**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Tetragonisca*
angustula (HYMENOPTERA, APIDAE,
MELIPONINI) DE DUAS ÁREAS URBANIZADAS**

GUSTAVO VALADARES BARROSO
ORIENTADORA: Dra. MARIA CRISTINA ARIAS

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva - Instituto de Biociências - USP
Caixa Postal 11461 CEP 05422-970
São Paulo – SP
Telefone: (011) 3091-7587

RESUMO

As abelhas da tribo Meliponini apresentam ampla distribuição, ocupando principalmente as regiões neotropicais do planeta. São encontradas mais de 400 espécies pertencentes a 50 gêneros. *Tetragonisca angustula* é uma espécie que se distribui por praticamente toda a América Latina, sendo em geral bastante abundante. No presente projeto foram empregadas técnicas moleculares (sequenciamento de DNA mitocondrial e análise de *loci* de microssatélites) no intuito de se verificar a variabilidade em duas pequenas populações de *Tetragonisca angustula* distribuídas nos *campi* da USP de Ribeirão Preto e São Paulo. Para a obtenção de um panorama da variabilidade da espécie, foram coletados e analisados indivíduos de áreas externas aos *campi*. Os resultados de sequenciamento mostraram que a variabilidade do genoma mitocondrial das amostras externas é muito maior que a variabilidade nas amostras dos *campi*. Além disso, ficou claro que os *campi* contêm populações monofiléticas bastante isoladas entre si, e que cada uma possui maior similaridade com as amostras externas do que com as amostras do outro *campus*. Em contrapartida, os resultados de microssatélites mostraram que a variabilidade dessas populações para os *loci* estudados é extremamente similar. Isso sugere que a filopatria da espécie é muito grande, e que o vôo dos machos é responsável por, de certa forma, homogeneizar a variabilidade genética das populações, impedindo que haja muita estruturação. Dessa maneira, em uma população de *T. angustula*, existem dois números efetivos populacionais: um para as fêmeas (estimado pela variabilidade do DNA mitocondrial) e outro maior para machos (estimado pela variabilidade dos microssatélites). Os resultados indicam que a colonização dos *campi* se deu por um número pequeno de rainhas que posteriormente aumentaram a população por conta da grande quantidade de recursos que os *campi* possuem.

ABSTRACT

The bees of the Meliponini tribe have a broad distribution, mainly throughout the neotropical regions of the planet. There are over 400 species distributed among 50 genera. *Tetragonisca angustula* is a species which occupies almost all Latin America, generally in large individual numbers. In this study we used molecular techniques (mitochondrial DNA sequencing and analysis of microsatellite *loci*) to obtain measures of the genetic variability in two small populations of *T. angustula* located in both the *campi* of USP, Ribeirão Preto and São Paulo. In order to get a better idea of the variability of the species as a whole, we also analyzed individuals from populations from outside the *campi*. The results of the DNA sequencing showed that the variability of these external samples is far bigger than the variability of the other two populations. Also, it became clear that both *campi* have monophyletic populations that are very isolated from each other, and that each one of these *campus* populations is phylogenetically closer to the external samples than they are to each other. On the other hand, the results obtained with microsatellites showed that the variability of the populations from both *campi* are very similar to the variability of the external samples. This suggests that there is a high degree of filopatry in the species, and that the male flight is responsible, in a way, for mixing the genetic variability of the populations, this way keeping them from getting structured. Thus, in a given population of *T. angustula*, there are two different effective population sizes: of for the females (measured by the variability in the mitochondrial DNA) and another for the males (measured by the variability in the microsatellites). Our results indicate that the process of colonization in both *campi* was carried out by a few queens, which lately were responsible for increasing the population sizes due to the big amount of resources found in the *campi*.

After sleeping through a hundred million centuries we have finally opened our eyes on a sumptuous planet, sparkling with color, bountiful with life. Within decades we must close our eyes again. Isn't it a noble, an enlightened way of spending our brief time in the sun, to work at understanding the universe and how we have come to wake up in it? This is how I answer when I am asked—as I am surprisingly often—why I bother to get up in the mornings.”

- Richard Dawkins

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido professor Geraldo Moretto, pelos anos de ensinamento em todos os assuntos da vida, e pela inspiração que sempre me dá.

A minha mãe, que sempre lutou muito para me ajudar a crescer, sempre confiou em mim e me ajudou sempre que eu precisei.

A minha família, em especial minha irmã, meu opa e minha oma, por sempre muito presentes desde o dia em que nasci.

Aos meus amigos de república, em especial ao He-man e a Elaine, por me ensinarem muito sobre culinária e vida social nesses 2 anos.

Ao Flávio, que além de me ceder os dados das amostras “naturais” me ajudou imensamente na análise de dados. Sempre que precisava era só virar pra ele e perguntar alguma coisa, ele sempre parava o que estava fazendo pra responder.

Ao Jusé (Paulo) e ao Jusé (Leandro), pela grande amizade construída. Esses dois tem um carisma impressionante. Ao Jusé Leandro também agradeço pela coleta das amostras no *campus*.

Ao sensei Takano, pela sabedoria.

A todos os amigos que fiz na USP, seja cursando disciplinas ou em festas.

A minha orientadora, pela enorme paciência, pelos ensinamentos e por estar sempre disponível quando eu precisei de ajuda.

Ao professor Ademílso Espencer Soares, pelas amostras concedidas do *campus* de Ribeirão Preto.

Ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao Projeto BIOTA-FAPESP pelo financiamento do projeto.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 As abelhas sem ferrão

A tribo Meliponini (*sensu* Michener 2007) compreende o grupo das chamadas abelhas sem ferrão, que vivem amplamente distribuídas nas regiões subtropicais e tropicais do planeta. Ao sul, sua distribuição alcança a latitude 35°S na Austrália e América do Sul, e 28°S na África. Segundo Velthuis (1997), foram descritas aproximadamente 400 espécies de abelhas sem ferrão em todo o mundo, abrigadas em 50 gêneros. Entretanto, de acordo com Michener (2007), esta pode ser uma subestimativa devido ao grande número de espécies crípticas. De acordo com Camargo & Pedro (1992), a maior abundância e diversidade dessas abelhas estão localizadas no neotrópico. Estima-se que no Brasil existam aproximadamente 300 espécies de meliponínios, distribuídas em vários biomas (Moure 2007).

Os meliponínios são caracterizados por possuírem o ferrão extremamente reduzido, e por isso, são também referidos como “abelhas sem ferrão” (Michener, 2007). Outra característica que marca a tribo é o comportamento altamente eussocial presente em todas as espécies, inclusive nas representantes cleptoparasitas (Silveira *et al.*, 2002). Essas abelhas são importantes nas comunidades naturais por serem agentes polinizadores de diferentes espécies, contribuindo para a manutenção das populações de plantas e, por consequência, de animais (Janzen, 1980). A Floresta Atlântica é um exemplo de bioma onde a maior parte da polinização é realizada por essas abelhas: calcula-se que de acordo com o local, cerca de 40 a 90% das plantas com flores da região necessitam dos meliponínios para a reprodução (Kerr *et al.*, 1996).

Por se tratarem de abelhas geralmente diminutas, elas muitas vezes são responsáveis únicas pela polinização de plantas que desenvolvem flores pequenas, onde

muitas outras abelhas não forrageiam ou, quando as visitam, o trabalho de polinização é ineficiente. Dessa forma, os meliponínios e as plantas angiospermas mantêm uma estreita relação co-evolutiva, muitas vezes de extrema especificidade (Morgado *et al.* 2002).

Algumas dessas espécies tornaram-se importantes sob o ponto de vista econômico devido a sua utilidade no serviço de polinização e também pela produção de mel (Nogueira-Neto, 1997). Devido ao fato da maioria dessas abelhas não serem agressivas, elas são muito utilizadas na polinização em casas de vegetação, sendo algumas espécies polinizadoras específicas para determinadas plantações (Roubik, 1989).

A tribo Meliponini é dividida em diversos gêneros. A quantidade exata, contudo, é motivo de controvérsia, uma vez que diferentes autores atribuem diferentes status taxonômicos aos nomes existentes na literatura. Por exemplo, tanto Silveira *et al.* (2002) quanto Moure (2007) consideram *Tetragonisca* Moure como um gênero válido entre os Meliponini. Entretanto, Michener (2007) transferiu o táxon para dentro do gênero *Trigona* Jurine, apontando-o como subgênero do último. Aqui, consideramos *Tetragonisca* como um gênero, já que esse é o tratamento dado pela maioria dos autores, e aceito por grande parte dos pesquisadores.

Como um gênero, *Tetragonisca* tampouco é bem resolvido. Historicamente são atribuídas a ele somente algumas espécies, mas segundo Camargo (comunicação pessoal) essa classificação se deve a pouca atenção dedicada ao grupo; é provável que existam até dezenas de espécies válidas dentro do clado. Essa hipótese é corroborada principalmente pela sua ampla distribuição, que se estende desde o México até a Argentina (Michener, 2007) e por caracteres morfológicos sutis que aguardam por uma revisão detalhada. Na ausência desse estudo aprofundado, consideramos aqui a

taxonomia vigente de *Tetragonisca*, a qual considera a existência de quatro espécies (Michener 2007).

1.2 A espécie *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811)

Tetragonisca angustula (Latreille, 1811), vulgarmente denominada jataí, é uma das abelhas sem ferrão que mais tem potencial para despertar o interesse humano, tanto por questões econômicas como científicas. Segundo Nogueira-Neto (1997), além de ser uma abelha rústica, ela é de ampla distribuição geográfica, espalhando-se praticamente por toda a América Latina. A jataí possui um nicho ecológico muito peculiar e tem bastante sucesso co-habitando as Américas com muitos outros meliponínios e com abelhas de diferentes grupos. Ela tem se destacado na meliponicultura graças à qualidade do mel que produz, pois produzem um mel livre de impurezas, característica que não ocorre com alguns outros meliponínios (Kerr, 1996).

O ninho da *T. angustula* é constituído por uma rainha, responsável pelo desenvolvimento da colônia, que realiza uma postura de até 50 ovos por dia na época de boa florada. Os zangões têm a função de fecundar rainhas virgens na época de procriação e as operárias realizam todo o trabalho da colônia, como nas outras abelhas eussociais (Paty, 2003). Em um ninho forte, as operárias de *T. angustula* chegam ao número de cinco mil (Nogueira-Neto, 1951).

A entrada do ninho da maioria das espécies dos meliponínios é, geralmente, guardada por abelhas que atacam os invasores, especialmente abelhas de outras colônias e formigas (Kerr *et al.*, 1996). Estudos relativos ao seu comportamento de defesa demonstram que são capazes de defender suas colônias fechando a entrada do ninho

quando são atacadas por outros insetos e, mesmo possuindo ferrão atrofiado, podem atacar os invasores com as mandíbulas, enrolando-se nos pêlos, envolvendo-os com geoprópolis ou penetrando em orifícios dos inimigos de maior porte (Nogueira-Neto, 1997).

A arquitetura e organização do ninho da *T. angustula* são marcados por características peculiares. A entrada do ninho é caracterizada por um tubo de cerume marrom-amarelado com bordas mais estreitas de cera mais clara (Freitas & Soares, 2004). No interior, os favos são horizontais e apresentam um invólucro de cerúmen formado por várias lamelas, que tem função termorreguladora (Campos, 1980). Nestas abelhas, é comum encontrar depósitos de própolis dentro da colônia, que são utilizados, juntamente com a cera, para fechar buracos e para construir as paredes das células do ninho onde ficam os ovos e os potes de alimento (Kerr *et al.*, 1996).

Uma característica curiosa dessa espécie é que ela tem se mostrado extremamente bem adaptada à vida no ambiente urbano (Moreno Eleure & Cardozo, 1996). É muito comum encontrar ninhos de *T. angustula* alojados em pequenas fendas de muros, postes e praticamente qualquer outro tipo de construção (Michener, 2007). Aparentemente, esse potencial nicho ecológico criado pelos humanos é ideal para o tamanho e rusticidade dessa abelha e pela ampla variedade de flores que oferece. Esse cenário é de grande valia para a pesquisa científica, particularmente no ramo da genética. *Tetragonisca angustula* pode ser usada como um organismo modelo para entender a colonização de novas áreas sob a perspectiva dos genes.

Existem duas subespécies de *T. angustula*, embora essa classificação não seja unanimidade entre os taxonomistas, e que podem ser distinguidas morfologicamente. *T. angustula angustula* Latreille se caracteriza por apresentar coloração escura do corpo em geral, especialmente no mesepisterno, enquanto *T. angustula fiebrigi* Schwarz

apresenta essas áreas com coloração amarela (**Figura 1**) (Castanheira, 1995). De acordo com Nogueira-Neto (1970), *T. angustula angustula* ocupa uma região geográfica que se estende desde a Argentina até o México, não sendo observada na Cordilheira dos Andes, nas regiões da caatinga do nordeste brasileiro e algumas regiões da Amazônia, enquanto *T. a. fiebrigi* é restrita a regiões do sul e sudeste brasileiro (Vale do Rio Paraná no estado de São Paulo, parte do estado do Paraná e Santa Catarina), e também à Argentina e ao Paraguai. Outros pesquisadores defendem a ideia de que existam diversas espécies biológicas válidas ao longo da ampla distribuição de *T. angustula*, mas dados concretos que confirmem essas hipóteses ainda não foram publicados.

Trabalhos que visam diferenciar populações ou subespécies de *T. angustula* têm sido publicados na literatura. Muito embora isoladamente eles não tenham como objetivo atualizar a sistemática da espécie, o acúmulo de dados certamente contribui para uma futura revisão taxonômica. A análise de quinze caracteres morfológicos, realizada por Diniz-Filho *et al.* (1998) revelou variações quanto ao tamanho do corpo relacionadas à região geográfica de ocorrência de *T. angustula angustula*, onde as maiores abelhas foram obtidas no sul do país, sendo essa característica possivelmente uma adaptação ao clima frio.

Figura 1: Vista lateral de tórax de *Tetragonisca angustula* (jataí). **A:** Mesepisterno (seta) preto de *T. a. angustula* Latreille. **B:** Mesepisterno (seta) amarelo de *T. a. fiebrigi* Schwarz.. (Fotos de Eliana B. Castanheira).

1.3 O DNA mitocondrial (DNAm)

Desde o século passado, entre o final da década de 1970 e início dos anos 1980, a molécula do DNAm tem sido o marcador molecular mais utilizado em estudos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas, migrações, fluxo gênico, filogeografia, eventos de especiação e outros aspectos biológicos e evolutivos em diversos grupos de animais (Avise *et al.* 1987, Moritz *et al.* 1987, Avise 1994, Avise, 2000).

