CytB e ND1 com o tamanho de 1700pb.

Pop	<i>EcoR</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Bcl</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Ssp</i> I	<i>Bgl</i> II	<i>Pst</i> I	<i>Cla</i> I
MG	A 1700	A 1100-600	A 1700	A 1700	A 600-300-270-265-175-155	A 1700	A 1700	A 1700
PR	B 1000-700	A 1100-600	A 1700	A 1700	B 600-300-270-220-175-140	A 1700	A 1700	A 1700
SC	B 1000-700	A 1100-600	A 1700	A 1700	B 600-300-270-220-175-140	A 1700	A 1700	A 1700
SP	A 1700 B 1000-700	A 1100-600	A 1700	A 1700	B 600-300-270-220-175-140 A 600-300-270-265-175-155	A 1700	A 1700	A 1700
RS	B 1000-700	A 1100-600	A 1700	A 1700	B 600-300-270-220-175-140	A 1700	A 1700	A 1700

Tabela 11: Padrões de clivagem (identificados pelas letras maiúsculas à esquerda) para as amostras das 5 populações usando dez enzimas de restrição. Tamanhos das bandas estão em pares de base. Região correspondente aos genes ND1 e 16S com o tamanho de 800pb.

Pop	<i>EcoR</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Bcl</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Dra</i> I	Ase I	Ssp I	Bgl II	Pst I	Cla I
MG	A 800	A 800	A 800	A 800	A 210-190-155-105-100-95	A 600-145-55	A 350-300-150	A 450-350	A 750-50	A 800
PR	A 800	A 800	A 800	A 800	B 205-180-120-110-95	A 600-145-55	C 400-300-100	A 450-350	A 750-50	A 800
SC	A 800	A 800	A 800	A 800	B 205-180-120-110-95	A 600-145-55	C 400-300-100	A 450-350	A 750-50	A 800
SP	A 800	A 800	A 800	A 800	A 210-190-155-105-100-95 B 205-180-120-110-95 C 290-190-125-100-95	A 600-145-55 B 500-145-100-55	A 350-300-150 B 700-100 C 400-300-100	A 450-350	A 750-50	A 800
RS	A 800	A 800	A 800	A 800	B 205-180-120-110-95	A 600-145-55	C 400-300-100	A 450-350	A 750-50	A 800

Tabela 12: Padrões de clivagem (identificados pelas letras maiúsculas à esquerda) para as amostras das 5 populações usando sete enzimas de restrição. Tamanhos das bandas estão em pares de base. Região correspondente aos genes 16S e 12S com o tamanho de 1300pb.

Pop	<i>EcoR</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Bcl</i> I	<i>Hind</i> III	Bgl II	Pst I	Cla I
MG	A 1300	A 1300	A 1300	A 1300	A 1300	A 1300	A 1300
PR	A 1300	B 950-350	A 1300	B 1250-50	A 1300	A 1300	A 1300
SC	A 1300	B 950-350	A 1300	B 1250-50	A 1300	A 1300	A 1300
SP	A 1300	B 950-350 A 1300	A 1300	A 1300 B 1250-50	A 1300	A 1300	A 1300
RS	A 1300	A 1300	A 1300	B 1250-50	A 1300	A 1300	A 1300

As 7 enzimas que apresentaram polimorfismo nas oito regiões analisadas geraram 14 haplótipos distintos, com número de sítios de restrição variando de 50 (hap1 e hap2) a 59 (hap5 e hap12) (Tabela 13). Segundo DOWNLING *et al.* (1996), a probabilidade de se perder um sítio de restrição por mutação é maior do que a de se ganhar, sendo então o haplótipo com o maior número de sítios de restrição o mais primitivo. Sendo assim os haplótipos mais recentes foram os encontrados em MG, hap1 e hap2, mas dado o baixo número amostral, haplótipos mais primitivos podem não ter sido detectados, ou se extinguiram. Dentro das populações o número de sítios de restrição diferentes de cada haplótipo variou entre 1 e 5 em SP; no PR e em SC em apenas 1 sítio; e em MG os dois haplótipos apresentaram o mesmo número de sítios.

Nas amostras de SP também foi encontrado o maior número de haplótipos, 8 no total, nas demais populações, PR, MG e SC, tiveram apenas 2 e RS apenas 1 haplótipo. Apenas um haplótipo foi compartilhado entre as populações (hap12), encontrado em 14 amostras de PR e em uma amostra de SC, localizada na região do Vale do Itajaí. O haplótipo mais abundante foi hap13, encontrado em SC, mas isso pode ser devido ao número amostral desigual entre as populações amostradas.

Tabela 13: Número de sítios de restrição, gerado pelas enzimas de restrição, verificado em cada haplótipo encontrado nas amostras de *M. marginata*.

	hap1	hap2	hap3	hap4	hap5	hap6	hap7	hap8	hap9	hap10	hap11	hap12	hap13	hap14
<i>EcoR</i> I	2	2	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Hinf</i> I	5	5	5	5	7	7	5	5	5	5	7	7	6	6
<i>Bcl</i> I	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>Hind</i> III	1	1	2	1	3	2	1	1	1	1	2	2	2	2
<i>Dra</i> I	12	12	15	12	14	14	15	15	14	14	14	14	14	14
<i>Ase</i> I	8	8	9	8	8	8	9	9	9	9	8	8	8	8
<i>Ssp</i> I	15	15	15	15	16	16	15	15	15	15	16	16	16	16
<i>Bgl</i> II	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Pst</i> I	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>Cla</i> I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>EcoR</i> V	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hae</i> III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	50	50	57	51	59	58	56	56	55	55	58	59	57	57

Apenas um haplótipo foi compartilhado entre populações: hap12 foi encontrado em 14 amostras de PR e em uma amostra de SC. A população que apresentou o maior número de haplótipos foi SP, num total de 8; PR e SC apresentaram 2 haplótipos cada, e RS apresentou apenas 1. O haplótipo mais abundante foi hap13, encontrado em 15 ninhos de SC. A Tabela 14 mostra a composição dos haplótipos compostos e em quais ninhos eles foram encontrados. A Tabela 15 e a Figura 31 mostram a distribuição e a frequência dos haplótipos nas populações, respectivamente.

Esses resultados diferem em alguns pontos dos resultados obtidos por FRANCISCO (2001), que encontrou 15 haplótipos em *P. remota*, com compartilhamento de haplótipos apenas entre as populações de Cunha-SP e Curitiba-PR, tendo essa última um maior número de haplótipos. A distribuição dos haplótipos foi mais uniforme do que a verificada para *M. marginata*, pois nas amostras de SP e Prudentópolis-PR verificou-se 4 haplótipos, em Curitiba-PR 7, e em SC apenas dois. Já quando comparamos os resultados obtidos com *Partamona helleri* por BRITO (2005), que identificou 10 haplótipos, sendo 1 compartilhado entre as populações de SC e MG, e outro que foi detectado em SP, MG e ES, apenas a população da Bahia não compartilhou haplótipos. Assim como nas amostras de *M. marginata* a população de SP foi a que apresentou o maior número de haplótipos.

Tabela 14: Lista dos haplótipos compostos, determinados seguindo a ordem de enzimas: *EcoR* I, *Hinf* I, *Bcl* I, *Hind* III, *Dra* I, *Ase* I, *Ssp* I, e locais e ninhos onde foram encontrados.

	Composição dos haplótipos compostos	Locais/Ninhos
hap1	AAAAAAA	MG1, 2, 5, 7
hap2	ABAAAAA	MG3, 4, 6
hap3	BAABBBB	SP1, 3, 4, 6
hap4	CABAAAA	SP2
hap5	BCBCCAC	SP5, 6
hap6	BCBDCAC	SP7
hap7	BBAABBB	SP8
hap8	BAAABBB	SP9
hap9	BABADBB	SP10
hap10	BAAADBB	SP11, 12
hap11	BDABDAC	PR1
hap12	BDABCAC	PR2 a 15 e SC 10
hap13	BEABCAC	SC1 a 9, SC11 a SC16
hap14	BFABCAC	RS1 a 4

Tabela 15: Distribuição do número de colméias por haplótipo e localidade.

	MG	SP	PR	SC	RS
Hap01	4	-	-	-	-
Hap02	3	-	-	-	-
Hap03	-	3	-	-	-
Hap04	-	1	-	-	-
Hap05	-	2	-	-	-
Hap06	-	1	-	-	-
Hap07	-	1	-	-	-
Hap08	-	1	-	-	-
Hap09	-	1	-	-	-
Hap10	-	2	-	-	-
Hap11	-	-	1	-	-
Hap12	-	-	14	1	-
Hap13	-	-	-	15	-
Hap14	-	-	-	-	4
Total	7	12	15	16	4

Figura 4: Representação esquemática da distribuição e frequência dos haplótipos observados nas populações de *M. marginata*.

Numa comparação mais detalhada das diferenças entre os haplótipos encontrados pode-se verificar em alguns casos os pontos de alteração de sítios de restrição que geraram haplótipos diferentes, assim como casos de padrões de restrição distintos, como pode ser visto a seguir:

- Haplótipo hap1 (AAAAAAA) quando comparado com o haplótipo hap2 (ABAAAAA), ambos encontrados em MG, apresentam apenas uma diferença quanto à composição do haplótipo da enzima *Hinf* I, que na região correspondente aos genes COI e COII, apresentando 950 pares de base divergem, pois no haplótipo **A** foi verificado um sítio de restrição gerando um padrão de banda com fragmentos de 600 e 350 pares de base, enquanto o haplótipo **B** apresenta um sítio a mais, gerando um padrão de banda com fragmentos de 350, 300 e 250 pares de base.
- Haplótipo hap5 (BCBCCAC) quando comparado com o haplótipo hap6 (BCBDCAC), ambos encontrados em SP, apresentam apenas uma diferença quanto à composição do haplótipo da enzima *Hind* III, que na região correspondente aos genes 16S e 12S, apresentando 1300 pares de base, divergem, pois no haplótipo **C** foi verificado um sítio de restrição gerando um padrão de banda com fragmentos de 1250 e 50 pares de bases, enquanto no haplótipo **D** não foi encontrado nenhum sítio de restrição.
- Haplótipo hap7 (BBAABBB) quando comparado com o haplótipo hap8 (BAAABBB), ambos encontrados em SP, apresentam apenas uma diferença quanto à composição do haplótipo da enzima *Hinf* I, que na região correspondente aos genes COI e COII, apresentando 950 pares de base, divergem, pois no haplótipo **A** foi verificado um sítio de restrição gerando um padrão de banda com fragmentos de 600 e 350 pares de base, enquanto o haplótipo **B** apresenta um sítio a mais, gerando um padrão de banda com fragmentos de 350, 300 e 250 pares de base.
- Haplótipo hap8 (BAAABBB) quando comparado com haplótipo hap10 (BAAADBB), ambos encontrados em SP, apresentam apenas uma diferença quanto à composição do haplótipo da enzima *Dra* I, que na região correspondente aos genes ND1 e 16S, apresentando 800 pares de base, divergem, pois o haplótipo **B** apresenta para essa região um padrão de banda com fragmentos de 210, 190, 155, 100 e 95 pares de base, enquanto o haplótipo **D** apresenta outro padrão de banda sendo os fragmentos de 290, 190, 115, 105 e 95 pares de base.

- Haplótipo hap9 (BABADBB) quando comparado com o haplótipo hap10 (BAAADBB), ambos encontrados em SP, apresentam apenas uma diferença quanto à composição do haplótipo da enzima *Bcl* I, que na região correspondente aos genes ND2 e COI, apresentando 2100 pares de base, divergem, pois o haplótipo **B** apresenta para essa região um padrão de banda com fragmentos de 1500 e 600 pares de base, enquanto no haplótipo **A** o padrão verificado foi com fragmentos de 1550 e 550 pares de base.
- Haplótipo hap11 (BDABDAC) quando comparado com o haplótipo hap12 (BDABCAC), sendo o haplótipo hap11 encontrado apenas no PR, enquanto o haplótipo hap12 é compartilhado entre PR e SC, apresenta diferenças quanto a composição do haplótipo da enzima *Dra* I, que na região correspondente aos genes ND1 e 16S, apresentando 800 pares de base, divergem, pois o haplótipo **D** apresenta para essa região um padrão de banda com fragmentos de 290, 190, 115, 105 e 95 pares de bases, enquanto o haplótipo **C** apresentou um padrão de banda diferente com fragmentos de 205, 180, 120, 110, 105 e 90 pares de base.
- Os haplótipos hap12 (BDABCAC), compartilhado pelas populações de PR e SC, hap13 (BEABCAC) encontrado em SC e hap14 (BFABCAC) encontrado no RS, apresentaram diferenças em três regiões, quanto à composição do haplótipo da enzima *Hinf* I. Na região correspondente aos genes COI e COII, com um tamanho de 950 pares de bases, os haplótipos **D** e **F** apresentaram o mesmo padrão de banda, com fragmentos de 350, 300 e 250 pares de base, enquanto o haplótipo **E** apresentou um padrão diferente tendo um sítio de restrição a menos, com fragmentos de 600 e 350 pares de base. Na região correspondente aos genes ATPases 8, 6 e COIII, com um tamanho de 1700 pares de base, os haplótipos **D** e **E** apresentaram o mesmo padrão de banda, com fragmentos de 900 e 800 pares de base, enquanto que o haplótipo **F** apresentou um padrão diferente com fragmentos de 1200 e 500 pares de base. E na região correspondente aos genes 16S e 12S, com um tamanho de 1300 pares de base, os haplótipos **D** e **E** apresentaram um sítio de restrição, gerando fragmentos de 950 e 350 pares de base, enquanto o haplótipo **F** não apresentou sítio de restrição.

Os valores de divergência de seqüências de nucleotídeos (*d*), estimados com base na matriz intraespecífica de ausência/presença de banda, variaram de 0,000876 ($\pm$

0,001310) a 0,018940% ($\pm 0,008066$) entre os haplótipos de uma mesma população, e de 0,002020 ($\pm 0,004835$) a 0,20450 % ($\pm 0,008145$) entre haplótipos de populações diferentes (Tabela 16). Esses valores foram muito baixos, em alguns casos os valores do erro padrão sendo superiores ao valor de d , impedindo a distinção dos haplótipos mais próximos, mas auxiliando na distinção dos haplótipos mais distantes.

Tabela 16: Porcentagem de divergência de sequência de nucleotídeos entre pares de haplótipos (*d*) (abaixo da diagonal) e erro padrão (acima da diagonal). Em verde haplótipos encontrados em MG, em azul os encontrados em SP, em rosa o encontrado no PR, em vermelho o haplótipo compartilhado pelas populações de PR e SC, em cinza o encontrado em SC e em laranja o encontrado no RS.

	hap01	Hap02	hap03	hap04	hap05	hap06	hap07	hap08	hap09	hap10	hap11	hap12	hap13	hap14
hap01		0,004334	0,004375	0,002677	0,008145	0,008071	0,005976	0,004191	0,004852	0,004600	0,006684	0,006870	0,007234	0,007234
hap02	0,001425		0,006098	0,005115	0,007127	0,007036	0,004191	0,005976	0,006457	0,006269	0,007771	0,007926	0,005997	0,005997
hap03	0,010930	0,012298		0,004692	0,007193	0,007329	0,004392	0,001352	0,002781	0,002325	0,005535	0,005764	0,006172	0,006172
hap04	0,003409	0,004851	0,012733		0,008066	0,007988	0,006229	0,004521	0,004655	0,004910	0,006915	0,007097	0,007455	0,007455
hap05	0,020450	0,018646	0,011460	0,018940		0,001310	0,006218	0,007329	0,007104	0,007255	0,004869	0,004314	0,003938	0,003938
hap06	0,019252	0,017439	0,012601	0,017762	0,000876		0,006109	0,007242	0,007010	0,007166	0,005052	0,004518	0,004159	0,004159
hap07	0,011181	0,009805	0,002236	0,012951	0,010854	0,009836		0,004190	0,004859	0,004608	0,006911	0,007089	0,004919	0,004919
hap08	0,009805	0,011181	0,000912	0,011558	0,012601	0,011592	0,001332		0,002462	0,001917	0,005706	0,005926	0,006327	0,006327
hap09	0,013925	0,015301	0,004103	0,012394	0,010476	0,009505	0,004470	0,003138		0,001569	0,005605	0,006019	0,006414	0,006414
hap10	0,012230	0,013607	0,002798	0,014116	0,011881	0,010885	0,003188	0,001856	0,001228		0,005395	0,005832	0,006238	0,006238
hap11	0,013752	0,015576	0,005760	0,015604	0,006197	0,007231	0,008546	0,006781	0,006119	0,004825		0,002278	0,005607	0,005607
hap12	0,015721	0,017535	0,007370	0,017673	0,003334	0,004278	0,010189	0,008434	0,009129	0,007749	0,002718		0,005107	0,005107
hap13	0,016229	0,014663	0,007822	0,018195	0,003015	0,003961	0,007377	0,008893	0,009591	0,008205	0,005135	0,002393		0,004835
hap14	0,016229	0,014663	0,007822	0,018195	0,003015	0,003961	0,007377	0,008893	0,009591	0,008205	0,005135	0,002393	0,002020	

Na Figura 5 podemos observar um fenograma construído com os valores de d segundo o método de Evolução Mínima.

Figura 5: Fenograma obtido pelo método de Evolução Mínima a partir dos valores de d , relacionando todos os haplótipos obtidos nas cinco populações de *M. marginata*. Em verde estão representados os haplótipos encontrados em MG; os encontrados em SP em azul; no PR em rosa, em SC em cinza, os encontrados em RS em laranja e o haplótipo compartilhado por SC e PR em vermelho.

O fenograma apresenta três grupos, um deles contém os haplótipos encontrados na população de MG (hap1 e hap2), juntamente com um haplótipo de SP (hap4). Dois haplótipos de SP (hap5 e hap6) agruparam com os haplótipos encontrados no PR, SC e RS (hap11, hap12, hap13, hap14), em um segundo ramo. É interessante destacar que foram encontrados dois ninhos com haplótipo hap6, SP5 e SP6, sendo o primeiro

proveniente de Cunha-SP e o segundo de São Paulo-SP. O terceiro ramo é composto por haplótipos da população de SP (hap3, hap7, hap8, hap9 e hap10). O fenograma obtido mostra a não homogeneidade entre os haplótipos de SP, no entanto vale ressaltar que a população SP foi a que apresentou o maior número de haplótipos. Os valores de diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) estão expressos na Tabela 17.

Os valores dos índices de diversidade haplotípica (h) e π (Tabela 17) demonstram que as populações não possuem uma distribuição uniforme dos haplótipos, com a população de SP se mostrando mais distinta quanto à quantidade de haplótipos, enquanto as outras populações apresentaram baixa diversidade haplotípica, havendo pouca divergência entre os haplótipos encontrados.

Tabela 17: Número de haplótipos encontrados e valores de diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) para cada uma das populações de *M. marginata*.

População	Nº de haplótipos	H	π
MG	2	0,5275 (0,06375)	0,0000
SP	8	0,8841 (0,03430)	0,005711
PR	2	0,1287 (0,07916)	0,001528
SC	2	0,1210 (0,07507)	0,0000
RS	1	0,0000 (0,0000)	0,0000
MÉDIA	5	0,3322 (0,02695)	0,001448 (0,0000012)

Valores entre parênteses são erros padrão.

Os valores de h variaram de 0,0000 ($\pm 0,0000$) na população de RS (um único haplótipo) a 0,8841 ($\pm 0,03430$) observado em SP, com uma média de 0,3322 ($\pm 0,02695$). FRANCISCO (2002) encontrou valores que variaram de 0,1761 ($\pm 0,0881$) a 1,0000 ($\pm 0,0764$), em amostras de *Plebeia remota*, tendo uma amplitude maior de h do que observado em *M. marginata*. BRITO (2005), nas análises de *P. helleri*, também encontrou variabilidade genética intrapopulacional, pois os índices de diversidade haplotípica variaram de 0,4706 ($\pm 0,0823$) a 0,6769 ($\pm 0,0835$), com uma média de 0,5545 ($\pm 0,0012$). Já as análises de populações de *Apis dorsata* na Tailândia, INSUAN *et al.* (2007) demonstraram uma baixa diversidade haplotípica (h) variando de 0,000 ($\pm 0,000$) a 0,0153 ($\pm 0,0092$), com uma média de 0,074 ($\pm 0,043$).

Quanto ao índice de diversidade nucleotídica (π), os valores observados ficaram entre 0,0000, nas populações de MG, SC e RS e 0,005711 em SP, com uma média de 0,001448 $\pm$ 0,0000012. Equivalente ao valor de d , o maior valor de π foi observado nas

amostras de SP. Sendo assim, a população de SP possui os haplótipos mais distintos, enquanto as outras populações apresentam os haplótipos mais similares.