O DNAm animal é uma molécula circular e pequena, com aproximadamente 16 kb. O genoma mitocondrial dos animais, salvo algumas exceções (*e. g.*, Warrior & Gall 1985), contém os mesmos 37 genes: 22 para RNA

transportadores, dois para as subunidades ribossômicas, três para as subunidades da enzima citocromo oxidase (COI, COII e COIII), um para o citocromo b, dois para as subunidades da ATPase (6 e 8) e sete para as subunidades da NADH desidrogenase (**Figura 2**). Esse número de genes codifica para apenas 5% dos produtos necessários para o funcionamento da mitocôndria (Moritz *et al.* 1987, Boore 1999, Arias *et al.* 2003). O DNAm possui também uma região não codificadora, conhecida como D-Loop (em vertebrados e equinodermas) ou região rica em A+T (em invertebrados), responsável pelo controle da replicação e transcrição do DNAm (Wolstenholme 1992, Arias *et al.* 2003). A ordem e a localização dos genes na molécula do DNAm dos animais é, em geral, considerada estável, principalmente entre organismos proximamente relacionados (Moritz *et al.* 1987).

O que torna a molécula do DNAm única é o fato de apresentar herança materna, ausência de recombinação, conteúdo gênico conservado, regiões intergênicas pequenas ou ausentes, ausência de íntrons, de DNA repetitivo, de pseudogenes e de elementos transponíveis (Moritz *et al.*, 1987), além de a evolução de algumas regiões ser extremamente rápida quando comparada a do genoma nuclear (Nedbal & Flynn 1998), útil para estudos de grupos com divergência recente (Avise 2000). O fato de a herança do DNAm ser materna (portanto, haplóide) faz com que as mutações acumuladas não sejam dispersas por meio de recombinação, o que permite que diferenças acumuladas entre matrilineagens sejam usadas para inferências de genealogias de genes (Avise *et al.* 1987). Esta ausência de recombinação faz com que a molécula inteira possa ser assumida como tendo a mesma história genealógica (Hurst & Jiggins 2005).

Embora amplamente utilizado, o DNAm apresenta algumas características que, segundo Hurst & Higgins (2005), seriam possíveis fatores complicadores nas

análises: a herança materna, que só reflete a história das fêmeas poderia não detectar a história dos machos, e a existência de sequências de DNAm_t integradas ao genoma nuclear (NUMTs) que poderiam ser amplificadas por iniciadores mitocondriais, causando distorções nos resultados de estudos populacionais, filogenéticos e biogeográficos. Além disso, o DNAm_t de Hymenoptera é conhecido por possuir uma das proporções mais elevadas de adenina (A) e timina (T) entre os animais (Cameron 1993, Simon *et al.* 1994), o que aumentaria a ocorrência de homoplasias que poderiam causar resultados distorcidos em estudos filogenéticos e filogeográficos.

Figura 2. Mapa do genoma mitocondrial de *Apis mellifera* (Crozier & Crozier 1993), mostrando sua estrutura circular e os limites de cada um de seus genes.

1.4 Os Microssatélites

Em contraste com o DNAm, os microssatélites são marcadores nucleares, que consistem em seqüências repetitivas de DNA que não são traduzidas em proteína (Hillis *et al.*, 1996). O tamanho total da região (*locus* de microssatélite) pode variar de dezenas a centenas de pares de bases, sendo as repetições constituídas por dois até dez pares de bases. Todavia, devido a sua complexidade, não existe um conceito fixo definido para os microssatélites, e seqüências com unidades de repetição bem maiores e que apresentam “imperfeições” ao longo da cadeia têm sido consideradas como microssatélites (Ellegren, 2004). Eles são classificados em quatro grupos: 1) perfeitos (Ex.: ACACACACACAC); 2) imperfeitos (Ex.:AGAGAGTGAGAG); 3) interrompidos (Ex.:AGAGCCCAGAG) e 4) compostos (Ex.:GAGAGAATATATAT). Os microssatélites estão entre os mais variáveis tipos de seqüência encontrados no genoma. Seu polimorfismo é resultado de diferenças no tamanho total dos alelos, reflexo do número de repetições, e não na seqüência de bases que os constitui. Por se tratar de uma seqüência não-codificante e que, portanto, não expressa efeitos fenotípicos, as mutações ocorridas nos microssatélites tendem a ser preservadas ao longo do tempo. As mutações são causadas por pequenos “escorregões” da DNA polimerase durante o processo de replicação, e podem causar tanto um aumento quanto uma redução no comprimento da seqüência, embora seja conhecido que ganhar uma repetição é muito mais freqüente do que perder (Ellegren, 2004). Este mecanismo de mutação faz com que os *loci* de microssatélites apresentem alta heterozigosidade, e por isso sejam bastante úteis em estudos evolutivos e de genética de populações (Ellegren 2004). Além disso, pelo fato de ser possível identificar os dois alelos do indivíduo amostrado, os microssatélites são classificados como marcadores moleculares codominantes (Strassmann *et al.*, 1996).

Em abelhas, alguns *loci* de microsatélite já foram caracterizados (Peters *et al.*, 1998; Paxton *et al.*, 1999a) e vêm sendo testados e empregados em diferentes espécies em estudos de âmbito populacional e comportamental (Estoup *et al.*, 1993; Estoup *et al.*, 1995; Francisco *et al.*, 2006).

Em abelhas sem ferrão, *loci* de microsatélites foram isolados e caracterizados para algumas espécies, por exemplo: *Melipona bicolor* (Peters *et al.*, 1998), *Scaptotrigona postica* (Paxton *et al.*, 1999), *Tetragonisca angustula* (Brito *et al.*, 2009), *Melipona rufiventris* (Lopes *et al.*, 2009a), *Melipona mondury* (Lopes *et al.*, 2009b), *Friseomellita varia* (Gonçalves *et al.*, 2011) .

1.3 O emprego de marcadores moleculares em estudos com abelhas

Características morfológicas e comportamentais se mostraram bastante úteis nos estudos da sistemática, biogeografia e evolução das abelhas, principalmente dos Meliponini (Camargo & Pedro, 1992). Em *Apis*, análises multivariadas de caracteres morfológicos em conjunto com características comportamentais e ecológicas permitiram a descrição das inúmeras subespécies e espécies dispersas pelos continentes do Velho Mundo (Ruttner, 1988). Contudo, como se tratam de caracteres governados quantitativamente, o ambiente tem forte influência no resultado fenotípico, e o uso desses marcadores para a investigação mais refinada da variabilidade genética de populações é questionável.

Felizmente, as últimas duas décadas observaram um crescimento exponencial das técnicas e aplicações da biologia molecular, e novas ferramentas estão disponíveis

para os trabalhos que visem explorar a genética das populações de abelhas (Arias *et al.*, 2006). Contudo, a maioria dos estudos ainda se restringe às abelhas do gênero *Apis*, sendo *Apis mellifera* uma espécie modelo. Dentro da ordem Hymenoptera, *Apis mellifera* foi a primeira, e a única espécie a ter o genoma mitocondrial (Crozier e Crozier, 1993) e nuclear (HGSC, 2006) totalmente sequenciados. Recentemente Silvestre *et al.* (2008) realizaram o sequenciamento parcialmente completo de uma segunda espécie de abelha altamente eussocial, *Melipona bicolor*, pertencente à tribo Meliponini.

Os avanços metodológicos na era molecular são tamanhos que novos marcadores mais eficazes foram detectados ao longo dos anos, e de certa forma tornaram alguns dos mais antigos obsoletos. Hoje, a análise dos polimorfismos em microssatélites e o exame das substituições nucleotídicas em sequências gênicas são as metodologias mais populares em estudos de variabilidade genética (A vise, 2009). Em especial, o DNA mitocondrial (DNAm t) é uma ferramenta bem sucedida na avaliação evolutiva de populações, por apresentar alta taxa de evolução em relação ao núcleo, não sofrer recombinação, ser pequeno, de estrutura gênica simples e por possuir herança materna (Brown, 1985; Harrison, 1989).

1.5 Marcadores moleculares em *Tetragonisca angustula*

Pesquisas envolvendo marcadores bioquímicos e moleculares vem sendo realizadas em *T. angustula* com o interesse de analisar a estrutura genética de populações dessa espécie. Foram realizados estudos utilizando sistemas protéicos como

enzima málica, esterases, fosfoglicomutase, glicerol-3-fosfato desidrogenase, isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase, hexoquinase, peptidases, superóxido desmutase e proteínas totais (Falcão & Contel, 1990; Falcão & Contel 1991; Castanheira, 1995). Alguns desses estudos chegaram a resultados bastante úteis do ponto de vista taxonômico. Por exemplo, a variação alélica obtida no gene *Hk88* da hexoquinase, entre 228 colônias dessas abelhas coletadas em diversos estados do Brasil, diferencia as duas subespécies de *T. angustula* (Castanheira, 1995)

Oliveira *et al.* (2004), utilizando marcadores RAPD, determinaram a distância genética entre populações de *T. angustula* de 25 localidades em três países da América Latina (Brasil, Argentina e Panamá). Baseados na distância genética, calculada pela porcentagem de dissimilaridade (14%), os autores dividiram a população de *T. angustula* em dois grupos: grupo 1 (oriental), formado pela subespécie *T. a. angustula* e grupo 2 (ocidental), formado por *T. a. fiebrigi*.

1.6 *T. angustula* e a problemática das pequenas populações

Na maioria dos Hymenoptera, as fêmeas originam-se de ovos fecundados e são diplóides, enquanto os machos originam-se de ovos não fecundados e são haplóides. Essa constituição genética haplodiplóide leva à redução de recombinação e ao efeito de dominância, causando alterações oscilatórias temporárias nas frequências genéticas entre os sexos (Woyke, 1963). Segundo alguns autores, populações com sistema haplodiplóide teriam poucos *loci* polimórficos por causa da seleção contra genes recessivos deletérios expressos nos machos (Hartl, 1970; Kerr, 1975).

Obviamente outros fatores, além da haplodiploidia, podem determinar os baixos níveis de variabilidade genética observados em Hymenoptera. Entre eles, a ocorrência de endogamia e o pequeno tamanho efetivo da população, os quais estão relacionados com a estrutura social dos ninhos e a ocorrência de afunilamentos populacionais (Kerr e Vencovsky, 1982). O número mínimo de indivíduos que se reproduziram durante o período de estrangulamento demográfico define a probabilidade de perda de alelos por deriva genética, e os alelos perdidos só podem ser recuperados por mutação ou, a partir de outras populações, por imigração. Segundo o princípio da Deriva Genética uma população pequena perde ao acaso alelos. Essa situação faz com que a população possua apenas um nível relativamente baixo de variabilidade genética, o que pode ser muito prejudicial se as condições ambientais mudarem (Templeton, 2006).

Quando uma população é iniciada por poucos indivíduos, a sua variabilidade dependerá da amostra de alelos trazida por estes fundadores (efeito fundador). O efeito fundador e o efeito de estrangulamento demográfico têm a mesma consequência: a redução da variabilidade genética e desequilíbrio de ligação (Templeton, 2006).

A determinação do sexo nas abelhas ocorre em duas fases: a primeira fase, poucas horas após a postura, na qual os ovários ou os testículos são determinados, e a segunda fase, ao final da fase de pré-pupa, que determina o fenótipo sexual de todos os discos imaginais (Kerr, 1997). O *locus* Complementary Sex Determination (CSD) é também responsável pela determinação do sexo. A hemizigose do *locus* determina o desenvolvimento dos testículos, resultando em machos férteis e, em heterozigose, determinam o desenvolvimento dos ovários nas fêmeas. A ocorrência de alelos em homozigose determina a formação de machos diplóides (estéreis) (Hedrick *et al.*, 2006). Estes, além de demandarem um custo energético alto, não contribuem para a manutenção do ninho, levando-o a um enfraquecimento e mesmo à morte. (Kerr, 1997).

A produção de machos diplóides está associada fortemente a cruzamentos consangüíneos. Portanto, pequenas reservas de matas primárias e meliponários, abrigando um pequeno número de ninhos (Kerr *et al.*, 1996), são situações propícias para o aparecimento desses machos. Sendo assim, a manutenção de populações pequenas de abelhas provavelmente promove a diminuição do número de alelos sexuais, induzindo a produção de machos diplóides (Kerr e Vencovsky, 1982).

Woyke (1980) constatou que para uma população de *Apis mellifera* se manter viável é necessário conservar um número mínimo de seis alelos diferentes para o gene *CSD*. Estima-se que para os meliponínios manterem seis alelos sexuais a população deve possuir pelo menos 44 colônias em sua área de reprodução (Kerr & Vencovsky, 1982). Segundo Yokoyama & Nei (1979), se a população for menor que 44 colônias, será eliminada entre 15 a 30 gerações pela perda gradativa da variabilidade genética – “Efeito Yokoyama e Nei”. Isto se justifica pela grande quantidade de machos diplóides que são produzidos quando há aumento de endogamia (Kerr *et al.*, 1996).

Nogueira-Neto (2002) tem realizado desde 1990 experimentos de *inbreeding* em pequenas populações de abelhas sem ferrão. Nos seus meliponários, ele mantém espécies de abelhas que não são nativas na área, para promover o endocruzamento e verificar como as colônias se desenvolvem. Desde que ninhos novos não têm sido mais introduzidos na área de criação, a situação retrata endogamia. Porém, ao contrário do esperado pela teoria, machos diplóides são raros na maioria das colônias. Quando fundou uma população de *Scaptotrigona postica* a partir de seis ninhos iniciais, essa população chegou a mais de 20 ninhos. Segundo ele, esses resultados não seriam possíveis caso a hipótese de Kerr & Vencovsky (1982) estivesse correta. Nogueira-Neto (1997) afirma ainda ser necessário mais que uma simples condição de homozigose no *locus* da determinação sexual para a formação de machos diplóides. Em sua opinião, é

necessária uma condição de associação entre estresse do ninho, baixa disponibilidade de recursos e baixa condição nutricional do ovo onde se desenvolve o indivíduo, juntamente com os fatores genéticos atuando para que sejam desenvolvidos os machos diplóides.

O uso de ferramentas moleculares para realizar análises genéticas detalhadas nestas populações resultantes de endocruzamento e em populações existentes em fragmentos começou recentemente (Alves *et al.*, 2011). Os conflitos coloniais resultantes das assimetrias genéticas causadas pela haplodiploidia e pelos tipos de fertilização das rainhas (monoandria ou poliandria) são também avaliados por estudos comportamentais e moleculares, que se complementam nas informações que fornecem.

Tendo em vista este cenário, no presente estudo fizemos uso de técnicas moleculares para compreender a estrutura populacional de duas pequenas populações de *Tetragonisca angustula* distribuídas nos *campi* da Universidade de São Paulo (USP) em Ribeirão Preto-SP e São Paulo-SP. Estes *campi* da USP são bastante arborizados e rodeados por áreas urbanas e, no caso de Ribeirão Preto, por culturas de cana de açúcar. Ambos parecem servir como uma área de refúgio, pois ali é encontrada uma grande diversidade de espécies de Meliponini, em geral em grandes quantidades (Freitas *et al.*, 2011). Para a comparação da variabilidade genética da população dos *campi* foram também obtidos dados de amostras coletadas em áreas externas, porém dentro da distribuição natural da espécie..