Os valores de π das populações de *M. marginata* ficaram, na sua maioria, abaixo dos observados por FRANCISCO (2002), sendo o maior valor observado em *M. marginata* de 0,005711 e o menor em *P. remota* de 0,002191. Em *Apis dorsata* o índice de diversidade nucleotídica (π) verificado por INSUAN *et al.* (2007) variou de 0,000 a 0,059. Em *P. helleri* os valores de π variaram de 0,0017 a 0,0018 (BRITO, 2005). A média de π em *M. marginata* foi de $0,003886 \pm 0,0000088$ enquanto em *P. remota* foi de $0,008193 \pm 0,000023$, em *Apis dorsata* foi de 0,032 e em *P. helleri* a média foi de 0,0021 (0,0000). Os valores de h e π mostraram que as populações de *M. marginata* analisadas não são uniformes. A população de SP se mostrou mais distinta quanto à quantidade de haplótipos, enquanto as outras populações apresentaram baixa diversidade haplotípica.

Segundo FRANCISCO (2002) os valores de π podem estar subestimados, pois o fato de os haplótipos diferirem por um único sítio de restrição não implica necessariamente que eles possuam apenas um nucleotídeo mutado, podendo ser mais de um, pois a maioria das enzimas utilizadas reconhecia sítios de seis pares de base.

Na Tabela 18 estão representados os cálculos das estimativas de F_{ST} e na Tabela 19 de divergência de sequência de nucleotídeos entre pares de populações (δ). Esses dados foram utilizados para gerar fenogramas de “Evolução Mínima” (Figura 6).

Tabela 18: Valores da estimativa de F_{ST} (abaixo da diagonal) e valores de P (acima da diagonal) com erro padrão entre parênteses, entre pares de populações de *M. marginata*.

	MG	SP	PR	SC	RS
MG		0,00000 (0,0000)	0,00000 (0,0000)	0,00000 (0,0000)	0,00901 (0,0091)
SP	0,23160		0,00000 (0,0000)	0,00000 (0,0000)	0,00000 (0,0000)
PR	0,71528	0,49830		0,00000 (0,0000)	0,00000 (0,0000)
SC	0,72642	0,51102	0,86297		0,00000 (0,0000)
RS	0,64103	0,38539	0,89341	0,89880	

Tabela 19: Valores de divergência de sequência de nucleotídeos (δ) entre pares de populações de *M. marginata*.

	MG	SP	PR	SC
SP	0,008969			
PR	0,015779	0,003840		
SC	0,015060	0,003925	0,002095	
RS	0,015151	0,004074	0,002394	0,001894

Figura 6: Fenogramas obtidos pelo método de Evolução Mínima, relacionando as cinco populações de *M. marginata*, MG, SP, PR, SC e RS. **A:** Fenograma feito a partir dos valores de F_{ST} . **B:** Fenograma feito a partir dos valores de δ .

Segundo a distribuição de Monte Carlo para a comparação entre pares de populações há heterogeneidade significativa das frequências de haplótipos ($P = 0,0000$), confirmando os dados obtidos por F_{ST} . Também foi feito outro cálculo de diferenciação entre pares de populações empregando o teste exato baseado nas frequências haplotípicas (Tabela 20) e novamente todas as populações se mostraram diferenciadas, com valores de $P < 0,05$.

Tabela 20: Valores de P de acordo com o teste exato de diferenciação entre os pares de populações de *M. marginata*. (Entre parênteses: erro padrão).

	MG	SP	PR	SC
SP	0,00157 (0,0004)			
PR	0,00002 (0,0000)	0,0000 (0,0000)		
SC	0,00000 (0,0000)	0,0000 (0,0000)	0,00000 (0,0000)	
RS	0,00518 (0,0007)	0,01612 (0,0010)	0,00025 (0,0001)	0,00015 (0,0001)

Também foram realizadas análises de estrutura genética de populações, empregando-se variância molecular (AMOVA) (Tabela 21), onde se verificou que 79,11% da variação foi encontrada entre as populações e que segundo o valor de Φ_{ST} (0,79107), assim como verificado no valor de P , podemos concluir que a probabilidade de que dois haplótipos tirados ao acaso de uma população, sejam relacionados, não é maior que 0,79107.

Tabela 21: Resultados da análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) em *M. marginata*. P : probabilidade de se obter um valor de Φ maior que o observado.

Componente da Variância	Variância	% do total	P	Φ
Interpopulacional	9,31377	79,11		
Intrapopulacional	2,45985	20,89	0,0000	0,79107

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

Os valores calculados para inferir a divergência haplotípica intrapopulacional foram diferentes: 33,22% (valor médio, Tabela 17) e 20,89% (Tabela 21). Essa diferença se explica pelo fato de o valor de h ser calculado como uma média aritmética simples da distribuição dos haplótipos, e como a população de SP apresentou o maior

número de haplótipos esse valor foi puxado para cima, enquanto o AMOVA, leva em consideração o número amostral das populações.

Tendo apenas 1 haplótipo compartilhado e com os valores obtidos nas análises pode-se afirmar que as 5 populações de *M. marginata* estão diferenciadas umas das outras, em se tratando do DNAm.

O compartilhamento desse haplótipo dificilmente pode ter ocorrido por dispersão natural via fêmea, pois a amostra de SC que compartilhou o haplótipo hap12, é da região do Vale do Itajaí, distante de Prudentópolis, e ainda foram amostrados ninhos mais próximos de Prudentópolis, que apresentaram outro haplótipo (hap13).

Uma explicação para o compartilhamento desse haplótipo pode ser a ação direta do homem, com o transporte indiscriminado de colônias, como relatado por muitos meliponicultores, fato até incentivado pelos mesmos no caso de *M. marginata*, dada a dificuldade de encontrá-la atualmente no ambiente natural, levando a introdução de haplótipos diferentes dos presentes naquela população.

Outra possibilidade seriam eventos de redução de florestas, como ocorrido na Glaciação do Pleistoceno, que podem ter reduzido drasticamente as populações de *M. marginata*, levando ao isolamento dos haplótipos verificados. As alterações climáticas ocorridas na região sul-sudeste do Brasil, restringiu as áreas de mata a refúgios, como locais próximos a rios, dada as características secas dos períodos glaciais (BEHLING, 1997; BEHLING *et al.*, 2007 e BEHLING, 2007).

A redução das florestas, e a conseqüente diminuição da disponibilidade de recursos polínicos e néctar, teriam favorecido uma redução do fluxo gênico, ainda mais se levarmos em conta as observações de SILVEIRA *et al.* (2002) de que *M. marginata* possui ninhos pouco populosos, e é uma espécie extremamente exigente quanto ao tamanho da área florestal em que se encontra.

O isolamento geográfico deve ter levado a uma queda no fluxo gênico, e o isolamento prolongado, possibilitou o surgimento de mutações isoladas e levando a formação de novos haplótipos, sendo esses exclusivos.

O caso de compartilhamento de haplótipo entre as populações de PR e SC pode ser evidência de fluxo gênico entre essas populações no passado, anterior a glaciação do Pleistoceno, é interessante destacar que em *P. remota* FRANCISCO (2002) não verificou compartilhamento dos haplótipos de Prudentópolis-PR, apenas de haplótipos entre Curitiba-PR e SP.

4.2 Microssatélites

Foram testados 8 pares de *primers*, todos derivados de *Melipona bicolor*, destes que 4 apresentaram resultados satisfatórios (Figuras 7, 8, 9 e 10), sendo então utilizados nas análises populacionais.

Os locos Mbi201 e Mbi278 apresentaram um grande número de alelos, 15 e 11, respectivamente. O loco Mbi32 apresentou 4 alelos, contudo o loco Mbi215 apresentou apenas dois alelos, sendo um extremamente raro. BRITO (2005) encontrou números bem diferentes para esses locos, tanto para *P. mulata* quanto para *P. helleri*, para os locos Mbi32, Mbi215 ela encontrou apenas um alelo, e para os locos Mbi201 e Mbi278 ela encontrou dois alelos. Uma explicação para essa diferença é o fato de esses *primers* terem sido desenhados para *M. bicolor*, e o genoma de *M. marginata* ser mais similar ao de *M. bicolor* do que *P. helleri* e *P. mulata*.

Originalmente PETERS *et al.* 1998 identificaram para *M. bicolor* 4 alelos para o loco Mbi32, 5 alelos para o loco Mbi201, 3 alelos para o loco Mbi215 e 5 alelos para o loco Mbi278, esses números comparados ao observado em *M. marginata* demonstram a viabilidade de se utilizar *primers* heteroespecíficos, já que apenas o loco Mbi215 apresentou menos alelos do que os observados em *M. bicolor*.

Figura 7: Gel de poliacrilamida 5,6% com 5 dos 11 alelos encontrados para o loco Mbi278. **M:** Marcador de peso molecular Ultra Low Range, a seta indica a banda de 100pb.

Figura 8: Gel de poliacrilamida 5,6% com 3 dos alelos encontrados para o loco Mbi32. **M:** Marcador de peso molecular Ultra Low Range, a seta indica a banda de 100pb.

Figura 9: Gel de poliacrilamida 5,6% com 9 dos 15 alelos encontrados para o loco Mbi201. **M:** Marcador de peso molecular 10pb, a seta indica a banda de 100pb.

Figura 10: Gel de poliacrilamida 5,6% com 2 genótipos identificados para o loco Mbi215, contendo 2 alelos, sendo o alelo B encontrado em apenas 1 indivíduo, da população do Paraná. **M:** marcador de peso molecular ultra low range. Seta indica banda de 150pb.

Dos quatro locos utilizados, o loco Mbi215 apresentou 2 genótipos, AA e AB, sendo esse último encontrado em apenas um ninho de PR. Para o loco Mbi 201 foram encontrados 26 genótipos, sendo esse o loco com o maior número de genótipos detectado. O loco Mbi278 apresentou 17 genótipos e o loco Mbi32 8 genótipos (Tabela 22). O genótipo mais abundante no loco Mbi201 foi EE e no loco Mbi278 foi BC, já no loco Mbi32 foi o genótipo BB.

A população de SC apresentou o maior número de genótipos diferentes entre os quatro locos utilizados, totalizando 24, destes, 15 são heterozigotos, depois SP apresentou 19 genótipos, 13 destes heterozigotos, PR apresentou 17 genótipos, sendo 9 heterozigotos. Na população de MG foram encontrados 17 genótipos, 12 deles heterozigotos e por último a população de RS teve 8 genótipos, sendo 4 heterozigotos.