2.0 OBJETIVOS

1- Caracterizar geneticamente populações de *T. angustula*, provenientes de dois *campi* da USP (São Paulo e Ribeirão Preto), através de análises moleculares dos genomas mitocondrial (seqüenciamento) e nuclear (microssatélites).

2- Inferir hipóteses sobre o processo de colonização de novas áreas por *T. angustula* do ponto de vista genético, inferindo a história demográfica a partir dos resultados obtidos com marcadores moleculares.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

As amostras de *Tetragonsica angustula* foram coletadas nos *campi* da USP da cidade universitária de São Paulo (*Campus SP*) e de Ribeirão Preto (*Campus RP*) (**Figuras 3 e 4**). Foram amostrados 50 ninhos de cada população.

Figura 3: O *campus* da USP de Ribeirão Preto. Fonte: <http://www.usp.br/mapas>

Como um controle da variabilidade genética global da espécie, foram obtidas amostras de 20 ninhos de populações naturais de *T. angustula*, coletadas em locais no estado de São Paulo e Rio de Janeiro. No presente trabalho, a população denominada “naturais” foi composta de maneira bastante artificial (no sentido que amostras de diferentes localidades foram agrupadas em um só grupo: “naturais”) e não é o nosso

objetivo fazer estimativas precisas de estatísticas sumárias da variabilidade genética nesse grupo;

Com a finalidade de facilitar a comunicação dos resultados, um código de numeração foi criado e um número foi atribuído a cada indivíduo analisado (**Tabela 1**).

Figura 4: O *campus* da USP de São Paulo. Fonte: <http://www.usp.br/mapas>

Tabela 1: Numeração atribuída às amostras e seus respectivos locais de origem.

Amostras	População
1 a 50	<i>Campus</i> USP-SP
51 a 100	<i>Campus</i> USP-RP
101 a 110	São Sebastião
111 a 120	Rio de Janeiro

3.2 Extração do DNA

Para a extração de DNA total foi adotado o método Chelex (Walsh *et al.*, 1991) com modificações. Uma perna foi levemente macerada em 400 µl de Chelex 10%, incubada por 30 min a 56°C e depois por 5 min a 100°C. A solução final foi centrifugada a 14.000 rpm por 3 min. O sobrenadante foi usado para as reações de PCR.

3.3 Amplificação de regiões do genoma mitocondrial via PCR

Foram amplificadas e seqüenciadas quatro regiões do genoma mitocondrial de *T. angustula* (**Figura 5**). A escolha das regiões foi baseada no grau de polimorfismos por elas descritos na literatura (Arias *et al.*, 2006).

Na **tabela 2** estão apresentado os primers utilizados. Estes *primers* são responsáveis por amplificar uma região correspondente a um segmento com cerca de 600 pares de base (pb) da porção 5' do gene da citocromo oxidase I (COI), outro segmento de cerca de 550 pb do mesmo gene, um terceiro fragmento de cerca de 450 pb do gene Citocromo Oxidase B (CytB) e um fragmento de cerca de 600 pb do ND2.

Figura 5: Mapa do DNA mitocondrial de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apoidea). As regiões destacadas em cores foram eleitas para sequenciamento nas amostras de *T. angustula*.

Tabela 21. Pares de *primers* para amplificação de regiões do genoma mitocondrial de *T. angustula*.

Pares de <i>primers</i>	Sequência do <i>primer</i>	Referência bibliográfica	Genes parcialmente amplificados
MtD6 + MtD9	5'GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC3' 5'CCCGGTAAAATTAATAAATAAACTTC3'	(Simon <i>et al.</i> , 1994)	COI
MtD26 + MtD28	5'TATGTACTACCATGAGGACAAATATC3' 5'ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT3'	(Simon <i>et al.</i> , 1994)	CytB
ND2FCon + Sca1	5'AATATTATAAAGAATTCTAC3' 5'CCAATATTTTTATGATTTG3'	(Este trabalho)	ND2

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se 1,0 µl de DNA extraído pelo método Chelex. À solução foram adicionados 2,5 µl de do tampão de reação de PCR (Invitrogen), 3,0 µl de MgCl₂ 50 mM, 2,5 µl de cada *primer* 20 µM, 5 µl de dNTPs 2 mM cada, 0,5 µl (5 U/µl) de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) 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 42 °C e extensão a 64°C/2min.). No final do ciclo foi realizada uma extensão extra a 64°C durante 10 minutos.

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 fotografado com uma câmera digital.

3.4 Seqüenciamento

Os fragmentos resultantes das reações de PCR foram purificados usando o conjunto enzimático Exosap. Desta purificação foi utilizado 100ng de DNA para a reação de Big Dye com o Kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: desnaturação a 96°C/2min., seguida de 35 ciclos (desnaturação a 96°C/45s, anelamento a 42°C/30s e extensão a 64°C/4min.). O produto da reação de Big Dye foi então enviado para seqüenciamento no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

3.5 Amplificação e análise dos microssatélites

Para as reações de amplificação dos microssatélites foi utilizado 1 µl da extração de DNA Chelex descrita anteriormente. As reações foram adaptadas do método descrito por Walsh *et al.*, 1991, em que apenas um *primer* (M13: 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') é marcado na sua extremidade 5' com os fluoróforos 6-FAM, HEX ou NED separadamente. Além de sua sequência normal, todos os *primers forward* possuem a sequência do M13 na sua extremidade 5'. A mistura de PCR (volume final 5 µl) conteve: 0,5 µl de tampão de PCR 10× (Invitrogen), 0,5 µl de dNTPs 2 mM cada, 0,5 µl de MgCl₂ 50mM, 0,125 µl do *primer* M13 marcado com 6-FAM, HEX ou NED 5µM, 0,1 µl de glicerol 50% e 0,1 µl de *Taq* DNA polimerase 5U/ul (Invitrogen). Os *primers forward* e *reverse* para cada *locus* foram preparados da seguinte maneira: 1 µl do *primer forward* 10uM acrescido da sequência do M13 na sua extremidade 5' e 10 µl do *primer reverse* 10uM em um volume final de 20 µl; desta solução resultante foram utilizados 0,125 µl para a reação de PCR. Cada reação de PCR será submetida a um ciclo específico descrito na Tabela 3. Os *primers* que foram utilizados para amplificação de 9 *loci* de microssatélites em *T. angustula* são espécie específicos e foram desenvolvidos em nosso laboratório (Brito *et al.*, 2009) (**Tabela 3**).

Após a amplificação, 9 µl de água Milli-Q foram adicionados a 1 µl da reação de amplificação; 2 µl dessa reação diluída foram adicionados a 7,85 µl de Formamida HI DI (Applied Biosystems) e 0,15 µl do marcador de peso molecular (GeneScan 500 ROX da Applied Biosystems). Essa mistura foi analisada no sequenciador automático ABI3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) do Serviço de Sequenciamento do Centro de Estudos do Genoma Humano do IB- USP. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada através do programa GeneMarker V1.85 (SOFTGENETICS).

Tabela 3: Condições de amplificação dos *loci* de microssatélite para *Tetragonisca angustula*.

<i>locus</i>	Ciclo de PCR
Tang11	Desnaturação a 96°C/8min.; 35 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s., hibridação a 48°C/1min. e extensão a 72°C/1min.; extensão extra a 72°C/10min.
Tang12	Desnaturação a 96°C/8min.; 35 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s., hibridação a 53°C/1min. e extensão a 72°C/1min.; extensão extra a 72°C/10min.
Tang17	Desnaturação a 96°C/8min.; 35 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s., hibridação a 48°C/1min. e extensão a 72°C/1min.; extensão extra a 72°C/10min.
Tang57	Desnaturação a 95°C/7min.; 6 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s, hibridação a 59°C/30s e extensão a 72°C/30s; 6 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s, hibridação a 58,5°C/30s e extensão a 72°C/30s; 6 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s, hibridação a 57°C/30s e extensão a 72°C/30s; 6 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s, hibridação a 56,5°C/30s e extensão a 72°C/30s; 6 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s, hibridação a 56°C/30s e extensão a 72°C/30s; 6 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s, hibridação a 55,5°C/30s e extensão a 72°C/30s; 6 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s, hibridação a 55°C/30s e extensão a 72°C/30s; e extensão extra a 72°C/ 5 min.
Tang60	Desnaturação a 96°C/8min.; 35 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s., hibridação a 48°C/1min. e extensão a 72°C/1min.; extensão extra a 72°C/10min.
Tang65	Desnaturação a 96°C/8min.; 35 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s.,

	hibridação a 48°C/1min. e extensão a 72°C/1min.; extensão extra a 72°C/ 10min.
--	---

3.6 Análise dos resultados

As seqüências de DNAm foram alinhadas através do programa Geneious v. 5.4. Para determinar a estruturação populacional (F de Wright), a diversidade haplotípica e nucleotídica, a distância genética entre os haplótipos, a diversidade e frequência genotípica e alélica, heterozigose observada, heterozigose esperada e estruturação populacional e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foram usados os pacotes de programas DNAsp v5.1 (Librado & Rozas, 2009), ARLEQUIN v3.11 (Excoffier et al., 2005), MEGA 4 (Tamura et al., 2007) e GenePOP v1.2 (Raymond & Rousset, 1995). As seqüências pelo programa Geneious® versão 5.04 através do algoritmo *Muscle Alignment*. Os alinhamentos foram exportados em formato FASTA e estatísticas sumárias acerca dos dados foram obtidas no programa DNAsp® versão 5.1 e Mega versão 4. O programa DNAsp foi usado para transformar o arquivo FASTA em NEXUS, para que o programa Network® versão 4.3 pudesse construir as redes de haplótipos. As análises foram efetuadas separadamente para cada um dos três genes e com as seqüências dos três genes concatenadas pelo programa Geneious.

Para analisar os dados de microssatélites, usamos o programa GenAlex 6.4, que testa o equilíbrio de Hardy-Weinberg, bem como estima Fst e calcula diversas estatísticas sumárias para genótipos. O programa Microchecker 2.2.3 foi usado para detectar a presença de alelos nulos, que poderiam estar influenciando nas estimativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg,

4.0 RESULTADOS

4.1 DNA mitochondrial

4.1.1 *Campus* de Ribeirão Preto

As sequências obtidas para as 50 amostras do *campus* de Ribeirão Preto foram alinhadas com as sequências das 20 amostras “naturais”. Quatro diferentes análises foram efetuadas separadamente, sendo uma para cada um dos três genes isoladamente e a última com as sequências dos três genes concatenadas. Os dados serão apresentados brevemente para cada uma das três primeiras análises, e para as sequências concatenadas. A **tabela 4** mostra a distribuição de cada amostra em relação aos haplótipos encontrados para cada gene.

Tabela 4: Distribuição de cada amostra individualmente (*campus* RP e “naturais”) de acordo com os haplótipos que elas possuem em cada um dos três genes estudados, bem como na análise com os genes concatenados

GENE	HAPLÓTIPO	AMOSTRAS
COI	1	102, 103, 104, 105, 109
COI	2	101, 106, 107, 108, 110
COI	3	111-120
COI	4	51-100
CYTB	1	52, 53, 56, 58, 65, 68, 77, 78, 79, 87, 89, 93
CYTB	2	51, 54, 55, 57, 59-64, 66, 67, 69-76, 80-86, 88, 90-92, 94-100
CYTB	3	101-110
CYTB	4	112
CYTB	5	116-120
CYTB	6	113
CYTB	7	111
CYTB	8	114, 115
ND2	1	52-100
ND2	2	51
ND2	3	102, 103, 104 105, 109, 110
ND2	4	101, 106, 107, 108
ND2	5	112, 113, 116-120
ND2	6	111, 114, 115
COI+CYTB+ND2	1	54, 55, 57, 59-64, 66, 67, 69-76, 80-86, 88, 90-92, 94-100
COI+CYTB+ND2	2	101, 106, 107, 108
COI+CYTB+ND2	3	102, 103, 104, 105, 109
COI+CYTB+ND2	4	110
COI+CYTB+ND2	5	111
COI+CYTB+ND2	6	112
COI+CYTB+ND2	7	113
COI+CYTB+ND2	8	114, 115
COI+CYTB+ND2	9	116, 118, 119, 120
COI+CYTB+ND2	10	51
COI+CYTB+ND2	11	52, 53, 56, 58, 65, 68, 77, 78, 79, 87, 89, 93

4.1.1.1 O gene Citocromo Oxidase I (COI)

O alinhamento e edição resultaram em 70 sequências de 402 pares de bases que correspondem a um trecho do gene COI. Para essa região do DNA mitocondrial, a população do *campus* RP foi totalmente monomórfica, tendo somente um haplótipo presente (H4). Enquanto isso, embora as 20 “naturais” não tenham mostrado muito polimorfismo (tiveram somente 2 sítios polimórficos), este foi suficiente para formar três haplótipos e uma diversidade haplotípica considerável. Essa grande diferença entre *campus* e “naturais” foi responsável pelo alto valor de F_{st} entre esses dois grupos (**tabela 5**).

A **figura 6** mostra a rede de haplótipos gerada pelos dados do sequenciamento do gene COI. As sequências do COI foram capazes de resolver somente as relações mais evidentes. A **tabela 4** pode ser usada para observar quais indivíduos compõem cada um dos haplótipos.

Figura 6: Rede de haplótipos obtida com dados de sequências nucleotídicas do gene COI para as amostras do *campus* -RP. Para cada haplótipo, em amarelo estão representadas as proporções de indivíduos pertencentes ao *campus* RP, em vermelho os indivíduos do Rio de Janeiro e em azul os de São Sebastião. Os números nas linhas entre haplótipos se referem às posições do gene em que estão localizadas as mutações que caracterizam cada haplótipo e o diferencia dos demais.

4.1.1.2 O gene Citocromo B (CytB)

O alinhamento e edição resultaram em 70 sequências de 388 pares de bases que correspondem a um fragmento do gene CytB. Esse gene se revelou o mais diverso entre os três, com maior número de sítios polimórficos resultando na identificação de vários haplótipos, em especial nas 20 amostras “naturais” (**tabela 5**). Quanto à população do *campus* RP, dois haplótipos foram verificados diferindo por apenas um sítio, no entanto ambos haplótipos encontram-se bem representados no local. Doze indivíduos apresentaram o haplótipo 1 e 38 o haplótipo 2, gerando, como

consequência, uma diversidade haplotípica relativamente alta quando consideramos o número de haplótipos existentes em uma amostragem pequena. A **figura 7** apresenta a rede de haplótipos.

Embora numericamente a diferença entre o grau de informação do COI com o CytB possa parecer grande, para o foco deste trabalho (as amostras do *campus*) a estrutura das redes mostra o mesmo padrão principal: as amostras da população do *campus* são mais relacionadas do que em relação às “naturais”. O que os dados das sequências do CytB acrescentam para a análise é o fato de demonstrarem que há variabilidade genética no DNA mitocondrial das amostras do *campus*.

Figura 7: Rede de haplótipos obtida com dados de sequências nucleotídicas do gene CytB para as amostras do *campus* RP. Para cada haplótipo, em amarelo estão representadas as proporções de indivíduos pertencentes ao *campus*, em vermelho os indivíduos do Rio de Janeiro e em azul os de São Sebastião.

4.1.1..3 O gene NADH-subunidade 2 (ND2)

O alinhamento e edição resultaram em 70 seqüências de 503 pares de bases que correspondem a um fragmento do gene ND2. Os resultados foram, de certa forma, similares aos obtidos com o CytB, só que desta vez houve dois sítios polimórficos na população do *campus*. Contudo, as diferenças nucleotídicas entre os indivíduos dessa população se restringiram ao indivíduo do ninho 51 (**figura 8**), causando baixa diversidade haplotípica nessa população (**tabela 5**).

Figura 8: Rede de haplótipos com dados de seqüências nucleotídicas do gene ND2 para as amostras do *campus* RP. Para cada haplótipo, em amarelo estão representadas as proporções de indivíduos pertencentes ao *campus*, em vermelho os indivíduos do Rio de Janeiro e em azul os de São Sebastião.

4.1.1.4 Os genes COI, CytB e ND2 concatenados

O alinhamento e edição das sequências após a concatenação dos três genes resultaram em 70 sequências de 1293 pares de bases. Os resultados se tornaram mais robustos, e a análise conjunta dos três genes corroborou o padrão geral: a população de *T. angustula* da USP de Ribeirão Preto possui uma baixa variabilidade no genoma mitocondrial em todos os parâmetros moleculares acessados, principalmente no que diz respeito à diversidade nucleotídica e haplotípica (**tabela 5**). Como consequência, o *Fst* entre essas duas populações é alto em todos os quatro conjuntos de dados. Embora estimar a distância genética entre as populações não é nosso foco, os valores demonstram que elas são bastante diferenciadas entre si.

Tabela 5: Sumário da diversidade molecular encontrada para a população do *campus* RP (N = 50), e “naturais” (N = 20), de acordo com o gene estudado.

	Gene/População							
	COI		CytB		ND2		COI + CytB + ND2	
Parâmetro Molecular	“Naturais”	USP	“Naturais”	USP	“Naturais”	USP	“Naturais”	USP
Nr. de sítios segregantes	2	0	7	1	5	2	14	3
Nr. de haplótipos	3	1	6	2	4	2	8	3
Diversidade haplotípica	0,6579	0	0,7053	0,37224	0,7632	0,04	0,8579	0,4025
Diversidade nucleotídica	0,0022	0	0,0071	0,0009	0,00383	0,0002	0,0043	0,00035
<i>Fst</i>	0,7368		0,653		0,71662		0,69112	

A **tabela 6** mostra os resultados obtidos com a Análise de Variância Molecular (AMOVA). Os resultados mostram que 76,48% da diversidade molecular encontrada pode ser explicada por uma estruturação entre as populações analisadas, *campus* e “naturais”. Ou seja, 76,48% da variabilidade genética na amostragem total vêm de diferenças entre indivíduos de populações diferentes, enquanto 23,52% da

variabilidade podem ser atribuídos a diferenças no DNA mitocondrial entre indivíduos de uma mesma população. Como mencionado anteriormente, no presente trabalho, a população “naturais” foi composta de maneira bastante artificial, e isso pode influenciar os dados. Mas somente menos de 24% da variação na amostragem total é atribuída a indivíduos da mesma população, ou seja, a AMOVA também mostrou que a variabilidade genética do DNA mitocondrial dentro do *campus* é bastante pequena, implicando em um valor de F_{st} similar ao obtido com as estatísticas sumárias de diversidade genética (**tabela 5**).

Tabela 6: Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) para as amostras do *campus* RP e “naturais”.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre populações	1	108,193	3,74642	76,48
Dentro de populações	68	78,35	1.15221	23,52
Total	69	186,543	4,89863	
Índice de fixação (F_{st}) = 0,76479				

A **figura 9** apresenta a rede de haplótipos resultante da análise com os genes concatenados. Como esperado, as principais relações encontradas pelos genes isolados foram recuperadas.

Figura 9: Rede de haplótipos obtida com dados de seqüências nucleotídicas dos genes COI, CytB e ND2 concatenadas para as amostras do *campus* RP. Para cada haplótipo, em amarelo estão representadas as proporções de indivíduos pertencentes ao *campus*, em vermelho os indivíduos do Rio de Janeiro e em azul os de São Sebastião.

Vale ressaltar que o *campus* teve três haplótipos, sendo um deles representado por um indivíduo somente, e os outros dois tendo frequências um pouco mais similares. A distância genética entre os haplótipos do *campus* é bastante pequena: o haplótipo H 10 está a dois passos mutacionais do haplótipo mais freqüente (H1), ao passo que H 11 está somente a um passo mutacional de H 1. Essa distância é bem menor, por exemplo, do que a distância entre os haplótipos do *campus* e os haplótipos da população “naturais”, e também relativamente menor do que as distâncias pelas quais os haplótipos da população “naturais” estão afastados entre si.

4.1.2 *Campus* de São Paulo

As sequências obtidas para as 50 amostras do *campus* de São Paulo foram alinhadas com as sequências das 20 amostras “naturais”. Assim como para Ribeirão Preto, os dados serão apresentados brevemente para cada uma das três primeiras análises e para as sequências concatenadas. A **tabela 7** mostra a distribuição de cada amostra em relação aos haplótipos encontrados para cada gene. A numeração dos haplótipos existentes (H1, H2, H3...) para cada gene analisado das amostras do *campus* SP não possuem correlação com a numeração dos haplótipos para cada gene analisado das amostras de Ribeirão Preto. Isso significa que, por exemplo, o haplótipo H1 do CytB das amostras de Ribeirão Preto não tem necessariamente a mesma sequência do haplótipo H1 do CytB das amostras de São Paulo.

Tabela 7: Distribuição de cada amostra individualmente (*campus* SP e “naturais”) de acordo com os haplótipos que elas possuem em cada um dos três genes estudados, bem como na análise com os genes concatenados.

GENE	HAPLÓTIPO	AMOSTRAS
COI	1	01-05, 07-12, 14, 17-22, 24-33, 35-50, 111-120
COI	2	46, 13, 16
COI	3	9
COI	4	34, 23, 06, 110, 101, 108, 107, 106,
COI	5	15
COI	6	105, 102, 103, 104, 109,
CYTB	1	01-05, 07-12, 14, 17-22, 24-33, 35-50
CYTB	2	112
CYTB	3	06, 101, 102, 104, 105, 23, 106, 107, 110, 103, 109, 108, 34
CYTB	4	16, 46, 15, 13
CYTB	5	9
CYTB	6	111
CYTB	7	117
CYTB	8	116, 120, 118, 119
CYTB	9	113
CYTB	10	114, 115
ND2	1	01-05, 07-12, 14, 17-22, 24-33, 35-50
ND2	2	15
ND2	3	16, 13, 46
ND2	4	23, 34, 06, 103, 105, 109, 106, 108, 110, 107, 101, 102, 104
ND2	5	9
ND2	6	111-120
COI+CYTB+ND2	1	01-05, 07-12, 14, 17-22, 24-33, 35-50
COI+CYTB+ND2	2	06, 106, 107, 108, 110, 101, 23, 34
COI+CYTB+ND2	3	9
COI+CYTB+ND2	4	102, 103, 104, 105, 109
COI+CYTB+ND2	5	111
COI+CYTB+ND2	6	112
COI+CYTB+ND2	7	113
COI+CYTB+ND2	8	114, 115
COI+CYTB+ND2	9	116, 118, 119, 120
COI+CYTB+ND2	10	117
COI+CYTB+ND2	11	13, 16, 46
COI+CYTB+ND2	12	15

4.1.2.1 O gene Citocromo Oxidase I (COI)

O alinhamento e edição resultaram em 70 sequências de 428 pares de bases correspondentes a um trecho do gene COI. Para essa região do DNA mitocondrial, a população do *campus* SP teve um número maior de sítios polimórficos e de haplótipos (**tabela 8**) quando comparada às “naturais” (o que, de certa forma, é um resultado inesperado, quando comparamos com a análise do mesmo gene no *campus* RP. Contudo, tanto a diversidade haplotípica quanto a nucleotídica dessa população foram substancialmente inferiores a essas mesmas medidas das “naturais”).

A **figura 9** mostra a rede de haplótipos gerada com os dados de sequência do gene COI. Vários pontos merecem destaque nessa rede. Primeiro, todas as 10 amostras do estado do Rio de Janeiro (RJ) apresentam um único haplótipo e este está presente na maioria das amostras (42 ninhos) da população do *campus*. Segundo, esta última população apresenta três ninhos que compartilham suas sequências com amostras de São Sebastião.

Figura 9: Rede de haplótipos obtida com dados de sequências nucleotídicas do gene COI para as amostras do *campus* SP. Para cada haplótipo, em amarelo estão representadas as proporções de indivíduos pertencentes ao *campus*, em vermelho os indivíduos do Rio de Janeiro e em azul os de São Sebastião.

Analisando os resultados obtidos com o COI, existem diversas idiossincrasias que de certa forma impedem uma conclusão mesmo para a pergunta mais simples sobre qual das populações é mais diversa. Observando a **tabela 7**, se pode apontar quais indivíduos geram algumas dessas peculiaridades.

4.1.2.2 O gene Citocromo B (CytB)

O alinhamento e edição resultaram em 70 sequências de 371 pares de bases que correspondem a um fragmento do CytB. Mesmo sendo a região com menor quantidade de pares de base entre as três amplificadas, de um modo geral ela foi a mais informativa. O CytB mostrou grande variabilidade nucleotídica, principalmente entre as

amostras “naturais”. Dessa forma, a resolução que ele forneceu foi muito maior que a do COI, e alguns padrões que não estavam claros ficaram mais visíveis. Outros se mostraram artefato da falta de variabilidade do COI. Particularmente, o número de haplótipos e de sítios polimórficos nas amostras “naturais” foi maior do que na população do *campus*. A diferença entre os índices de diversidade foi ainda maior do que para o COI (**tabela 8**).

A **figura 10** mostra a rede de haplótipos gerada com as sequências do CytB. As amostras RJ apresentam vários haplótipos, e dessa vez nenhum deles é compartilhado com os indivíduos do *campus*. O H1 compreende os mesmos 42 indivíduos verificados na análise com o COI, e é exclusivo do *campus*. A amostra nr. 09 apresentou o H5, que aparece na rede muito relacionado ao H1. As amostras 13, 15, 16 e 46 são as únicas que possuem o H4, sendo este próximo de H6, presente em algumas das amostras RJ. Na rede feita com o COI, essas mesmas amostras ficaram relativamente próximas ao clado RJ, mas essa relação não era clara devido ao agrupamento total das amostras do *campus* com as amostras RJ, o que, como será demonstrado adiante, é um artefato do baixo grau de informação fornecido pelo COI.

Figura 10: Rede de haplótipos obtida com dados de sequências nucleotídicas do gene CytB para as amostras do *campus* SP. Para cada haplótipo, em amarelo estão representadas as proporções de indivíduos pertencentes ao *campus*, em vermelho os indivíduos do Rio de Janeiro e em azul os de São Sebastião.

Um dos aspectos mais interessantes da rede do CytB é que as amostras de São Sebastião novamente compartilham seu único haplótipo com as amostras nr. 06, 23 e 34 do *campus*.

4.1.2.3 O gene NADH-subunidade 2 (ND2)

O alinhamento e edição resultaram em 70 sequências de 454 pares de bases que correspondem a um trecho do gene ND2. Comparando com os dois genes anteriores, o ND2 foi, ao mesmo tempo, o mais diverso dos três para as amostras do

campus e o menos diverso para as amostras “naturais” (vide **tabela 8**). Contudo, esse grau de informação fornecido recuperou os padrões que parecem mais consistentes e de certa forma resultou em uma rede de haplótipos que, como ficará claro com os dados concatenados, parece ser um bom resumo da relação entre as populações (**figura 11**).

Figura 11: Rede de haplótipos obtida com dados de sequências nucleotídicas do gene ND2 para as amostras do *campus* SP. Para cada haplótipo, em amarelo estão representadas as proporções de indivíduos pertencentes ao *campus*, em vermelho os indivíduos do Rio de Janeiro e em azul os de São Sebastião.

4.1.2.4 Os genes COI, CytB e ND2 concatenados

O alinhamento e edição das sequências, e posterior concatenação dos três genes resultaram em 70 sequências de 1254 pares de base. Observa-se que mesmo com um maior número de sítios polimórficos, a população do *campus* possui, em geral, uma

diversidade genética muito inferior às amostras "naturais" (**tabela 8**). Contudo, a princípio essa diferença é menor do que aquela encontrada para a população de Ribeirão Preto.

Tabela 8: Sumário da diversidade molecular encontrada para a população do *campus* SP (N = 50), e "naturais" (N = 20), de acordo com o gene estudado.

	Gene/População							
	COI		CytB		ND2		COI + CytB + ND2	
Parâmetro Molecular	"Naturais"	USP	"Naturais"	USP	"Naturais"	USP	"Naturais"	USP
Nr. de sítios segregantes	2	4	9	7	2	8	13	19
Nr. de haplótipos	3	5	7	4	2	5	8	5
Diversidade haplotípica	0,6579	0,2922	0,7263	0,2898	0,5263	0,2922	0,8579	0,2922
Diversidade nucleotídica	0,0022	0,001	0,00914	0,0029	0,00232	0,0024	0,0043	0,0021
F _{st}	0,2629		0,429		0,631		0,4858	

Observa-se que os valores de F_{st} para esse conjunto de dados diferem consideravelmente daqueles encontrados entre *campus* RP e "naturais", e isso se deve ao fato de algumas das amostras do *campus* apresentarem haplótipos idênticos ou muito similares aos das amostras "naturais". O COI foi o gene menos informativo, e conclusões que se baseassem somente nessas sequências tenderiam a ser altamente imprecisas. Isoladamente, o gene que forneceu maior resolução foi o CytB (os resultados obtidos com ele na **tabela 8** se assemelham bastante aos obtidos com os genes concatenados). Mas é digno de nota que mesmo sendo capaz de distinguir entre tantos haplótipos do clado do Rio de Janeiro, esse gene não foi capaz de separar a amostra número 15 das amostras número 13, 16 e 46 na rede de haplótipos (separação essa que foi recuperada nas três outras análises, inclusive com o COI). Os resultados isolados do ND2 também foram bastante satisfatórios. Contudo, para fins de discussão

dos resultados, serão usados somente os dados obtidos com os três genes concatenados, para maximizar a robustez das hipóteses apresentadas.

A **figura 12** representa a rede de haplótipos obtida a partir dos genes concatenados. Os padrões apresentados pelos genes CytB e ND2 são recuperados com maior confiança. Interessante notar o haplótipo 3, presente no indivíduo 09 e que difere do haplótipo 1 por três mutações do tipo transição, sendo uma em cada um dos 3 genes sequenciados (estes dados podem ser observados no alinhamento das sequências dos haplótipos, exposto na **tabela 21** nos anexos). Esse único indivíduo será objeto de discussão mais adiante no texto.