As populações de MG e SP apresentaram o maior número de alelos, com 19 alelos cada, seguidas pelas populações de SC, PR e RS com 18, 14 e 9 alelos cada uma respectivamente (Tabela 23). O alelo mais freqüente para o loco Mbi201 foi o alelo E, no loco Mbi278 foi o alelo B, e no loco Mbi32 foi o alelo B. Foram encontrados 3 alelos exclusivos no loco Mbi201, sendo o alelo O encontrado apenas na população de SC e os alelos C e H encontrados apenas em MG, no loco Mbi215 o alelo B foi encontrado apenas em um ninho de PR, no loco Mbi278 foram encontrados 3 alelos exclusivos, E em MG e H e F em SP, no loco Mbi32 não foram encontrados alelos exclusivos. Essa observação já demonstra um baixo fluxo gênico entre as populações, devido à existência de alelos exclusivos, indicando estruturação populacional entre as populações.

Comparando o número de alelos encontrados para *M. marginata* com os de outras espécies como *P. remota*, *P. helleri* e *P. mulata*, temos uma diferença muito grande, com *M. marginata* apresentando um número bem maior de alelos, isso podendo se dever a proximidade evolutiva de *M. marginata* com *M. bicolor*, espécie da qual derivaram os *primers* utilizados.

Tabela 22: Descrição dos genótipos encontrados por loco analisado e respectivo número de indivíduos a eles relacionados, distribuído por população. N: número de ninhos analisados.

Loco	Genótipo	MG (N=7)	SP (N=12)	PR (N=15)	SC (N=16)	RS (N=4)
Mbi 278	AA		3		3	
	AB	2				
	AD		3		3	
	AF		2			
	AH		1			
	AJ				1	1
	AK				3	3
	BB	2		1	2	
	BC	1		9		
	BI			1		
	CC			4		
	DD	1	2		1	
	DE	1				
	DJ				1	
	GG		1			
	KK				2	
Mbi 215	AA	7	12	14	16	4
	AB			1		
Mbi 201	AA				1	
	AB	1				
	AF		1			
	AJ				2	
	CD	1				
	DE	1				
	DI				1	
	EE		2	3	3	3
	EG	1				
	EI	1				
	EJ				1	
	EK		1	6		
	EL			1		
	EM		1		3	
	EN					1
	FF		3	2		
	FG	1				
	FJ		1			
	FM		1			
	FN			1		
	GH	1				
	GM				1	
	IL		2		2	
	JM				1	
	KK			2		
	LO				1	
Mbi 32	AA	1	3	3		1
	AB	2	3	3	1	
	AD				1	
	BB	3	2	6	11	1
	BC		4	2		
	BD			1	1	2
	CD	1				
	DD				2	

Tabela 23: Número de alelos por loco em cada uma das 5 populações estudadas de *M. marginata*.

	MG	SP	PR	SC	RS
Mbi 278	5	6	6	8	2
Mbi215	1	1	2	1	1
Mbi201	7	8	6	10	2
Mbi32	4	4	5	5	3
Total	17	19	19	24	8

Ao analisar todas as populações como única, o χ^2 (67,6417), com 28 graus de liberdade, forneceu um $P = 0,0000$, podemos concluir que as 5 populações analisadas não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, pois não se comportam como uma população panmítica, fato também verificado para as populações de *P. helleri* e *P. mulata* (BRITO, 2005).

Analisando todos os ninhos em conjunto (Tabela 24), todos os locos, com exceção do loco Mbi278 (0,2781), apresentaram $P < 0,05$, mostrando que os locos não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Já quando analisamos as populações individualmente, podemos verificar que as populações de MG e RS apresentaram valor de $P > 0,05$, sendo respectivamente 0,2612 e 0,3274, estando então ambas em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Dado o baixo número amostral dessas duas populações, sendo 7 ninhos de MG e 4 de RS, não podemos concluir que esta seja a realidade da população da região, necessitando uma maior amostragem para se verificar esse resultado. O fato de a maioria das populações não se encontrar em equilíbrio de Hardy-Weinberg pode se dever a fatores antrópicos, como desmatamento, fatores biológicos inerentes à espécie como baixa dispersão dos indivíduos reprodutivos ou ainda a um isolamento antigo entre elas.

Tabela 24: Teste probabilístico para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg nos locos e populações. **N:** número de indivíduos amostrados por população. **g.l.:** graus de liberdade.

	MG (N=7)	SP (N=12)	PR(N= 15)	SC (N=16)	RS (N=4)	χ^2	g.l.	P
Mbi201	1,000 (0,0000)	0,0079* (0,0025)	0,0011* (0,0011)	0,0041* (0,0028)	-	A	8	0,0000*
Mbi215	-	-	-	-	-	-	-	-
Mbi278	0,2033 (0,0104)	0,1642 (0,0069)	0,2889 (0,0000)	0,8090 (0,0000)	0,3143 (0,0000)	12,1	10	0,2781
Mbi32	0,1049 (0,0000)	0,1556 (0,0000)	0,2813 (0,0000)	0,0168* (0,0000)	0,3143 (0,0000)	21,25	10	0,0194*
χ^2	7,6960	17,0276	18,6815	19,6068	4,6298	67,6417		
g.l.	6	6	6	6	4		28	
P	0,2612	0,0092*	0,0047*	0,0033*	0,3274			0,0000*

*: $P < 0,05$

Para verificar se o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg das populações de *M. marginata* está relacionado com excesso ou ausência de heterozigotos, foi realizado o teste “U” (ROUSSET E RAYMOND, 1995), em que a hipótese alternativa (H1) é: déficit

de heterozigotos para $P < 0,05$. Observamos deficiência de heterozigotos na população de SP para o loco Mbi278, na população de PR para o loco Mbi201 e na população de SC para o loco Mbi32 (Tabela 25). O fato de as populações de MG e RS não apresentarem deficiência de heterozigotos pode se dever mais uma vez ao baixo número amostral das duas populações.

Tabela 25: Teste para verificação de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg por deficiência de heterozigotos.

Deficiência	MG	SP	PR	SC	RS
Mbi201	1,000 (0,0000)	0,1349 (0,0180)	0,0482* (0,0063)	0,2143 (0,0188)	-
Mbi215	-	-	-	-	-
Mbi278	0,2230 (0,0079)	0,0251* (0,0031)	0,8994 (0,0000)	0,2577 (0,0000)	1,0000 (0,0000)
Mbi32	0,2168 (0,0000)	0,3372 (0,0000)	0,0923 (0,0000)	0,0401* (0,0000)	0,2571 (0,0000)

* $P < 0,05$ Valores entre parênteses – erro padrão

Também foi feito o teste de diferenciação genotípica para cada par de populações envolvendo todos os locos (Tabela 26), e observou-se que as populações de SC e RS, não se apresentaram diferenciadas, podendo esse resultado se dever ao transporte de ninhos entre os estados, como relatado pelos próprios meliponicultores, sendo difícil ocorrer um fluxo gênico natural, devido ao crescente desmatamento causado pelo homem.

Tabela 26: Teste de diferenciação genotípica para cada par de populações envolvendo todos os locos.
g.l.: graus de liberdade.

Pares de populações	X^2	g.l.	P
MG + SP	20,54665	6	0,002212
MG + PR	25,688479	8	0,001187
SP + PR	A	8	0,00000
MG + SC	28,452274	6	0,000077
SP + SC	28,220302	6	0,000085
PR + SC	A	8	0,00000
MG + RS	17,134163	6	0,008803
SP + RS	18,378656	6	0,005352
PR + RS	25,315310	8	0,001374
SC + RS	8,242807	6	0,220849*

*: $P > 0,05$

Foram realizados testes exatos de desequilíbrio de ligação para os pares de locos de todas as populações (Tabela 27), e verificou-se que os pares de locos nas populações apresentaram $P > 0,05$, exceto os pares Mbi278/Mbi32 na população MG.

Tabela 27: Valores de P para verificação de desequilíbrio de ligação entre pares de locos em cada população.

Pares de locos	MG	SP	PR	SC	RS
Mbi201/Mbi215	-	-	0,19898 (0,003793)	-	-
Mbi201/Mbi278	-	0,09655 (0,01064)	0,853360 (0,007774)	1,0000 (0,0000)	1,0000 (0,0000)
Mbi215/Mbi278	-	-	1,0000 (0,0000)	-	-
Mbi201/Mbi32	-	0,69494 (0,10756)	0,36268 (0,012811)	0,27951 (0,019784)	1,0000 (0,0000)
Mbi215/Mbi32	-	-	0,60204 (0,005933)	-	-
Mbi278/Mbi32	0,03061* (0,003337)	0,845970 (0,006612)	0,9867 (0,001516)	0,82269 (0,013418)	0,49622 (0,00464)

*: $P < 0,05$

O teste exato (Método de Fisher) foi realizado para os pares de locos para todas as populações como se fossem uma única (Tabela 28). Verificamos que esses são herdados de modo independente visto que os valores de P foram maiores que 0,05 para todos os pares de locos.

Tabela 28: Valores de P para cada par de locos para todas as populações para teste de verificação de desequilíbrio de ligação (Método de Fisher). (g.l.): graus de liberdade.

Pares de locos	X^2	g.l.	P
Mbi201/Mbi215	3,229102	2	0,198980
Mbi201/Mbi278	4,992536	8	0,758374
Mbi215/Mbi278	0,0000	2	1,0000
Mbi201/Mbi32	5,305763	8	0,724452
Mbi215/Mbi32	1,014863	2	0,60204
Mbi278/Mbi32	9,126002	10	0,520189

Na Tabela 29 foram calculados os valores de diferenciação populacional F_{ST} entre pares de populações, e todos os valores foram diferentes de zero, indicando que há estruturação populacional, concordando com os resultados do DNAm.

Tabela 29: Estimativa de F_{ST} entre pares de populações estudadas de *M. marginata*.

	MG	SP	PR	SC
SP	0,0718			
PR	0,0688	0,1644		
SC	0,0844	0,0709	0,1945	
RS	0,1524	0,1166	0,2275	0,0573

Também foi feito o teste de diferenciação genotípica por loco para cada par de populações (Tabela 30), e no loco Mbi 201, os pares de populações SP+PR, SP+SC, MG+RS e SC+RS não diferiram quanto à distribuição genotípica, para o loco Mbi278 apenas o par SC+RS não apresentou diferenciação e, para o loco Mbi32, apenas os pares SP+SC e PR+SC se apresentaram diferenciadas.

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

Locos	MG+SP	MG+PR	SP+PR	MG+SC	SP+SC	PR+SC	MG+RS	SP+RS	PR+RS	SC+RS
Mbi201	0,01780* (0,00083)	0,00073* (0,00013)	0,3843 (0,00149)	0,04334* (0,00148)	0,03793 (0,00125)	0,0000* (0,0000)	0,06217 (0,00178)	0,02107* (0,00096)	0,02817* (0,00099)	0,05700 (0,00155)
Mbi215	-	1,0000 (0,0000)	1,0000 (0,0000)	-	-	0,48369 (0,00075)	-	-	1,0000 (0,0000)	-
Mbi278	0,00023* (0,00006)	0,00017* (0,00005)	0,0000* (0,0000)	0,0000* (0,0000)	0,00264* (0,00020)	0,0000* (0,0000)	0,00098* (0,00013)	0,00468* (0,00035)	0,0000* (0,0000)	0,31752 (0,00176)
Mbi32	0,49180 (0,00187)	1,0000 (0,0000)	0,48285 (0,00232)	0,10353 (0,00137)	0,00008* (0,00002)	0,00992* (0,00036)	0,79673 (0,00128)	0,06827 (0,00108)	0,27596 (0,00199)	0,32030 (0,00154)

Valores entre parênteses são erros padrão

(-): loco com apenas um alelo

*: $P < 0,05$

Na tabela 31 podemos ver que através do teste de diferenciação genotípica para cada loco estudado que os locos Mbi215 e Mbi32 se distribuem de forma uniforme entre as populações, pois apresentam valor de $P > 0,05$. Isso já era esperado dada a distribuição dos genótipos.

Tabela 31: Teste de diferenciação genotípica para cada loco estudado de *M. marginata*.

Locos	P
Mbi201	0,028299* (0,028299)
Mbi215	0,706366 (0,0022)
Mbi278	0,0000* (0,0000)
Mbi32	0,054068 (0,0023)

* $P < 0,05$

Os locos analisados apresentaram um número maior de alelos do que os encontrados para *M. bicolor*, menos o locus Mbi215, que apresentou apenas 2 alelos. De todos os alelos exclusivos 3 estão na população de MG, 2 na população de SP, e as populações de PR e SC apresentaram um alelo exclusivo cada uma.

As análises de microssatélites demonstraram que as populações não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, tendo um baixo fluxo gênico e apresentando estruturação populacional. As populações de RS e SC se mostraram mais próximas do que as outras, pelo compartilhamento de alelos, mas essa proximidade pode se dever a uma subestimação da população de RS, que teve apenas 4 ninhos amostrados, ou então ao transporte de colônias, que segundo os criadores é freqüente.

A proximidade das populações de SC e RS verificada com os microssatélites difere dos resultados observados no DNAm, que apresentou uma maior proximidade entre as populações de PR e SC.

Os resultados dos microssatélites mostraram que as populações estão isoladas, apresentando inclusive alelos exclusivos, levando a crer que a separação é antiga, devido a eventos como Glaciações do Pleistoceno, e o fato dessas populações não terem contato natural atualmente pode se dever à redução da Mata Atlântica, bioma que vem tendo seu tamanho reduzido devido à ação antrópica. Dados mostram que, na época do descobrimento do Brasil, a Mata Atlântica representava aproximadamente 15% do território nacional, hoje não passa de 7,26% de sua área original, ainda, sabe-se que 67% da população brasileira ocupam esse bioma atualmente (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA/INPE, 2008).

A ação antrópica se reflete nas populações de *M. marginata*, que como citada anteriormente é ameaçada de extinção em alguns estados do Brasil, tendo redução e queda do fluxo gênico entre as populações, fato observado com pelos nossos resultados moleculares.

Estudos populacionais com Meliponíneos são importantes para se entender a dinâmica das populações, como se comportam, fornecendo informações para a obtenção de um panorama real desses insetos, para possíveis projetos e políticas de conservação.

Estudos do impacto antrópico (BROWN E ALBRECHT, 2001) mostram que o desflorestamento na Amazônia afeta principalmente espécies de *Melipona* que são historicamente mais raras, propondo o uso dessas espécies como indicadores das alterações ambientais.

O transporte de colônias é uma alternativa para a manutenção de muitas espécies, mas ao mesmo tempo acaba por descaracterizar geneticamente as populações, podendo levar a inferências equivocadas quando analisadas essas populações.

É característico de *M. marginata* uma dependência de áreas grandes e conservadas, tendo ninhos pouco populosos, colocando essa espécie em alto grau de vulnerabilidade, sendo então as informações obtidas nas populações amostradas de vital importância, tanto para trabalhos futuros com *M. marginata*, como para outras espécies de abelhas, que possivelmente estão sofrendo os mesmos efeitos causados pela degradação ambiental.

5. Conclusões

Em consideração aos resultados obtidos nas análises do DNAm^t e dos microssatélites, podemos concluir que:

- A técnica de PCR-RFLP foi eficiente na detecção de sítios de restrição da espécie *M. marginata*, sendo importante na identificação dos haplótipos e na comparação com outras espécies do gênero *Melipona* e da tribo Meliponini.
- Dos 14 haplótipos identificados apenas 1 foi compartilhado pelas populações, mais precisamente entre as populações de PR e SC, podendo ser devido ao transporte de colônias, ou a um fluxo gênico antigo, restringido por eventos de glaciação, que isolaram essas populações.
- Os *primers* para locos de microssatélites derivados de *M. bicolor* foram altamente polimórficos para *M. marginata*, se mostrando muito eficientes, sendo que na maioria deles o número de alelos descritos foi bem maior dos que os encontrados para *M. bicolor*.
- Os resultados obtidos pelas análises de polimorfismo do DNAm^t e de locos de microssatélites foram similares quanto à estruturação das populações, mas diferiram quanto à proximidade das mesmas, sendo que com o DNAm^t, as populações de PR e SC se mostraram mais próximas, e com os microssatélites, as populações de SC e RS é que se aproximaram mais.
- Os dados moleculares nos fazem concluir que as populações de *M. marginata* se encontram isoladas. Nossa hipótese para explicar esse cenário atual é que o isolamento pode ser decorrente, principalmente, pela redução da área florestal. Entretanto, esse isolamento pode também ser decorrente de eventos antigos em consequência de mudanças climáticas ocorridas durante as últimas glaciações.

6. Resumo

As abelhas da tribo Meliponini (abelhas sem ferrão) estão amplamente distribuídas pelas regiões tropicais do planeta, tendo um importante papel na polinização, sendo o gênero *Melipona* o que contém o maior número de espécies. A espécie *Melipona marginata* é uma das menores e mais ancestrais do grupo, e a exemplo de outras espécies nidifica em ocos de árvore. *M. marginata*, assim como outras espécies do gênero *Melipona*, vêm sofrendo com a destruição do seu ambiente natural, pelo desmatamento, sendo, aparentemente mais exigente que outras espécies quanto ao tamanho do fragmento florestal para se manter, devido a isso é encontrada apenas em fragmentos maiores, mais antigos e menos perturbados. Tendo em vista a perda de hábitat e o pouco conhecimento da biologia dessa espécie, este trabalho pretende analisar populações de *M. marginata*, através da técnica PCR+RFLP do DNA mitocondrial e marcadores microssatélites, visando contribuir para entendimento da estrutura populacional de *M. marginata*. Foram analisados 54 ninhos, provenientes dos estados de MG, SP, PR, SC e RS. Oito regiões do DNA mitocondrial foram amplificadas, e posteriormente digeridas com 12 enzimas de restrição. Foram detectados 14 haplótipos, sendo apenas um compartilhado. A população de SP apresentou o maior número de haplótipos. Os testes estatísticos demonstraram que as populações estão estruturadas e isoladas, não havendo fluxo gênico entre as populações. Já nas análises dos microssatélites foram analisados 4 locos, apresentando alta variabilidade genética, onde também foi verificado que as populações se encontram estruturadas. Os resultados obtidos podem ser explicados principalmente pela redução da área de floresta, mas, podem se dever a eventos antigos em consequência de mudanças climáticas ocorridas durante as últimas glaciações.

7. Abstract

The tribe Meliponini (stingless bees) is present in all tropical regions of the world and has an important role in pollination. The genus *Melipona* has the highest number of species in the tribe. The specie *Melipona marginata* is considered the most ancestral within the genus, and like other species builds the nests in hollow of trees. Unfortunately several bee species have suffered with the devastation of their natural environment. *M. marginata* seems to be very dependent on the size of the forest fragment, being found only in the biggest, oldest and consequently more preserved ones. In view of the habitat loss and few biological knowledge about this specie, this research intended to analyse *M. marginata* populations molecularly, through mitochondrial DNA PCR-RFLP and microsatellite data., Fifty four colonies were analyzed, from MG, SP, PR, SC and RS states. Eight mitochondrial DNA regions were amplified and screened with 12 restriction enzymes. Fourteen haplotypes were verified and among them just one was shared. SP population showed the highest number of haplotypes. Statistic tests showed that the 5 populations were genetic structured and isolated, therefore not presenting gene flow. The 4 microsatellites loci analyzed showed high genetic variability. The statistics analysis indicated that the 5 populations are structure and isolated. These results can be explained mainly because the decrease of forest leading to population isolation, however we can not discard the hypothesis that this current scenario is a consequence of climatic changes occurred during the last glaciations.

8. Referências bibliográficas

ARIAS M. C.; BRITO, R. M.; FRANCISCO F. O.; MORETTO G.; OLIVEIRA F. F.; SILVESTRE D. E SHEPPARD W. S. (2006) Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. **Apidologie** 37:259-274.

AVISE J. C. (2000) **Phylogeography: The history and formation of species**. Harvard University Press, Boston.

AVISE J. C.; ARNOLD J.; BALL R. M.; BERMINGHAM E.; LAMB T.; NEIGEL J. E.; REEB C. A. E SAUNDERS N. C. (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics** 18: 489-522.

BALLARD J. W. O. E WHITLOCK M. C. (2004) The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology** 13: 729-744.

BALLOUX F. E LUGON-MOULIN N. (2002) The estimation of population with microsatellite markers. **Molecular Ecology** 11:155-165.

BEHLING H. (1997) Late Quaternary vegetation, climate and fire history of the *Araucaria* forest and campos region from Serra Campos Gerais, Paraná State (South Brazil). **Review of Palaeobotany and Palynology** 97:109-121.