Figura 12: Rede de haplótipos obtida com dados de sequências nucleotídicas dos genes COI, CytB e ND2 para as amostras do *campus* SP. Para cada haplótipo, em amarelo estão representadas as proporções de indivíduos pertencentes ao *campus* SP, em vermelho os indivíduos do Rio de Janeiro e em azul os de São Sebastião.

Os dados coletados com o DNA mitocondrial dessas amostras deixaram algumas questões para serem respondidas, particularmente: 1) Por quê as amostras 06, 23 e 34 compartilham seu haplótipo (H2) com as amostras de São Sebastião? 2) Por quê as amostras 13, 15, 16 e 46 estão algumas vezes mais próximas do grupo do Rio de Janeiro do que das amostras do *campus*? 3) Por quê a amostra 09 sempre se destaca, com seu haplótipo exclusivo (H3) e através de poucas mutações pontuais, do haplótipo compartilhado pela maioria das amostras do *campus*? Para tentar responder a essas perguntas, fomos observar como os haplótipos estavam distribuídos espacialmente, utilizando os pontos de GPS obtidos para os ninhos coletados. A **figura 13** mostra onde esses ninhos peculiares se encontram em relação aos outros ninhos do *campus* SP.

Figura 13: Visão do *campus* da USP-São Paulo mostrando a distribuição dos haplótipos. Circuladas em amarelo estão representadas as amostras que possuem o haplótipo mais frequente na cidade universitária; circuladas em azul estão as amostras cujo haplótipo se assemelha às amostras de São Sebastião; circuladas em vermelho estão as amostras cujo haplótipo se assemelha às amostras do Rio de Janeiro.

Observamos que os ninhos que não agruparam com as demais amostras do *campus* nas redes de haplótipos situam-se nos arredores do Instituto de Biociências (**figura 14**), próximos do Apiário da Universidade de São Paulo. O apiário abriga ninhos de diversas espécies de Meliponini, mantidos em caixas que são monitoradas em salas ou expostas no jardim. Alguns desses ninhos, inclusive de *T. angustula*, foram trazidos de outras regiões do Brasil, como por exemplo, da região de Cunha (SP). Outros ninhos não têm sua procedência certa e os registros feitos pela equipe do laboratório são relativamente recentes, de modo que não contemplam o trânsito de ninhos com mais de 12 anos.

Figura 14: Mapa do *campus* SP com destaque para o Instituto de Biociências. Circulados em azul estão os ninhos que agruparam com as amostras de São Sebastião; em vermelho os ninhos que ficaram filogeneticamente próximos às amostras do Rio de Janeiro - com exceção da amostra nr. 46 que está localizada fora do alcance da figura. Todas essas amostras estão bastante próximas ao apiário da USP. A amostra nr. 09 também encontra-se nessa região.

Sendo assim, é bastante provável que as amostras 06, 13, 15, 16, 23, 34 e 46 sejam derivadas de enxames de ninhos do apiário que foram trazidos para o *campus*, pois se sabe que, de um modo geral, as colméias de jataí enxameiam para locais muito próximos do ninho de origem (Nogueira-Neto, 2000).

Com o intuito de estudar o processo de colonização do *campus* por *Tetragonisca angustula* e a manutenção da variabilidade “natural” dessa população, decidimos primeiro focar no estudo dos ninhos que provavelmente descendem dos ninhos que primeiro se estabeleceram na cidade universitária. Por isso, para ter uma idéia melhor da variabilidade da população original do *campus*, excluiu-se as sete

amostras exógenas e observou-se o que acontecia com o resultado da diversidade molecular. Esse grupo será chamado de “USP nativas” (**tabela 9**).

Os resultados (**tabela 9**) mostram claramente que a diversidade da suposta população fundadora do *campus* é muito menor do que a diversidade das amostras “naturais”, e bem menor do que quando consideradas as 50 amostras totais originalmente incluídas no grupo. O valor de *Fst* ficou muito mais próximo ao obtido para a análise do *campus* RP. Mas se as amostras “naturais” de *T. angustula* têm em geral grande variabilidade genética (como mostrado preliminarmente aqui), por que então a população do *campus*, que, por definição, deve ter sido fundada por enxames da população “naturais” residente em São Paulo naquela época, possui somente dois haplótipos mitocondriais, um dos quais, apresentado somente pelo indivíduo número 09?

Tabela 9: Sumário da diversidade molecular encontrada para a população do *campus* SP (N = 50), das amostras “naturais” (N = 20) e das amostras supostamente “nativas” USP (N=43).

Gene/População	COI + CytB + ND2		
Parâmetro Molecular	Naturais	USP	USP "Nativas"
Nr. de sítios polimórficos	13	19	3
Nr. de haplótipos	8	5	2
Diversidade haplotípica	0,8579	0,2922	0,0465
Diversidade nucleotídica	0,0043	0,0021	0,00011
<i>Fst</i>	0,4858		0,6845

Como outro medidor da distribuição da diversidade genética mitocondrial nessas amostras, realizamos o teste AMOVA, excluindo as amostras de ninhinhos supostamente introduzidos no *campus* (**tabela 10**). Os resultados foram extremamente similares aos obtidos para o teste entre a população do *campus* RP e as amostras “naturais”, e essa análise corroborou a idéia de que a população do *campus* SP

possui uma baixa diversidade genética mitocondrial. Dessa vez, 76,34% da variabilidade genética na amostragem total vêm de diferenças entre indivíduos de populações diferentes, enquanto 23,66% da variabilidade podem ser atribuídos a diferenças no DNA mitocondrial entre indivíduos de uma mesma população. Ainda, uma vez que as amostras introduzidas foram excluídas da análise, o valor de *Fst* ficou similar ao encontrado para o *campus* RP e congruente com os apresentados na **tabela 9**.

Tabela 10: Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) para as amostras do *campus* SP “nativas” e as “naturais”.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre populações	1	84,179	3,04871	76,34
Dentro de populações	61	57,630	0,94476	23,66
Total	62	141,810	3,99346	
Índice de fixação (FST) = 0,76479				

4.1.3 Os *campi* USP

Para obter uma dimensão sobre o relacionamento filogenético das populações dos *campi* entre si, e seu posicionamento em relação às amostras “naturais”, construímos uma rede de haplótipos com todas as 113 amostras em conjunto (excluindo-se as sete que não são naturais do *campus* de São Paulo). A **figura 15** confirma que os *campi* estão isolados entre si, e mostra que cada um é filogeneticamente mais próximo às amostras naturais do que ao outro *campus*. A **tabela 11** mostra a distribuição de indivíduos específicos aos haplótipos.

Figura 15: Rede de haplótipos obtida através do sequenciamento e concatenação dos genes COI, CytB e ND2. Em vermelho estão representadas os haplótipos de indivíduos pertencentes ao *campus* SP, em azul os haplótipos do *campus* RP e em verde os haplótipos das amostras “naturais”.

Tabela 11: Distribuição de cada amostra individualmente de acordo com os haplótipos que elas possuem na análise com os genes concatenados de todas as 113 amostras em conjunto.

GENE	HAPLÓTIPO	AMOSTRAS
COI+CYTB+ND2	1	01-05, 07, 08, 10-12, 14, 17-22, 24-33, 35-45, 47-50
COI+CYTB+ND2	2	09
COI+CYTB+ND2	3	102-105, 109
COI+CYTB+ND2	4	101, 106-108, 110
COI+CYTB+ND2	5	111
COI+CYTB+ND2	6	112
COI+CYTB+ND2	7	113
COI+CYTB+ND2	8	114, 115
COI+CYTB+ND2	9	116, 118, 119, 120
COI+CYTB+ND2	10	117
COI+CYTB+ND2	11	54, 55, 57, 59, 60-64, 66, 67, 69-76, 80-86, 88, 90-92, 94-100
COI+CYTB+ND2	12	51
COI+CYTB+ND2	13	52, 53, 56, 58, 65, 68, 77-79, 87, 89, 93

4.2 Microsatélites

4.2.1 *Campus* de Ribeirão Preto

Os seis *loci* de microssatélites foram analisados primeiramente com o software Genepop versão 4.0.10 para testar desequilíbrio de ligação. Esse teste mostrou que os *loci* Tang17 e Tang 60 estão em desequilíbrio em todos os conjuntos de amostras (“naturais”, *campus* RP e *campus* SP "Nativas”), dessa maneira produzindo resultados não-independentes e que não podem ser usados em conjunto. Como o primeiro apresentou menos diversidade, ele foi retirado das análises seguintes dos dois *campi*. As **tabelas 12 e 13** mostram os índices de diversidade genética dos cinco *loci* nas duas populações estudadas.

Os resultados mostraram que a diversidade nos microssatélites, que pode ser observada pelo número de alelos e pelas heterozigoses observada e esperada, foi bastante alta, tanto para as amostras "naturais" quanto para o *campus* RP, neste último, sendo o contrário do que foi observado pelo DNA mitocondrial. No que diz respeito aos microssatélites, o grupo “naturais” é somente um pouco mais polimórfico do que a população do *campus* de Ribeirão Preto.

Tabela 12: Diversidade encontrada nos microssatélites das populações *campus* RP e “naturais”. N = número amostral; Na = número de alelos encontrados; Ne = Número efetivo de alelos; I = índice de informação; Ho = heterozigose observada; He = Heterozigose esperada; Uhe = Heterozigose esperada não-enviesada; F = índice de fixação (Fis).

População	Locus	N	Na	Ne	I	Ho	He	UHe	F
<i>Campus</i>	Tang11	50	15	4,717	1,955	0,76	0,788	0,796	0,036
	Tang12	50	13	6,15	2,09	0,84	0,837	0,846	-0,003
	Tang57	50	6	1,484	0,684	0,18	0,326	0,329	0,448
	Tang60	50	10	5,525	1,931	0,78	0,819	0,827	0,048
	Tang65	50	14	7,862	2,321	0,74	0,873	0,882	0,152
“Naturais”	Tang11	20	18	11,111	2,645	0,95	0,91	0,933	-0,044
	Tang12	20	14	8,081	2,256	0,85	0,876	0,899	0,041
	Tang57	20	10	5,755	1,964	0,8	0,826	0,847	-0,015
	Tang60	20	13	9,639	2,395	0,9	0,896	0,919	-0,02
	Tang65	20	5	3,162	1,325	0,5	0,684	0,701	0,269

Tabela 13: Resumo da diversidade média encontrada nos cinco *loci* de microssatélites das populações *campus* RP e “naturais”. N = número amostral; Na = número de alelos encontrados; Ne = Número efetivo de alelos; I = índice de informação; Ho = heterozigose observada; He = Heterozigose esperada; Uhe = Heterozigose esperada não-enviesada.

População		N	Na	Ne	I	Ho	He	UHe
USP-SP	Média	50.00	12.00	5.21	1.85	0.68	0.74	0.75
	DP	0.00	1.39	0.84	0.24	0.10	0.08	0.09
“Naturais”	Média	20	11.6	7.55	2.117	0.8	0.839	0.86
	DP	0	2.112	1.411	0.227	0.079	0.041	0.042

A **tabela 14** mostra o resultado do teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foi assumido como hipótese nula que as populações estejam em equilíbrio para os *loci* em questão e os desvios, se significativos ou não, foram calculados. Os resultados obtidos para o nosso conjunto de dados mostraram que a população do *campus* RP está em equilíbrio de Hardy-Weinberg para três dos cinco *loci* analisados, enquanto as amostras “naturais” se encontram em equilíbrio em quatro *loci*. Todavia, a diferença entre a heterozigose observada e esperada em alguns *loci* (Tang11 e Tang57) pode ser explicada pela presença de alelos nulos. O programa Microchecker versão

2.2.3 foi usado para detectar a presença destes alelos nos cinco *loci* estudados, e o resultado mostrou que alelos nulos provavelmente existem nos *loci* Tang11 e Tang 60 dessas populações. Enquanto no Tang11 essa pode ser a explicação para o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, no Tang60 a possível presença de alelos nulos não chegou a ser suficiente para que a população tivesse sua panmixia descartada. Sendo assim, pode-se dizer que a população do *campus* provavelmente possui deficiência de heterozigotos somente para o *locus* Tang57 – deficiência esta que de certa forma seria esperada em mais *loci* após a análise do DNA mitocondrial.

Tabela 14: Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg realizado para as amostras do *campus* RP.

População	Locus	GL	Qui-Quadrado	Prob	Signif
<i>Campus</i>	Tang11	105	129,972	0,05	*
<i>Campus</i>	Tang12	78	64,698	0,86	ns
<i>Campus</i>	Tang57	15	72,965	0	***
<i>Campus</i>	Tang60	45	60,665	0,059	ns
<i>Campus</i>	Tang65	91	91,446	0,467	ns
Naturais	Tang11	153	143,333	0,701	ns
Naturais	Tang12	66	55,343	0,244	ns
Naturais	Tang57	45	66,519	0,039	*
Naturais	Tang60	78	84,41	0,377	ns
Naturais	Tang65	10	12,348	0,262	ns

*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$; ns: não significativo

As **figuras 16 a 20** mostram a distribuição das frequências alélicas nos cinco *loci* escolhidos para análise. Observa-se que em todos eles há a presença de poucos (1-3) alelos predominantes cuja frequência é muito superior à frequência dos demais (estes em maior número).

Figura 16: Representação gráfica das frequências alélicas do locus “Tang11” na população *T. angustula* do campus RP.

Figura 17: Representação gráfica das frequências alélicas do locus “Tang12” na população *T. angustula* do campus RP.

Figura 18: Representação gráfica das frequências alélicas do locus “Tang57” na população *T. angustula* do campus RP.

Figura 19: Representação gráfica das frequências alélicas do locus “Tang60” na população *T. angustula* do campus RP.

Figura 20: Representação gráfica das frequências alélicas do locus “Tang65” na população de abelhas do campus RP.

4.2.2 Campus São Paulo

As amostras que supostamente foram introduzidas no *campus* da USP de São Paulo não foram consideradas para análise dos *loci* de microssatélites. Os seis *loci* de microssatélites foram analisados primeiramente com o software Genepop versão 4.0.10 para testar desequilíbrio de ligação. Esse teste mostrou que os *loci* Tang17 e Tang 60 estão em desequilíbrio, dessa maneira produzindo resultados não-independentes e que não podem ser usados em conjunto. Como o primeiro apresentou menos diversidade (vide resultados do *campus* RP), ele foi retirado das análises

seguintes. As **tabelas 15 e 16** mostram os índices de diversidade genética dos cinco *loci* nas duas populações estudadas.

Tabela 15: Diversidade encontrada nos microssatélites das populações *campus* RP e “naturais”. N = número amostral; Na = número de alelos encontrados; Ne = Número efetivo de alelos; I = índice de informação; Ho = heterozigose observada; He = Heterozigose esperada; Uhe = Heterozigose esperada não-enviesada; F = índice de fixação (Fis).