BEHLING H. (2007) Late Quaternary vegetation, fire and climate dynamics of Serra do Araçatuba in the Atlantic coastal mountains of Paraná State, southern Brazil. **Vegetal History and Archaeobotany** 16: 77-85.

BEHLING H.; DUPONT L.; SAFFORD H. D. E WEFER G. (2007) Late Quaternary vegetation and climate dynamics in the Serra da Bocaina, southeastern Brazil. **Quaternary International** 161, 1: 22-31.

BORGES F. VON B. E BLOCHTEIN B. (2005) Atividades externas de *Melipona marginata obscurior* Moure (Hymenoptera, Apidae), em distintas épocas do ano, em São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** 22:680-686.

BORGES F. VON B. E BLOCHTEIN B. (2006) Variação sazonal das condições internas de colônias de *Melipona marginata obscurior* Moure, no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** 23:711-715.

BRITO R. M. (2005) **Análise molecular e populacional de *Partamona mulata* (Moure in Camargo, 1980) e *Partamona helleri* (Fries, 1900) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. São Paulo, USP: 202p. Tese de Doutorado (Biologia/Genética).

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

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

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

COLLET T.; ARIAS M. C.; DEL LAMA M. A. (2007) 16S mtDNA variation in *Apis mellifera* detected by PCR-RFLP. **Apidologie** 38: 47-54.

COSTA R. G.; TAVARES M. G.; DIAS L. A. e CAMPOS L. A. (2005) Isoenzyme variation in *Melipona rufiventris* (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) in Minas Gerais State, Brazil. **Biochemistry and Genetics** 43: 49-58.

CROZIER R. H. E CROZIER Y. C. (1993). The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and the genome organization. **Genetics** 133:97-117.

DEL LAMA M. A., LOBO J. A., SOARES A. E. E., DEL LAMA S. N. (1990) Genetic differentiation estimated by isosymic analyses of Africanized honeybee population from Brazil and from Central America. **Apidologie** 21:271-280.

DOWNLING T. E.; MORITZ C.; PALMER J. D. E RIESEBERG L. H. (1996) Nucleic acids III: analysis of fragmens and restriction sites. "In" **Molecular Systematics. 2nd edition** (eds. D. M. Hillis; C. Moritz e B. K. Mable), pp. 249-320, Sinauer Associates, Massachusetts.

EISEN J. A. (1999) Mechanistic basis for microsatellite instability. "In" **Microsatellites: Evolution and Applications** (eds. D. B. Goldstein e C. Schlötterer), pp34-48, Oxford University Press, New York.

ESTOUP A. E CORNUET J. M. (1999) Microsatellite evolution: inferences from population data. "In" **Microsatellites: Evolution and Applications** (eds. D. B. Goldstein e C. Schlötterer), pp 49-65, Oxford University Press, New York.

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

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

FRANCISCO F. O. (2002) **Diversidade Genética de Populações de Abelha sem Ferrão *Plebeia remota*: Análise do DNA Mitocondrial e Microssatélites**. São Paulo, USP: 140p. Dissertação de Mestrado (Biologia/Genética).

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

FRANCISCO F. O.; NUNES-SILVA P.; FRANCOY T. M.; WITTMANN D.; IMPERATRIZ-FONSECA V. L.; ARIAS M. C. E MORGAN E. D. (2008) Morphometrical, biochemical and molecular tools for assessing biodiversity. An example in *Plebeia remota* (Holmberg, 1903) (Apidae, Meliponini). **Insectes Sociaux** 55: 231-237.

FRANCK P.; GARNERY L.; SOLIGNAC M. E CORNUET J. M. (1998) The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. **Evolution** 52: 1119-1134.

FRANCK P.; GARNERY L.; SOLIGNAC M. E CORNUET J. M. (2000) Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. **Apidologie** 31: 167-180.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA/INPE (2008) **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período de 2000-2005**. São Paulo SP.

FUNK C. R.; SCHMID-HEMPEL R. E CHMID-HEMPEL P. (2006) Microsatellite loci for *Bombus* spp. **Molecular Ecology** 6, 1: 83-86.

HALL H. G. E SMITH D. R. (1991) Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 88:4248-4552.

HANCOCK J. M. (1999) Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms., "In" **Microsatellites: Evolution and Applications** (eds. Goldstein D. B. e Schlötterer C.). 1-9. Oxford University Press, New York.

HARRIS H. (1966) Enzyme polymorphisms in man. **Proceedings of the Royal Society of London: Biology** 164: 298-310.

HILLIS D. M.; MORITZ C. E MAPLE B. K. (1996) **Molecular systematics**. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

HUBBY J. L. E LEWONTIN R. C. (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics** 54: 577-594.

INSUAN S.; DEOWANISH S.; KLINBUNGA S.; SITTIPRANEED S.; SYLVESTER H. A. E WONGSIRI S. (2007) Genetic Differentiation of the Giant Honey Bee (*Apis dorsata*) in Thailand analyzed by Mitochondrial Genes and Microsatellites. **Biochemical genetics** 45 3-4.

KERR W. E.; NASCIMENTO A. N. E CARVALHO A. G. (1994) Há salvação para os meliponíneos? **Anais do I Encontro sobre abelhas**. Ribeirão Preto, SP. 61-65.

KLEINERT-GIOVANNINI A. E IMPERATRIZ-FONSECAV. L. (1986) Flight activity and responses to climatic conditions of two subspecies of *Melipona marginata* Lepeletier (Apidae, Meliponinae). **Journal of Apicultural Research** 25 1: 3-8.

KLEINERT-GIOVANNINI A. E IMPERATRIZ-FONSECAV. L. (1987) Aspects of the trophic niche of *Melipona marginata marginata* Lepeletier (Apidae, Meliponinae). **Apidologie** 18 1: 69-100.

KRAUS F. B.; WEINHOLD D. E MORITZ R. F. A. (2008) Genetic structure of drone congregations of the stingless bee *Scaptotrigona Mexicana*. **Insectes Sociaux** 55 1: 22-27.

KUMAR S.; TAMURA K.; JAKOBSEN I. B. E NEI M. (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. **Bioinformatics** 17: 1244-1245.

LINN S. E ARBER W. (1968) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. In vitro restriction of phage for replicative form. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 59:1300-1306.

MARQUES A. A. B.; FONTANA C. S.; VÉLEZ E.; BENCKE G. A.; SCHNEIDER M. E REIS R. E. (2004) **Livro Vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, FZB/MCT-PUCRS/PANGAEA, 632p.

MCDONALD D. B.; WAYNE K. P. (1997) **DNA Microsatellites as Genetic Markers in Several Scales in Avian Molecular Evolution an Systematics**.(ed. D.P. Mindell) pp 31, Academic Press.

McELROY D.; MORAN P.; BIRMINGHAM E. E KORNFIELD I. (1992). REAP: an integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data. **The Journal of Heredity** 83: 157-158.

MESELSON M. E YUAN R. (1968) DNA restriction enzyme from *E. coli*. **Nature** 217: 1110-1114.

MESTRINER M. A. (1969) Biochemical Polymorphisms In Bees *Apis Mellifera* Lingustica. **Nature** 223:188-189.

MICHENER C.D. (2000) What was the protobee? **Anais do IV Encontro sobre Abelhas**, Ribeirão Preto, SP. 2-7.

MORITZ J. F. A.; CORNUET J. M.; KRYGER P.; GARNEY L. E HEPBUN H. R. (1994) Mitochondrial DNA variability in África honeybees (*Apis mellifera* L.) **Apidologie** 25: 169–178.

MORITZ C.; DOWLING T. E. E BROWN W. M. (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 18: 269-292.

MOURE J. S.; URBAN D.; MELO G. A. R. (2007) **Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**. 1ª ed. Curitiba: Revista Brasileira de Entomologia V 1. XIV+1058 p.

NEI M. (1987) **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press, New York.

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

NEI M. E TAJIMA F. (1981) DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. **Genetics** 97: 145-163.

NEI M. E TAJIMA F. (1983) Maximum likelihood estimation of the number of nucleotide substitutions from sites data. **Genetics** 105: 207-217.

NOGUEIRA-NETO P. (1963) **Arquitetura das células de cria dos melliponinae (Apoidia, Hymenoptera)**. São Paulo, USP: 127p. Tese Doutorado (Zoologia).

NOGUEIRA-NETO P. (1966) Fritz Müller e as abelhas brasileiras. **Ciência e Cultura** 18:379-381.

NOGUEIRA-NETO P. 1997. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**. Nogueirapis, São Paulo, SP.

PAMILO P. E CROZIER R. H. (1981) Genic variation in male haploids under deterministic selection. **Genetics** 98:199-214.

PAXTON R. J.; WEIBSCHUH N. E QUEZADA-EUÁN J. J. G. (1999) Characterization of dinucleotide microsatellite loci for stingless bees. **Molecular Ecology** 8: 690-692.

PETERS J. M.; QUELLER D. C.; IMPERATRIZ-FONSECA V. L. E STRASSMANN J. E. (1998) Microsatellite loci for stingless bees. **Molecular Ecology** 7: 784-787.

PRONI E. A. E MACIEIRA O. J. D. (2000) Biodiversidade de abelhas sem ferrão na bacia do rio Tibagi-Paraná (Hymenoptera, Meliponinae), **Anais do IV Encontro sobre abelhas**. Ribeirão Preto, SP: 297.

QUELLER D. C.; STRASSMANN J. E. E HUGHE C. R. (1993). Microsatellites and kinship. **Trends in Ecology and Evolution** 8: 285-289.

QUEZADA-EUÁN J. J. G.; PAXTON R. J.; PALMER L. A.; ITZÁ W. J. M.; TAY W. T.; OLDROYD B. P. (2007) Morphological and molecular characters reveal differentiation in a Neotropical social bee, *Melipona beecheii* (Apidae: Meliponini). **Apidologie**, 38: 247-258.

RADLOFF S. R. E HEPBURN H. R. 1998. The matter of sampling distance and confidence levels in the subspecific classification of honeybees, *Apis mellifera* L. **Apidologie** 29: 491-501.

ROUBIK D. W. (1989) **Ecology and natural history of tropical bees**. Cambridge: Cambridge University Press. 514p.

ROUSSET F. E RAYMOND M. L. (1995) Testing heterozygote excess and deficiency. **Genetics** 140: 1413-1419.

ROUSSET F. (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementaion of the GENEPOP software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources** 8: 103-106

RUTTNER F. (1986) Geographical Variability and Classification. In: **Bee Genetics and Breeding**. (Ed. Thomas E. Rinderer). Academic Press, London 424p.