População	Locus	N	Na	Ne	I	Ho	He	UHe	F
Campus	Tang11	43	18	11,309	2,598	0,767	0,912	0,922	0,158
	Tang12	43	19	13,399	2,712	0,767	0,925	0,936	0,171
	Tang57	43	10	4,957	1,88	0,744	0,798	0,808	0,068
	Tang60	43	17	10,244	2,508	0,744	0,902	0,913	0,175
	Tang65	43	6	2,068	1,057	0,535	0,516	0,523	-0,036
“Naturais”	Tang11	20	18	11,111	2,645	0,95	0,91	0,933	-0,044
	Tang12	20	14	8,081	2,256	0,85	0,876	0,899	0,041
	Tang57	20	10	5,755	1,964	0,8	0,826	0,847	-0,015
	Tang60	20	13	9,639	2,395	0,9	0,896	0,919	-0,02
	Tang65	20	5	3,162	1,325	0,5	0,684	0,701	0,269

Tabela 16: Resumo da diversidade média encontrada nos cinco *loci* de microssatélites das populações *campus* RP e “naturais”. N = número amostral; Na = número de alelos encontrados; Ne = Número efetivo de alelos; I = índice de informação; Ho = heterozigose observada; He = Heterozigose esperada; Uhe = Heterozigose esperada não-enviesada.

População		N	Na	Ne	I	Ho	He	UHe
USP-SP	Média	43	14	8,395	2,151	0,712	0,811	0,82
	DP	0	2,55	2,107	0,309	0,044	0,077	0,078
“Naturais”	Média	20	11,6	7,55	2,117	0,8	0,839	0,86
	DP	0	2,112	1,411	0,227	0,079	0,041	0,042

Ao analisarmos as **tabelas 9 e 15** fica claro que o padrão de diversidade encontrado nos microssatélites contrasta com aquele do DNA mitocondrial. Enquanto no mitocondrial a diversidade das amostras do *campus* é extremamente reduzida em relação às amostras “naturais”, os alelos de microssatélites se mostraram ligeiramente

mais diversificados na população do *campus* SP do que no grupo “naturais”. Nesse caso, mesmo que essa diferença seja artefato do maior número amostral no *campus*, o que deve ser ressaltado é a grande diferença entre esse padrão de diversidade e o do DNA mitocondrial.

A **tabela 17** mostra o resultado da análise de Equilíbrio de Hardy-Weinberg dessas amostras. Os resultados obtidos para o nosso conjunto de dados mostraram que a população do *campus* está em equilíbrio de Hardy-Weinberg para dois dos cinco *loci* analisados, enquanto as populações naturais encontram-se em equilíbrio em quatro *loci*. Como observado no conjunto de dados de Ribeirão Preto, a diferença entre a heterozigose observada e esperada em alguns *loci* pode ser explicada pela presença de alelos nulos. O programa Microchecker versão 2.2.3 foi usado para detectar a presença destes alelos, e o resultado mostrou que alelos nulos provavelmente existem nos *loci* Tang11, Tang12 e Tang 60 dessas populações. Desse modo, essa pode ser a explicação para os desvios do equilíbrio nos dois primeiros *loci*, enquanto para o Tang60, assim como para dos dados de Ribeirão Preto, novamente a presença de alelos nulos não foi suficiente para excluir-se estatisticamente a hipótese de panmixia. Porém desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg existem no Tang65, e é provável que a população do *campus* possua deficiência de heterozigotos apenas nesse *locus*. Como mencionado para os dados de Ribeirão Preto, deficiência de heterozigotos seria um fenômeno esperado uma vez revelado os resultados do DNA mitocondrial.

Tabela 17: Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg realizado para as amostras do *campus* SP.

População	Locus	GL	Qui-Quadrado	Prob	Signif
<i>Campus</i>	Tang11	153	230,389	0,000	***
<i>Campus</i>	Tang12	171	217,075	0,010	**
<i>Campus</i>	Tang57	45	48,450	0,336	ns
<i>Campus</i>	Tang60	136	153,027	0,151	ns
<i>Campus</i>	Tang65	15	31,101	0,009	**
"Naturais"	Tang11	105	129,972	0,050	ns
"Naturais"	Tang12	78	69,698	0,860	ns
"Naturais"	Tang57	15	72,965	0,000	*
"Naturais"	Tang60	45	60,665	0,059	ns
"Naturais"	Tang65	91	91,446	0,467	ns

*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$; ns: não significativo

Mesmo a partir do momento que excluímos as amostras supostamente introduzidas no *campus* SP na análise (ninhos 06, 13, 15, 16, 23, 34 e 46), a distribuição das frequências alélicas dos microssatélites das abelhas de São Paulo não segue um padrão, ao contrário do que foi encontrado para Ribeirão Preto. Nesse caso não há a presença de alelos predominantes na maioria dos *loci* (**figuras 21-25**).

Figura 21: Representação gráfica das frequências alélicas do locus "Tang11" na população de *T. angustula* do *campus* SP.

Figura 22: Representação gráfica das frequências alélicas do locus “Tang12” na população de *T. angustula* do campus SP.

Figura 23: Representação gráfica das frequências alélicas do locus “Tang57” na população de *T. angustula* do campus SP.

Figura 24: Representação gráfica das frequências alélicas do locus “Tang60” na população de *T. angustula* do campus SP.

Figura 25: Representação gráfica das frequências alélicas do locus “Tang65” na população de *T. angustula* do campus SP.

5.0 DISCUSSÃO

5.1 Variabilidade do DNA mitocondrial

Como ficou evidente pelos dados de DNA mitocondrial, as populações dos dois *campi* possuem uma diversidade genética muito inferior às amostras "naturais". Vale ressaltar que dois fatores de ordem amostral podem estar influenciando esses dados. Primeiro, as amostras "naturais" foram coletadas em três localidades distintas (São Sebastião, Petrópolis e Teresópolis) com um método de amostragem específico: as abelhas foram coletadas a cada 1 km de distância, no campo, para evitar a coleta de operárias irmãs forrageando em flores diferentes (Francisco, comunicação pessoal). Esse é um fator importante na distribuição da variabilidade, e tende a aumentar a variabilidade do grupo "Naturais" em relação à das populações dos *campi*, coletadas em uma área geográfica reduzida. Contudo, existe um segundo fator que é o tamanho amostral: enquanto as populações dos *campi* tiveram 50 de seus ninhos analisados, o grupo de populações naturais teve somente 20. Esse fator tenderia a reduzir a variabilidade do grupo "naturais" em relação à dos *campi*, uma vez que esse número amostral é pequeno e poderia subestimar a diversidade real das populações. Não foi nosso objetivo quantificar o quanto cada um desses fatores influenciou nos resultados, mas a existência de dois vieses que atuam em direções opostas, aliado ao grande grau de diferença encontrado entre os três grupos, nos dá a segurança de que as inferências feitas através da comparação entre "*Campus*" e "naturais" sejam corretas.

Dito isso, devemos buscar explicações para essa variabilidade tão baixa nas populações dos *campi*. É bem provável que a origem da população de *T. angustula* que hoje habita as duas cidades universitárias seja fruto de: 1) colonização por poucas rainhas, que carregaram consigo apenas uma pequena porção da variabilidade genética da população como um todo (que pode ter se reduzido ainda mais por deriva genética

uma vez dentro dos *campi*); ou 2) que essa colonização é um processo contínuo em ação, com a chegada de várias rainhas virgens, que vêm dos arredores dos *campi* para dentro dos seus limites, carregando sempre os mesmos haplótipos de DNA mitocondrial.

A favor da primeira hipótese está o fato de que as fêmeas da tribo Meliponini apresentam um elevado grau de filopatria, enxameando para regiões próximas, em geral apenas alguns metros distantes, do ninho de origem (Nogueira-Neto, 1997). Dessa maneira, mesmo que a população do entorno tenha uma variabilidade mitocondrial considerável, tendo sido os *campi* colonizados por poucas fêmeas, haveria um baixo número de haplótipos, e o comportamento filopátrico teria mantido a diversidade do genoma mitocondrial baixa. O problema com essa hipótese é que essa filopatria teria que ser tamanha a ponto de evitar por décadas que fêmeas com haplótipos diferentes dos arredores enxameassem para dentro dos *campi* (que possuem diversas características atrativas para as abelhas sem ferrão, tais como muita arborização e cavidades para nidificação extremamente abundantes) (Freitas *et al.*, 2011), e essa idéia não parece muito plausível.

Para que a segunda hipótese seja plausível, é necessário assumir que as populações residentes nos arredores dos *campi* tenham um grau de variabilidade genética mitocondrial bastante pequeno. Contudo, Koling e Moretto (2010) estudaram populações de *T. angustula* na região de Blumenau e encontraram uma diversidade genética relativamente alta em uma escala espacial pequena, mostrando que a expansão da cidade não necessariamente leva a um efeito de gargalo de garrafa, uma vez que *T. angustula* tem bastante sucesso em ambientes urbanos.

5.2 Variabilidade genética nuclear

Outro resultado que ficou evidente foi a variabilidade alta dos microssatélites (genoma nuclear), e que foi muito similar entre as amostras dos *campi* e as amostras “naturais”. Isso foi o oposto do encontrado para o DNA mitocondrial, e a explicação para essa discrepância está na diferente forma de herança desses dois marcadores moleculares: enquanto o DNA mitocondrial tem herança exclusivamente materna, a herança dos microssatélites é biparental (Ellegren, 2004). Especula-se que os machos de *T. angustula*, ao contrário das fêmeas filopátricas, são capazes de voar alguns poucos quilômetros na hora de acasalar, atraídos pelos feromônios exalados pelas rainhas virgens em vôo nupcial. No caso da diversidade mitocondrial, essa variabilidade fica isolada nos pontos próximos onde os enxames se estabelecem, mantida inerte pela filopatria das fêmeas. Mesmo que machos venham de longe e tenham sucesso no acasalamento, o DNA mitocondrial que eles carregam não contribui para o *pool* genético daquela população. No entanto, da perspectiva dos microssatélites (DNA nuclear), quando machos vindos de grandes distâncias são bem sucedidos na cópula, os alelos que eles carregam são passados adiante. Por isso, em uma dada população de abelhas sem ferrão, como essas dos *campi* da USP, se ela não estiver isolada suficientemente a ponto de impedir que machos de regiões distantes fecundem as rainhas virgens, introduzindo assim novos alelos, a diversidade genética mitocondrial será bastante inferior à diversidade nuclear como um todo. Pode-se dizer que nesse caso existem dois números efetivos populacionais, sendo um N_e de fêmeas, bastante reduzido, e um N_e de machos, consideravelmente maior.

Esse cenário é especialmente importante para a genética das abelhas sociais. Como himenópteros, as abelhas são organismos geneticamente haplodiplóides: as

fêmeas são diplóides e os machos haplóides, produzidos por partenogênese arrenótoca (Michener, 2006). Porém nem toda a progênie diplóide de uma abelha rainha será 100% de fêmeas. O sistema de determinação do sexo em abelhas é complexo, e tem sido bem estudado nos últimos anos (Beye *et al.*, 2003; Beye, 2004; Cook, 1993). Sabe-se que em Meliponini existe ao menos um gene responsável por essa função, o "Sex Determiner Locus". Para que os ovos diplóides postos pela rainha dêem origem a fêmeas, é preciso que eles sejam heterozigotos para esse gene. Quando essa condição não é satisfeita, os ovos diplóides e homozigotos se desenvolvem em machos inférteis, cuja existência, do ponto de vista da seleção natural, é negativa para a colônia (Zayed *et al.*, 2004; Woyke, 1963). A seleção natural é o mecanismo responsável pela manutenção de diversos alelos segregando em alta frequência nessas populações (Gel *et al.*, 2009). Como proposto para outras espécies de meliponínios, é tido que *T. angustula* é uma espécie monoândrica, isto é, a rainha é fecundada por somente um macho (Melo *et al.*, 2001). Isso faz com que seja mais fácil que haja a produção de machos diplóides nos ninhos de espécies monândricas, pois o número de alelos disponíveis para combinações na prole é reduzido.

Tendo essas peculiaridades em vista, é esperado que uma pequena população isolada de *T. angustula* esteja sujeita a endogamia, o que pode levar à produção de um número relativamente grande de machos diplóides e possivelmente iniciar um ciclo contínuo que pode extinguir essa população (Zayed *et al.*, 2004; Woyke, 1963). Embora a presença de machos diplóides não tenha sido analisada neste trabalho, a alta variabilidade genética que encontramos nos *loci* de microssatélites é um forte indício de que as populações dos *campi* não estejam em endogamia e, por conseguinte, machos diplóides não devam ser produzidos, ou se produzidos, não o são em taxas elevadas. É provável que o elevado *Ne* populacional do genoma nuclear de *T. angustula*, causado

pelo maior raio de vôo dos machos, seja responsável por evitar a produção excessiva de machos diplóides.

5.3 Variabilidade dos microssatélites e a colonização dos *campi* pela *T. angustula*

Analisando os resultados do DNA mitocondrial, propusemos duas hipóteses. De acordo com a segunda hipótese, a baixa variabilidade genética encontrada nas amostras dos *campi* seria então explicada por uma baixa variabilidade genética na população residente nos arredores. Os dados de microssatélites, por outro lado, mostram que a variabilidade genética nuclear dos *campi* é semelhante à variabilidade das amostras “naturais”. De posse desses dados e uma vez que a variabilidade genética do DNA nuclear recebe contribuição de ambos os sexos, podemos construir um modelo simples sobre a colonização dos *campi* do ponto de vista do genoma nuclear. De acordo com a primeira hipótese, poucas rainhas (1 a 4) fundaram a população. Dada a variabilidade genética da população como um todo, é provável que elas fossem heterozigotas, por exemplo, com os genótipos A1A2 e A2A4 para um dado *locus* (do ponto de vista da confirmação da hipótese, essa é uma premissa conservadora; caso elas fossem homozigotas, ficaria ainda mais evidente). Essa geração fundadora dos *campi* (G0) teria, portanto, 3 alelos. Durante o processo de divisão desses dois ninhos, rainhas virgens seriam produzidas e se acasalariam com machos vindos de fora e fundariam ninhos próximos de seus maternos. Esses ninhos constituiriam a próxima geração (G1), cujas fêmeas obrigatoriamente carregariam alelos da geração anterior. Tanto os ninhos fundadores (G0) quanto os ninhos resultantes do primeiro enxame (G1), poderiam

produzir rainhas virgens que seriam fecundadas para produzir novos ninhos (G2 por simplificação). Os ninhos de G2 que fossem produzidos por G0 obrigatoriamente teriam os alelos nucleares das fêmeas fundadoras; os que fossem produzidos por G1 teriam 50% de chance de carregar esses alelos. O mesmo ocorreria nas gerações subsequentes. A deriva genética poderia atuar nos alelos fundadores que teriam suas frequências diluídas pelos alelos novos trazidos pelos machos. Porém, como haveria pelo menos alguma sobreposição de gerações, e as gerações anteriores teriam maior frequência de alelos fundadores e continuariam a produzir enxames, em números absolutos esses alelos seriam os mais predominantes na geração seguinte. Mais que isso, os machos vindos de fora não necessariamente iriam dissipar a frequência dos alelos fundadores, pois poderiam possuir os mesmos alelos, uma vez que eles estariam distribuídos na população. De maneira inversa, se a área dos *campi* tivesse sido colonizada por várias fêmeas (de mesmo haplótipo, porém com diferentes genótipos), então as frequências dos alelos nucleares estariam similarmente distribuídas. Ao observarmos as **figuras 16, 17, 18, 19 e 20** vemos que, para o caso de Ribeirão Preto, os dados corroboram a primeira hipótese. As **figuras 14 a 18** mostram que todos os *loci* têm a presença de poucos alelos (1 a 3) que predominam na população, o que é esperado caso a população do *campus* tenha sido fundada por poucas rainhas que, desde então, possivelmente tenham sido as últimas rainhas a “colonizar” a região. Infelizmente, não possuímos os dados de localização exata (GPS) dos ninhos amostrados dentro do *campus* RP para verificar a distribuição espacial da variabilidade genética (tanto mitocondrial quanto nuclear). Contudo, os dados obtidos com os microssatélites, juntamente com a presença dos três haplótipos mitocondriais e suas respectivas frequências, sugerem que a hipótese mais provável é a de um pequeno número de fêmeas fundadoras no *campus* RP e migração de machos vindos de áreas externas e responsáveis pela variabilidade genética

nuclear. Por outro lado, no caso do *campus* SP, somente os *loci* "Tang57" e "Tang65" (**figuras 23 e 25**) possuem alelos de frequência muito maior que a dos outros na população. Para os demais *loci*, as frequências alélicas estão distribuídas de forma mais homogênea. Isso pode ser devido ao fato do *campus* possuir amostras introduzidas. É provável que esses ninhos tenham produzido machos que acasalaram com fêmeas na região do *campus* e contribuíram para a variabilidade genética nuclear de algumas das colônias da cidade universitária.

5.4 Pequenas populações de *T. angustula* conseguem manter-se isoladas em "ilhas" verdes da cidade?

Mesmo que a diferença entre as diversidades mitocondrial e nuclear das amostras do *campus* possa ser explicada parcialmente por números efetivos populacionais diferentes entre machos e fêmeas, ainda assim a variabilidade mitocondrial das amostras dos dois *campi* foi extremamente pequena, haja visto a comparação com a variabilidade das 20 amostras "naturais". Se hoje a população dos *campi* não pode ser considerada uma pequena população isolada e endogâmica, dado o fluxo gênico via macho que mantém a diversidade nuclear alta, ela parece ser uma pequena população isolada e quase monomórfica de fêmeas (vide **figura 34** resultados).

Tanto o *campus* SP (<http://www.ib.usp.br/ibhistoria/>) quanto o RP (<http://www.ffclrp.usp.br/ffclrp/historico.php>) foram sendo construídos e ampliados desde a década de 1950, ambos em áreas originalmente ocupadas por fazendas. Nos dois casos existiam remanescentes de vegetação nativa, e essa arborização foi mantida à medida que os prédios foram sendo erguidos. Foi nesse contexto que as populações de *T. angustula* dos *campi* devem ter evoluído ao longo das décadas. Não há como saber se

durante os anos de fazenda elas se extinguíram. Caso tenham se mantido, os dados do DNA mitocondrial sugerem que as fêmeas que ali se mantiveram possuíam o mesmo haplótipo e posteriormente se expandiram.

Com base nos resultados de DNA mitocondrial, propusemos duas hipóteses para explicar a baixa diversidade. Contudo, qualquer que seja a hipótese correta, ficam perguntas importantes para entendermos o processo de colonização de novas áreas pelos meliponínios:

1) Caso tenha havido somente uma colonização por poucas rainhas de *T. angustula*, com posterior expansão dessa população, por que novas rainhas não migram para dentro dos limites dos *campi*?

2) Caso a colonização seja contínua, e novos enxames continuem a entrar nessas áreas, por que eles levam tão pouca diversidade genética no DNA mitocondrial, já que essa variabilidade parece ser bastante alta nas populações naturais?

Quaisquer que sejam as respostas, os dados mostram que, do ponto de vista do DNA nuclear, essas populações têm alta diversidade genética e provavelmente estão distribuídas por grandes áreas que vão além dos limites dos *campi*. Por exemplo, as populações dos dois *campi* compartilham alelos de microssatélites entre si e com o grupo de amostras “naturais” (**Tabelas 18-20** em Anexos).

6.0 CONCLUSÕES

1 – Os dados de DNA mitocondrial apontam para a existência de uma forte filopatria em *T. angustula*.

2 – Os dados de microssatélites sugerem que, de fato, os machos de *T. angustula* voem grandes distâncias para acasalar, dessa maneira distribuindo os alelos nucleares pela população.

3 – Sendo assim, é muito provável que pequenas populações locais consigam evitar a endogamia e a produção excessiva de machos diploides através do fluxo gênico via macho.

4 – Ambos os *campi* da USP (SP e RP) possuem características atrativas para as abelhas sem ferrão, e nossos dados sugerem que suas populações de *T. angustula* tenham sido fundadas por poucas fêmeas. Essas populações cresceram demograficamente dentro dos *campi* por conta da abundância de recursos.

7.0 ANEXOS

Tabela 18: Genótipos das amostras do *campus* USP-RP para os seis *loci* analisados, incluindo o Tang17.

Indivíduo	Tang 11		Tang 12		Tang 17		Tang 57		Tang 60		Tang 65	
51	196	198	220	228	169	177	191	195	140	140	196	196
52	184	194	216	222	155	157	156	156	148	150	192	210
53	184	186	200	218	153	157	156	156	150	150	196	196
54	186	196	206	218	157	161	156	156	144	150	192	218
55	184	184	222	222	151	157	156	156	142	148	204	212
56	182	188	218	222	151	153	195	195	138	144	194	216
57	184	184	200	206	157	157	156	156	148	150	190	204
58	184	190	206	216	157	165	156	156	146	150	202	212
59	182	184	216	218	157	159	156	156	140	142	192	194
60	184	186	206	218	159	167	156	203	142	148	194	204
61	182	186	220	220	177	177	156	156	150	154	208	224
62	184	205	220	220	157	165	156	195	148	148	192	224
63	182	205	218	218	157	157	156	156	144	154	194	222
64	184	186	206	218	157	169	156	156	146	146	210	216
65	182	182	200	206	151	159	197	203	148	154	190	190
66	184	184	206	206	157	177	156	156	148	152	194	196
67	182	182	206	220	157	177	156	156	140	150	202	202
68	184	186	206	220	157	157	156	156	140	148	206	222
69	186	186	206	222	169	171	156	158	140	150	194	194
70	198	198	224	230	153	171	156	156	142	144	194	196
71	182	190	200	222	159	171	156	156	140	148	194	210
72	184	186	218	226	157	157	156	156	148	150	194	196
73	182	184	206	216	153	153	156	158	142	148	204	222
74	184	186	198	218	157	171	156	156	138	150	190	206
75	176	182	206	218	157	157	156	156	140	150	192	196
76	184	211	216	220	165	169	156	156	140	148	194	204
77	184	184	206	218	159	171	156	156	142	150	194	210
78	182	184	220	226	153	171	156	156	142	144	194	194
79	182	184	208	218	157	159	156	156	142	148	192	222
80	182	182	218	224	157	159	156	156	148	150	192	192
81	182	184	206	228	153	159	156	156	142	148	190	190
82	182	184	218	228	157	157	156	156	140	150	194	202
83	184	211	218	228	157	169	195	195	142	150	196	196
84	190	207	218	218	165	179	156	156	148	148	194	202
85	188	188	200	228	159	159	195	195	148	148	224	224
86	184	184	200	220	157	177	156	156	150	150	192	202
87	186	194	218	218	157	157	156	156	148	148	194	218
88	184	184	206	218	157	167	156	156	146	148	190	224
89	180	184	206	206	159	163	195	195	148	154	196	202
90	184	188	212	222	163	167	156	195	144	152	222	224
91	190	203	218	226	153	157	156	156	150	154	190	194
92	184	186	206	218	167	167	156	156	142	146	192	192
93	196	209	206	220	153	175	156	156	142	142	194	194
94	182	184	218	228	157	165	156	156	148	148	194	194
95	184	188	200	218	155	175	156	156	144	148	206	224
96	182	184	218	224	157	159	156	156	138	156	192	216
97	182	190	206	220	153	169	156	156	146	150	192	194
98	182	186	200	230	151	153	156	156	150	150	194	210
99	184	186	206	218	157	167	156	195	148	150	192	194
100	184	186	206	220	157	167	156	195	148	150	194	202

Tabela 19: Genótipos das amostras do *campus* USP-SP para os seis *loci* analisados, incluindo o Tang17.

Indivíduo	Tang 11		Tang 12		Tang 17		Tang 57		Tang 60		Tang 65	
1	188	205	222	224	149	161	195	197	143	148	196	196
2	188	190	211	224	159	161	195	195	139	148	196	196
3	178	184	226	226	161	163	195	195	143	152	196	196
4	182	200	207	207	163	163	199	199	137	152	196	196
5	186	200	228	228	169	169	195	195	137	148	190	196
6	180	203	218	224	165	169	191	195	146	150	196	198
7	184	194	207	211	171	173	195	197	131	146	196	196
8	182	190	207	222	161	169	197	203	137	141	190	196
9	200	213	211	214	167	175	201	203	137	152	190	198
10	184	186	214	214	169	175	179	195	139	148	196	198
11	198	200	224	226	161	161	195	195	133	150	196	196
12	186	194	214	220	169	169	191	207	148	148	196	196
13	194	200	226	232	163	163	191	193	139	148	190	192
14	192	196	216	220	161	167	195	197	139	139	190	196
15	184	200	226	226	163	167	197	205	141	152	190	190
16	178	196	214	216	163	167	195	207	148	154	190	196
17	186	186	224	230	161	161	197	199	133	139	194	196
18	184	186	218	230	161	177	199	201	139	139	190	196
19	180	200	222	226	167	171	193	195	139	139	196	196
20	184	184	184	184	163	173	195	197	139	150	196	196
21	196	198	214	216	161	177	195	197	146	146	196	196
22	203	203	226	232	161	169	197	207	141	143	196	196
23	182	205	182	182	161	171	191	207	146	152	192	198
24	184	186	220	220	163	169	191	201	146	152	196	196
25	192	196	228	232	161	163	197	203	135	139	188	194
26	176	176	207	230	149	149	201	201	135	160	196	196
27	196	196	205	224	167	169	193	197	135	143	190	196
28	184	184	220	226	169	169	191	191	152	152	196	196
29	182	200	216	218	163	163	193	195	152	154	196	196
30	209	209	224	230	161	161	191	195	152	152	190	196
31	182	182	211	213	163	173	195	195	137	158	194	198
32	190	207	214	226	161	161	193	197	135	148	190	196
33	194	198	207	218	161	163	195	197	137	148	190	192
34	184	190	218	220	161	167	199	199	133	146	190	190
35	190	200	218	228	161	163	199	205	154	170	190	196
36	184	192	207	228	163	163	195	201	135	139	188	190
37	190	194	211	222	163	163	197	197	148	166	190	196
38	184	194	224	228	163	163	195	195	139	148	190	196
39	184	198	222	226	161	169	193	197	150	150	190	196
40	188	194	214	226	161	169	193	195	150	158	196	196
41	182	196	218	224	163	169	195	199	135	158	196	196
42	182	192	218	220	163	169	195	199	158	158	196	196
43	184	184	230	230	163	171	193	193	135	154	190	196
44	182	192	218	218	169	177	195	199	158	158	196	196
45	198	200	210	210	163	169	199	205	137	139	190	196
46	186	198	210	218	163	163	193	201	152	152	192	196
47	192	194	204	216	149	169	195	197	152	152	190	196
48	182	182	220	220	149	161	191	195	135	147	196	196
49	194	198	192	216	169	169	195	199	135	154	190	196
50	176	194	206	218	149	161	195	199	135	148	192	196

Tabela 20: Genótipos das amostras “naturais” para os seis *loci* analisados, incluindo o Tang17

Indivíduo	Tang11		Tang12		Tang57		Tang60		Tang65	
101	182	220	221	225	198	198	141	153	190	192
102	182	188	211	217	200	204	137	141	196	196
103	182	200	211	211	200	202	139	145	196	196
104	182	194	221	225	202	204	141	141	196	196
105	204	208	211	225	198	200	139	145	196	196
106	182	184	211	227	192	198	139	147	192	192
107	194	200	225	227	192	200	131	161	190	192
108	192	194	211	229	198	200	137	141	196	196
109	182	182	223	225	194	202	151	153	196	196
110	196	222	221	225	202	202	141	151	190	196
111	176	184	209	223	192	194	139	143	188	196
112	196	206	205	209	198	200	135	137	190	190
113	186	198	203	215	196	214	151	159	190	196
114	186	218	205	225	198	200	137	139	188	190
115	194	206	205	235	194	198	135	145	196	198
116	186	192	205	205	202	202	145	151	190	192
117	206	210	205	227	204	208	145	155	196	198
118	186	210	205	207	198	208	147	151	188	196
119	182	192	231	231	200	202	145	147	190	190
120	180	200	227	231	202	206	145	145	190	190

Tabela 20: Matriz de distância molecular entre os pares de haplótipos encontrados, obtida com as sequências de DNA mitocondrial quando considerados os 13 haplótipos das 113 amostras em conjunto.