RUTTNER F. (1988) **Biogeography and Taxonomy of Honeybees**. Springer-Verlag, Berlin.

SCHNEIDER S; KUEFFER J; ROESSLI D E EXCOFFIER L (2000) **Arlequin Ver. 1.1: A Software For Population Genetic Data Analysis**. Genetics and Biometry Laboratory, University Of Geneva, Switzerland.

SILVEIRA F. A.; MELO G. A. R. E ALMEIDA E. A. B. (2002) **Abelhas brasileiras. Sistemática e Identificação**. Fernando Silveira, Belo Horizonte, MG. 253p.

SIMON C.; FRATI F.; BECHENBACH A.; CRESPI B.; LIU H. E FLOOK P. (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and compilation of conserved polimerase chain reaction primers. **Annual of Entomological Society of America** 87: 651-701.

SHEPPARD W. S.; MCPHERON B. A. (1991) Ribosomal RNA diversity in Apidae. "In": **Diversity in the genus *Apis*** (ed. Smith D. R.). West Press, Oxford.

SHEPPARD W. S.; RINDERED T. E.; MEIXNER M. D.; YOO H. R.; STEIZER J. A.; SCHIFF N. M.; KAMEL S. M. E KRELL R. (1996). *Hinf* I variation in mitochondrial DNA of old world honey bee subspecies. **The Journal of Heredity** 87: 35-40.

SOUZA R. O.; MORETTO G.; ARIAS M. C.; DEL LAMA M. A. (2008) Differentiation of *Melipona quadrifasciata* L. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) subspecies using cytochrome b PCR-RFLP patterns. **Genetics and Molecular Biology** 30, 2: 445-450.

STRASSMANN J. E.; SOLIS C. R.; PETERS J. M. E QUELLER D. C. (1996) Strategies for finding and using highly polymorphic DNA microsatellite loci for studies of genetic relatedness and pedigrees. "In" **Molecular Methods in Zoology and Evolution** (eds. J. D. Ferraris e S. R. Palumbi), pp. 163-178, 528-549, Wiley-Liss, New York.

TAVARES M. G.; DIAS L. A. S.; BORGES A. A.; LOPES D. M.; BUSSE A. H. P.; COSTA R. G.; SALOMÃO T. M. F. E CAMPOS L. A. O. (2008) Genetic divergence between populations of the stingless bee uruçú amarela (*Melipona rufiventris* group, Hymenoptera, Meliponini): Is there a new *Melipona* species in the Brazilian state of Minas Gerais? **Genetics and Molecular Biology** 30, 3: 667-675.

THE HONEY BEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (2006) Insights into social insects from the genome of the honey bee *Apis mellifera*. **Nature** 443:931-949.

VON IHERING H. (1930) **Biologia das abelhas mellíferas do Brasil**. São Paulo: Secret. de Agric. Ind. E Com. Do Estado de São Paulo. 140p.

WALSH P. S.; METZGER D. A.; HIGUCHI R. (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques** 10: 506-513.

WEBER J. L. E WONG C. (1993) Mutation of human short tandem repeats. **Human Molecular Genetics** 2: 1123-1128.

WEINLICH R.; FRANCISCO F. O. E ARIAS M. C. (2004) Mitochondrial DNA restriction and genomic maps of seven species of *Melipona* (Apidae: Meliponini). **Apidologie** 5, 4: 365-370.

WIDMER A.; SCHMID-HEMPEL P.; ESTOUP A. E SCHOLL A. (1998) Population genetic structure and colonization history of *Bombus terrestris* s.l. (Hymenoptera: Apidae) from Canary Islands and Madeira. **Heredity** 81: 563-572.

ANEXO

Figura 11: Padrões de restrição da região ND2, COI, de *M. marginata*, digerido pela enzima *Bcl*II. **M:** marcadores de peso molecular λ /Hind III e Φ x/Hae III. **Ctrl:** fragmento de PCR não digerido, 2100 pb. **A** – padrão A: 1550-550 pb. **B** – padrão B: 1600-500.

Figura 12: Padrões de restrição da região ND2, COI, de *M. marginata*, digerido pela enzima *Hind*III. **M:** marcadores de peso molecular λ /Hind III e Φ x/Hae III. **Ctrl:** fragmento de PCR não digerido, 2100 pb. **a** – padrão A: 2100pb. **B** – padrão B: 2000 e 100. Seta indica digestão parcial.

Figura 13: Padrões de restrição da região COI, da espécie *M. marginata*, digerido com a enzima *SspI*. **M:** marcador de peso molecular 10pb “ladder”. **A** – padrão A: 435-320-145pb. **B** – padrão B: 440-175-145-140pb.

Figura 14: Padrões de restrição da região CytB, ND1, da espécie *M. marginata*, digerido com a enzima *EcoR I*. **M:** marcadores Φ x/Hae III. **Ctrl:** fragmento de PCR não digerido, 1700 pb. **A** – padrão A: 1700pb. **B** – padrão B: 1000-700pb. A seta indica digestão parcial.

Figura 15: Padrões de restrição da região ND1 e 16S, da espécie *M. marginata*, digerido com a enzima *Ase I*. **M:** marcador de peso molecular 100pb. **Ctrl:** fragmento de PCR não digerido, 800 pb. **A** - 600-145-55 pb. **B** – padrão B: 500-145-100-55pb.

Figura 16: Padrões de restrição da região ND1 e 16S da espécie *M. marginata*, digerido com a enzima *Ssp I*. **M:** marcador de peso molecular 100pb. **Ctrl** – Fragmento não digerido, 800pb. padrão A: 700-100pb. **B** – padrão B: 400-300-100pb. **C** – padrão C: 350-300-150pb.

Figura 17: Padrões de restrição da região 16S e 12S da espécie *M. marginata*, digerido com a enzima *Hind* III. **M:** marcadores de peso molecular λ /Hind III e Φ x/Hae III. **Ctrl:** fragmento não digerido, 1300pb. **A** – padrão A: 1300pb. **B** – padrão B: 1250-50pb.

Figura 18: Padrões de restrição da região 16S e 12S da espécie *M. marginata*, digerido com a enzima *Hind* III. **M:** marcadores de peso molecular Φ x/Hae III. **C:** fragmento não digerido, 1300pb. **A** – padrão A: 950-350pb. **B** – padrão B: 1300pb.

Tabela 32: Construção dos haplótipos compostos da enzima *EcoR* I, em 8 regiões do DNAm de *M. marginata*

	ND2 e COI	COI	COI e COII	ATPases 8 e 6 e COIII	ND4, ND6 e CytB	CytB e ND1	ND1 e 16S	16S e 12S	<i>EcoR</i> I
MG1	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MG2	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MG3	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MG4	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MG5	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MG6	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MG7	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP1	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SP2	A	A	A	A	B	A	A	A	C
SP3	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SP4	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SP5	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SP6	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SP7	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SP8	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SP9	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SP10	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SP11	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SP12	A	A	A	A	B	B	A	A	B
PR1	A	A	A	A	B	B	A	A	B
PR2	A	A	A	A	B	B	A	A	B
PR3	A	A	A	A	B	B	A	A	B
PR4	A	A	A	A	B	B	A	A	B
PR5	A	A	A	A	B	B	A	A	B
PR6	A	A	A	A	B	B	A	A	B
PR7	A	A	A	A	B	B	A	A	B
PR8	A	A	A	A	B	B	A	A	B
PR9	A	A	A	A	B	B	A	A	B
PR10	A	A	A	A	B	B	A	A	B
PR11	A	A	A	A	B	B	A	A	B
PR12	A	A	A	A	B	B	A	A	B
PR13	A	A	A	A	B	B	A	A	B
PR14	A	A	A	A	B	B	A	A	B
PR15	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SC1	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SC2	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SC3	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SC4	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SC5	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SC6	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SC7	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SC8	A	A	A	A	B	B	A	A	B

SC9	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SC10	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SC11	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SC12	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SC13	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SC14	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SC15	A	A	A	A	B	B	A	A	B
SC16	A	A	A	A	B	B	A	A	B
RS1	A	A	A	A	B	B	A	A	B
RS2	A	A	A	A	B	B	A	A	B
RS3	A	A	A	A	B	B	A	A	B
RS4	A	A	A	A	B	B	A	A	B

Tabela 33: Construção dos haplótipos compostos da enzima *Hinf* I, em 8 regiões do DNAm de *M. marginata*.

	ND2 e COI	COI	COI e COII	ATPases 8 e 6 e COIII	ND4, ND6 e CytB	CytB e ND1	ND1 e 16S	16S e 12S	<i>Hinf</i> I
MG1	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MG2	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MG3	A	A	A	B	A	A	A	A	B
MG4	A	A	A	B	A	A	A	A	B
MG5	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MG6	A	A	A	B	A	A	A	A	B
MG7	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP1	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP2	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP3	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP4	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP5	A	A	B	B	A	A	A	B	C
SP6	A	A	B	B	A	A	A	B	C
SP7	A	A	B	B	A	A	A	B	C
SP8	A	A	A	B	A	A	A	A	B
SP9	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP10	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP11	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP12	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PR1	A	A	B	A	A	A	A	B	D
PR2	A	A	B	A	A	A	A	B	D
PR3	A	A	B	A	A	A	A	B	D
PR4	A	A	B	A	A	A	A	B	D
PR5	A	A	B	A	A	A	A	B	D
PR6	A	A	B	A	A	A	A	B	D
PR7	A	A	B	A	A	A	A	B	D
PR8	A	A	B	A	A	A	A	B	D
PR9	A	A	B	A	A	A	A	B	D
PR10	A	A	B	A	A	A	A	B	D
PR11	A	A	B	A	A	A	A	B	D
PR12	A	A	B	A	A	A	A	B	D
PR13	A	A	B	A	A	A	A	B	D
PR14	A	A	B	A	A	A	A	B	D

PR15	A	A	B	A	A	A	A	B	D
SC1	A	A	A	A	A	A	A	B	E
SC2	A	A	A	A	A	A	A	B	E
SC3	A	A	A	A	A	A	A	B	E
SC4	A	A	A	A	A	A	A	B	E
SC5	A	A	A	A	A	A	A	B	E
SC6	A	A	A	A	A	A	A	B	E
SC7	A	A	A	A	A	A	A	B	E
SC8	A	A	A	A	A	A	A	B	E
SC9	A	A	A	A	A	A	A	B	E
SC10	A	A	B	A	A	A	A	B	D
SC11	A	A	A	A	A	A	A	B	E
SC12	A	A	A	A	A	A	A	B	E
SC13	A	A	A	A	A	A	A	B	E
SC14	A	A	A	A	A	A	A	B	E
SC15	A	A	A	A	A	A	A	B	E
SC16	A	A	A	A	A	A	A	B	E
RS1	A	A	B	B	A	A	A	A	F
RS2	A	A	B	B	A	A	A	A	F
RS3	A	A	B	B	A	A	A	A	F
RS4	A	A	B	B	A	A	A	A	F

Tabela 34: Construção dos haplótipos compostos da enzima *Bcl* I, em 8 regiões do DNAm_t de *M. marginata*.

	ND2 e COI	COI	COI e COII	ATPases 8 e 6 e COIII	ND4, ND6 e CytB	CytB e ND1	ND1 e 16S	16S e 12S	<i>Bcl</i> I
MG1	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MG2	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MG3	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MG4	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MG5	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MG6	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MG7	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP1	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP2	B	A	A	A	A	A	A	A	B
SP3	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP4	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP5	B	A	A	A	A	A	A	A	B
SP6	B	A	A	A	A	A	A	A	B
SP7	B	A	A	A	A	A	A	A	B
SP8	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP9	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP10	B	A	A	A	A	A	A	A	B
SP11	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP12	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PR1	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PR2	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PR3	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PR4	A	A	A	A	A	A	A	A	A

PR5	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PR6	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PR7	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PR8	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PR9	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PR10	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PR11	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PR12	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PR13	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PR14	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PR15	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SC1	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SC2	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SC3	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SC4	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SC5	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SC6	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SC7	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SC8	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SC9	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SC10	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SC11	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SC12	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SC13	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SC14	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SC15	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SC16	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS1	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS2	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS3	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS4	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Tabela 35: Haplótipo Construção dos haplótipos compostos da enzima *Hind* III, em 8 regiões do DNAm de *M. marginata*.

	ND2 e COI	COI	COI e COII	ATPases 8 e 6 e COIII	ND4, ND6 e CytB	CytB e ND1	ND1 e 16S	16S e 12S	<i>Hind</i> III
MG1	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MG2	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MG3	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MG4	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MG5	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MG6	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MG7	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP1	A	A	A	A	A	A	A	B	B

SP2	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP3	A	A	A	A	A	A	A	B	B
SP4	A	A	A	A	A	A	A	B	B
SP5	B	A	A	A	A	A	A	B	C
SP6	B	A	A	A	A	A	A	B	C
SP7	B	A	A	A	A	A	A	A	D
SP8	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP9	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP10	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP11	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SP12	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PR1	A	A	A	A	A	A	A	B	B
PR2	A	A	A	A	A	A	A	B	B
PR3	A	A	A	A	A	A	A	B	B
PR4	A	A	A	A	A	A	A	B	B
PR5	A	A	A	A	A	A	A	B	B
PR6	A	A	A	A	A	A	A	B	B
PR7	A	A	A	A	A	A	A	B	B
PR8	A	A	A	A	A	A	A	B	B
PR9	A	A	A	A	A	A	A	B	B
PR10	A	A	A	A	A	A	A	B	B
PR11	A	A	A	A	A	A	A	B	B
PR12	A	A	A	A	A	A	A	B	B
PR13	A	A	A	A	A	A	A	B	B
PR14	A	A	A	A	A	A	A	B	B
PR15	A	A	A	A	A	A	A	B	B
SC1	A	A	A	A	A	A	A	B	B
SC2	A	A	A	A	A	A	A	B	B
SC3	A	A	A	A	A	A	A	B	B
SC4	A	A	A	A	A	A	A	B	B
SC5	A	A	A	A	A	A	A	B	B
SC6	A	A	A	A	A	A	A	B	B
SC7	A	A	A	A	A	A	A	B	B
SC8	A	A	A	A	A	A	A	B	B
SC9	A	A	A	A	A	A	A	B	B
SC10	A	A	A	A	A	A	A	B	B
SC11	A	A	A	A	A	A	A	B	B
SC12	A	A	A	A	A	A	A	B	B
SC13	A	A	A	A	A	A	A	B	B
SC14	A	A	A	A	A	A	A	B	B
SC15	A	A	A	A	A	A	A	B	B
SC16	A	A	A	A	A	A	A	B	B
RS1	A	A	A	A	A	A	A	B	B
RS2	A	A	A	A	A	A	A	B	B
RS3	A	A	A	A	A	A	A	B	B
RS4	A	A	A	A	A	A	A	B	B

Tabela 36: Construção dos haplótipos compostos da enzima *Dra* I, em 4 regiões do DNAm de *M. marginata*.

	COI	COI e COII	ATPases 8 e 6 e COIII	ND1 e 16S	DraI
MG1	A	A	A	A	A
MG2	A	A	A	A	A
MG3	A	A	A	A	A
MG4	A	A	A	A	A
MG5	A	A	A	A	A
MG6	A	A	A	A	A
MG7	A	A	A	A	A
SP1	A	A	B	A	B
SP2	A	A	A	A	A
SP3	A	A	B	A	B
SP4	A	A	B	A	B
SP5	A	A	B	B	C
SP6	A	A	B	B	C
SP7	A	A	B	B	C
SP8	A	A	B	A	B
SP9	A	A	B	A	B
SP10	A	A	B	C	D
SP11	A	A	B	C	D
SP12	A	A	B	C	D
PR1	A	A	B	C	D
PR2	A	A	B	B	C
PR3	A	A	B	B	C
PR4	A	A	B	B	C
PR5	A	A	B	B	C
PR6	A	A	B	B	C
PR7	A	A	B	B	C
PR8	A	A	B	B	C
PR9	A	A	B	B	C
PR10	A	A	B	B	C
PR11	A	A	B	B	C
PR12	A	A	B	B	C
PR13	A	A	B	B	C
PR14	A	A	B	B	C
PR15	A	A	B	B	C
SC1	A	A	B	B	C
SC2	A	A	B	B	C
SC3	A	A	B	B	C
SC4	A	A	B	B	C
SC5	A	A	B	B	C
SC6	A	A	B	B	C

SC7	A	A	B	B	C
SC8	A	A	B	B	C
SC9	A	A	B	B	C
SC10	A	A	B	B	C
SC11	A	A	B	B	C
SC12	A	A	B	B	C
SC13	A	A	B	B	C
SC14	A	A	B	B	C
SC15	A	A	B	B	C
SC16	A	A	B	B	C
RS1	A	A	B	B	C
RS2	A	A	B	B	C
RS3	A	A	B	B	C
RS4	A	A	B	B	C

Tabela 37: Construção dos haplótipos compostos da enzima *Ase I*, em 3 regiões do DNAmT de *M. marginata*.

	COI	COI e COII	ND1 e 16S	Asel
MG1	A	A	A	A
MG2	A	A	A	A
MG3	A	A	A	A
MG4	A	A	A	A
MG5	A	A	A	A
MG6	A	A	A	A
MG7	A	A	A	A
SP1	A	A	B	B
SP2	A	A	A	A
SP3	A	A	B	B
SP4	A	A	B	B
SP5	A	A	A	A
SP6	A	A	A	A
SP7	A	A	A	A
SP8	A	A	B	B
SP9	A	A	B	B
SP10	A	A	B	B
SP11	A	A	B	B
SP12	A	A	B	B
PR1	A	A	A	A
PR2	A	A	A	A
PR3	A	A	A	A
PR4	A	A	A	A
PR5	A	A	A	A
PR6	A	A	A	A

PR7	A	A	A	A
PR8	A	A	A	A
PR9	A	A	A	A
PR10	A	A	A	A
PR11	A	A	A	A
PR12	A	A	A	A
PR13	A	A	A	A
PR14	A	A	A	A
PR15	A	A	A	A
SC1	A	A	A	A
SC2	A	A	A	A
SC3	A	A	A	A
SC4	A	A	A	A
SC5	A	A	A	A
SC6	A	A	A	A
SC7	A	A	A	A
SC8	A	A	A	A
SC9	A	A	A	A
SC10	A	A	A	A
SC11	A	A	A	A
SC12	A	A	A	A
SC13	A	A	A	A
SC14	A	A	A	A
SC15	A	A	A	A
SC16	A	A	A	A
RS1	A	A	A	A
RS2	A	A	A	A
RS3	A	A	A	A
RS4	A	A	A	A

Tabela 38: Construção dos haplótipos compostos da enzima *Ssp* I, em 4 regiões do DNAm de *M. marginata*.

	COI	COI e COII	CytB e ND1	ND1 e 16S	Sspl
MG1	A	A	A	A	A
MG2	A	A	A	A	A
MG3	A	A	A	A	A
MG4	A	A	A	A	A
MG5	A	A	A	A	A
MG6	A	A	A	A	A
MG7	A	A	A	A	A
SP1	B	A	B	B	B
SP2	A	A	A	A	A
SP3	B	A	B	B	B
SP4	B	A	B	B	B
SP5	B	A	B	C	C

SP6	B	A	B	C	C
SP7	B	A	B	C	C
SP8	B	A	B	B	B
SP9	B	A	B	B	B
SP10	B	A	B	B	B
SP11	B	A	B	B	B
SP12	B	A	B	B	B
PR1	B	A	B	C	C
PR2	B	A	B	C	C
PR3	B	A	B	C	C
PR4	B	A	B	C	C
PR5	B	A	B	C	C
PR6	B	A	B	C	C
PR7	B	A	B	C	C
PR8	B	A	B	C	C
PR9	B	A	B	C	C
PR10	B	A	B	C	C
PR11	B	A	B	C	C
PR12	B	A	B	C	C
PR13	B	A	B	C	C
PR14	B	A	B	C	C
PR15	B	A	B	C	C
SC1	B	A	B	C	C
SC2	B	A	B	C	C
SC3	B	A	B	C	C
SC4	B	A	B	C	C
SC5	B	A	B	C	C
SC6	B	A	B	C	C
SC7	B	A	B	C	C
SC8	B	A	B	C	C
SC9	B	A	B	C	C
SC10	B	A	B	C	C
SC11	B	A	B	C	C
SC12	B	A	B	C	C
SC13	B	A	B	C	C
SC14	B	A	B	C	C
SC15	B	A	B	C	C
SC16	B	A	B	C	C
RS1	B	A	B	C	C
RS2	B	A	B	C	C
RS3	B	A	B	C	C
RS4	B	A	B	C	C