8.0 REFERÊNCIAS

- Alves, D. A., Imperatriz-Fonseca, V. L., Franco, T. M., Santos-Filho, P. S., Billen, J., Weenseleers, T. (2011). **SUCCESSFUL MAINTENANCE OF A STINGLESS BEE POPULATION DESPITE A SEVERE GENETIC BOTTLENECK.** *Conserv. Genet.*, 12:647-658.
- Arias, M. C., Francisco, F. O., Silvestre, D. **O DNA MITOCONDRIAL EM ESTUDOS POPULACIONAIS E EVOLUTIVOS DE MELIPONÍNEOS** In G. A. R. Melo & I. Alves-dos-Santos, Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure. Editora UNESC, Criciúma, 2003
- 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 POPULATIONS AND EVOLUTIONARY STUDIES OF STINGLESS BEES.** *Apidologie*, 37, 259-274.
- Avice, J. C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., Saunders, N.C., (1987). **INTRASPECIFIC PHYLOGEOGRAPHY: THE MITOCHONDRIAL DNA BRIDGE BETWEEN POPULATION GENETICS AND SYSTEMATICS.** *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18,489–522.
- Avice, J. C. (1994). **MOLECULAR MARKERS, NATURAL HISTORY AND EVOLUTION.** Chapman & Hall, New York (511 pp.).
- Avice, J. C., (2009). **PHYLOGEOGRAPHY: RETROSPECT AND PROSPECT.** *Jour. Of Biogeogr.*, 36, 3-15.
- Avice, J.C., (2000). **PHYLOGEOGRAPHY: THE HISTORY AND FORMATION OF SPECIES.** Harvard University Press, Cambridge.
- Beye, M., Hasselmann, M., Fondrk, M. K., Page, R. E., Omholt, S. W. (2003). **THE GENE CSD IS THE PRIMARY SIGNAL FOR SEXUAL DEVELOPMENT**

- IN THE HONEYBEE AND ENCODES AND SR-TYPE PROTEIN.** *Cell*, 114: 419-429.
- Beye, M. (2004). **THE DICE OF FATE: THE CSD GENE AND HOW ITS ALLELIC COMPOSITION REGULATES SEXUAL DEVELOPMENT IN THE HONEYBEE, *Apis mellifera*.** *BioEssays*, 26: 1131-1139.
- Boore, J. L. (1999). **ANIMAL MITOCHONDRIAL GENOMES.** *Nucleic Acids Res.* 27:1767–1780.
- Brito, R. M. (2005). **ANÁLISE MOLECULAR E POPULACIONAL DE *Partamona mulata* (MOURE IN CAMARGO, 1980) E *Partamona helleri* (FRIESE, 1900) (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI).** São Paulo, USP, 189p. Tese de Doutorado (Biologia Genética). Universidade de São Paulo.
- Brito, R. M., Francisco, F. O., Domingues-Yamada, A. M. T., Gonçalves, P. H. P., Pioker, F. C., Soares, A. E. E., Arias, M. C. (2009). **CHARACTERIZATION OF MICROSATELLITE LOCI OF *Tetragonisca angustula* (HYMENOPTERA, APIDAE: MELIPONINI)** *Conservation Genetics Resources*, 1, 183-187.
- Brown, W. M. (1985). **THE MITOCHONDRIAL GENOME OF ANIMALS.** In “**MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETICS**” (R.J. MacIntyre, Ed.), pp. 95-130, Plenus Press, New York.
- Brown, W.M., George, M.JR., Wilson, A.C. (1979). **RAPID EVOLUTION OF ANIMAL MITOCHONDRIAL DNA.** *Proceedings of the National Academy of SciencesUSA*, 76, 1967-1971.
- Camargo, J. M. F., Pedro, S. R. M. (1992) **SYSTEMATICS, PHYLOGENY, AND BIOGEOGRAPHY OF THE MELIPONINAE (HYMENOPTERA, APIDAE): A MINI-REVIEW.** *Apidologie*, 23, 509-522.

- Cameron, S. A. (1993). MULTIPLE ORIGINS OF ADVANCED EUSOCIALITY IN BEES INFERRED FROM MITOCHONDRIAL DNA SEQUENCES. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8687-8691
- Campos, M. J. O. **ASPECTOS DA FENOLOGIA E SOCIOLOGIA DE *Pereirapis semiauratus* (HYMENOPTERA, HALICTIDAE, AUGOCHLORINI)**. (1980). 189 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1980.
- Castanheira, E. B. **MARCADORES MOLECULARES E SUA UTILIZAÇÃO EM ESTUDOS POPULACIONAIS EM *Tetragonisca angustula* E *Plebeia droryana* (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINAE)**. 1995. 80 f. Tese (Doutorado em Ciências: Genética) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 1995.
- Cook, J. M. (1993). **SEX DETERMINATION IN THE HYMENOPTERA: A REVIEW OF MODELS AND EVIDENCE**. *Heredity*, 71: 421-435.
- Crozier, R. H., Crozier, Y. C., (1993). **THE MITOCHONDRIAL GENOME OF THE HONEYBEE *Apis mellifera*: COMPLETE SEQUENCE AND GENOME ORGANIZATION**. *Genetics*, Vol. 133, 97-117.
- Diniz-Filho, J. A. F. Balestra, R., Rodrigues, F. M., Araújo, E. D. (1998). **GEOGRAPHIC VARIATION OF *Tetragonisca angustula angustula* LATREILLE (HYMENOPTERA) IN CENTRAL AND SOUTHEASTERN BRAZIL**. *Naturalia*, 23, 193-208.
- Ellegren, H. (2004). **MICROSATELLITES: SIMPLE SEQUENCES WITH COMPLEX EVOLUTION**. *Nat. Rev. Genet.* 5:435–445
- Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M., Cornuet, J.M. (1995). **MICROSATELLITE VARIATION IN HONEY BEE (*APIS MELLIFERA* L.) POPULATIONS:**

HIERARCHICAL GENETIC STRUCTURE AND TEST OF THE INFINITE ALLELE AND STEPWISE MUTATION MODELS. *Genetics*, 140, 679-695.

Estoup A., Solignac, M., Cornuet, J. M., Goudet, J. School, A. (1996). **GENETIC DIFERENTIATION OF ISLAND AND CONTINENTAL POPULATIONS OF *Bombus terrestris* (HYMENOPTERA: APIDAE) IN EUROPE. *Mol. Ecol.*, 5, 19-31.**

Excoffier, Laval, L. G., Schneider, S. (2005) **ARLEQUIN VER 3.11: AN INTEGRATED SOFTWARE PACKAGE FOR POPULATION GENETICS DATA *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1:47-50.**

Falcão, T. M. M. A., Contel, E. P. B. (1991a). **GENETIC VARIABILITY IN NATURAL POPULATIONS OF BRAZILIAN SOCIAL BEES. ELETROPHORETIC DATA FOR PGM AND MDH GIVE EVIDENCE FOR MULTIPLE FERTILIZATION IN STINGLESS BEES. *Revista Brasileira de Genética*, 14, 47-59.**

Falcão, T. M. M. A., Contel, E. P. B. (1991b). **GENETIC VARIABILITY IN NATURAL POPULATIONS OF BRAZILIAN SOCIAL BEES. ISOZYME PATTERNS AND POLYMORPHISM FOR ESTERASES AND TOTAL PROTEIN. *Revista Brasileira de Genética*, 13, 731-754.**

Flynn J. J., Nedbal M. A. (1998). **PHYLOGENY OF THE CARNIVORA (MAMMALIA): CONGRUENCE VS. INCOMPATIBILITY AMONG MULTIPLE DATA SETS. *Mol. Phylogenet. Evol.* 9:414-426.**

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). Universidade de São Paulo.**

- Francisco, F. O., Silvestre, D., 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., Brito, R. M., Arias, M. C. (2006). **ALELE NUMBER AND HETEROZIGOSITY FOR MICROSATELLITE LOCI IN DIFFERENT STINGLESS BEE SPECIES (HYMENOPTERA: APIDAE, MELIPONINI).** *Neotropical Entomology*, 35, 638-643.
- Freitas G. S., Soares, A. E. E. (2004). **PROCURAND IRÁ: UM PASSEIO ECOLÓGICO.** Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
- Freitas, G. S., Assis, A. F., Souza, C. C. M., Sousa, J., Soares, A. E. E. (2011). **O DOCE LAR DAS ABELHAS INDIGENAS SEM FERRAO.** Mensagem Doce Online, 100.
- Gempe, T., Hasselmann, M., Schiott, M., Hause, G., Otte, M., Beye, M. (2009). **SEX DETERMINATION IN HONEYBEES: TWO SEPARATE MECHANISMS INDUCE AND MAINTAIN THE FEMALE PATHWAY.** *Plos Biol.*, 7.
- Gonçalves, P. H. P., Francisco, F. O., Brito, R. M., Domingues-Yamada, A. M. T., Pioker, F., Soares, A. E. E., Arias, M. C., (2011). **A SCIENTIFIC NOTE ON THE ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MICROSATELLITE loci OF *Frieseomelitta varia* (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI).** *Apidologie* 40 (5).
- Hall, H.G., Smith, D.R. (1991). **DISTINGUISHING AFRICAN AND EUROPEAN HONEYBEE MATRILINES USING AMPLIFIED MITOCHONDRIAL DNA.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 4248-4552.

- Hartl, D. L., Brown, S. W. (1970). **THE ORIGIN OF MALE HAPLOID GENETIC SYSTEMS AND THEIR EXPECTED SEX RATIOS.** *Theoret. Po. Biol.*, 1,165-190.
- Harrison, R.G. (1989). **ANIMAL MITOCHONDRIAL DNA AS A GENETIC MARKER IN POPULATION AND EVOLUTIONARY BIOLOGY.** *Tree* 4, 6-11.
- Hedrick, P. W., Gadau, J., Page, R. E., (2006). **GENETIC SEX DETERMINATION AND EXTINCTION.** *Trends in Ecol. & Evo.* 21: 55-57.
- Hillis, D. M., Moritz, C., Mable, B. K. (1996). **MOLECULAR SYSTEMATICS.** 2nd edn. Sinauer Associates Inc., Massachusetts. 655p.
- Janzen, D. H. (1980). **ECOLOGIA VEGETAL NOS TRÓPICOS.** São Paulo, EDUSP, 79p.
- Kerr, W. E. (1975). **EVOLUTION OF THE POPULATION STRUCTURE IN BEES.** *Genetics*, 79, 74-84.
- Kerr, W. E; Vencovsky, R. (1982). **MELHORAMENTO GENÉTICO EM ABELHAS I. EFEITO DO NÚMERO DE COLÔNIAS SOBRE O MELHORAMENTO.** *Brazilian. Journal of Genetics.* v. 5, p. 279-285.
- Kerr, W. E., Carvalho, G. A., Nascimento, V. A. (1996). **A ABELHA URUÇU: BIOLOGIA, MANEJO E CONSERVAÇÃO.** Fundação Acangáu, Belo Horizonte-MG. 143p.
- Kerr, W. E. 1996. **BIOLOGIA E MANEJO DA TIÚBA: A ABELHA DO MARANHÃO.** EDUFMA. São Luis, MA. 156pp.
- Kerr, W. E. (1997). **SEX DETERMINATION IN BEES (APINAE AND MELIPONINAE) AND ITS CONSEQUENCES.** *Braz. Jour. Of Gen.* 20: 601-611.

- Koling, D. F., Moretto, G. (2010). **MITOCHONDRIAL DISCRIMINATION OF STINGLESS BEES *Tetragonisca angustula* (APIDAE: MELIPONINI) FROM SANTA CATARINA STATE, BRAZIL.** *Apidol.*, 41: 454-462.
- Librado, P., Rozas, J. 2009. **DNASP V5: A SOFTWARE FOR COMPREHENSIVE ANALYSIS OF DNA POLYMORPHISM** *Bioinformatics*, 25, 1451-1452. | doi: 10.1093/bioinformatics/btp187.
- Lopes, D. M., Silva, F. O., Salomão, T. M. F., Campos, L. A. O., Tavares, M. G. (2009). **MICROSATELLITE LOCI FOR THE STINGLESS BEE *Melipona rufiventris* (HYMENOPTERA, APIDAE).** *Mol Ecol Res* 9:923-925.
- Machado, M. F. P. S. (1982). **ISOENZIMAS DA DESIDROGENASE MÁLICA EM ABELHAS DO GÊNERO *Plebéia*: CONTROLE GENÉTICO E DADOS POPULACIONAIS.** Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 198 p.
- Malagodi-Braga, K. S., Kleinert, A. M. P. (2004). **COULD *Tetragonisca angustula* (APINAE, MELIPONINI LATREILLE BE USED AS A STRAWBERRY POLLINATOR IN GREENHOUSES?** *Aust. J. of Agrc. Res.*, 55, 771-773.
- Michener, C. D. (2007). **THE BEES OF THE WORLD.** The John Hopkins University Press, 2nd edition. 952p.
- Melo, G. A. R., Buschini, M. L. T., Campos, L. A. O. (2001). **OVARIAN ACTIVATION IN *Melipona quadrifasciata* QUEENS TRIGGERED BY MATING PLUG STIMULATION (HYMENOPTERA, APIDAE).** *Apidol.* 32: 355-361.
- Moreno-Eleure, F. A., Cardozo, B. A. F. (1996). **CHARACTERIZATION ON STINGLESS BEE COLONIES *Trigona (tetragonisca) angustula* IN URBAN CONSTRUCTIONS AT GUANARE, VENEZUELA.** *Revista Unellez de Ciencia y Tecnologia*, 14,, 55-63.

- Morgado, L. N. *et al.* (2002). **FAUNA DE ABELHAS (HYMENOPTERA: APOIDEA) NAS FLORES DE GIRASSOL *Helianthus annuus* L., EM LAVRAS-MG.** *Ciência e Agrotecnologia*, 26, 1167-1177.
- Moritz, C., Dowling, T. E., Brown, W. M. (1987). **EVOLUTION OF ANIMAL MITOCHONDRIAL DNA. RELEVANCE FOR POPULATION BIOLOGY AND SYSTEMATICS.** *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18, 269-292.
- Moure, J. M., Urban, D., Melo, G. A. R. (2007). **CATALOGUE OF BEES (HYMENOPTERA, APOIDEA) IN THE NEOTROPICAL REGION.** Curitiba, Sociedade Brasileira de Entomologia. 1058p.
- Nogueira-Neto, P. (1951). **STINGLESS BEES AND THEIR STUDY.** *Bee World*, 32, 73-76.
- Nogueira-Neto, P. (1970). **A CRIAÇÃO DE ABELHAS INDÍGENAS SEM FERRÃO.** 2. ed. Tecnapis, 365 p.
- Nogueira-Neto, P. (1997). **VIDA E CRIAÇÃO DE ABELHAS INDÍGENAS SEM FERRÃO.** Editora Nogueirapis. São Paulo, SP. 445 p.
- Nogueira-Neto, P. (2000). **UMA CONVERSA SOBRE FRAGMENTOS FLORESTAIS, PEQUENAS POPULAÇÕES E ABELHAS** In: IV Encontro sobre Abelhas, Ribeirão Preto. *Anais do IV Encontro sobre Abelhas*, 4, 27-34.
- Nogueira-Neto, P. (2002). **IMBREEDING AND BUILDING UP A SMALL POPULATION OF STINGLESS BEES.** *Revista Brasileira de Zoologia*, 19 , 1181-1214.
- Oliveira, R. C. *et al.* (2004). **GENETIC DIVERGENCE IN *Tetragonisca angustula* LATREILLE, 1811 (HYMENOPTERA, MELIPONINAE, TRIGONINI) BASED ON RAPD MARKERS.** *Genetics and Molecular Biology*, 27, 181-186.
- Parker, P. G., Snow, A. A., Schung, M. D., Booton, G. C., Furest, P. A. (1998). **WHAT**

MOLECULES CAN TELL US ABOUT POPULATIONS: CHOOSING AND USING A MOLECULAR MARKER. *Ecology*, 79, 361-382.

Paty, C. M. L. **JATAÍ – CARACTERÍSTICAS GERAIS.** Disponível em: <<http://paty.guiliani.vilabol.uol.com.br/jatai.htm>>. Acesso em: 01 out. 2011.

Paxton, R. J., Weißschuh, N., Quezada-Euán, J. J. G., (1999). **CHARACTERIZATION OF DINUCLEOTIDE MICROSATELLITE LOCI FOR STINGLESS BEES.** *Mol. Ecol.* 8: 690-692.

Peters, J. M., Queller, D. C.; Imperatriz-Fonseca, V. L., Strassmann, J. E. (1998). **MICROSATELLITE LOCI FOR STINGLESS BEES.** *Mol. Ecol.* 7: 787-787.

Raymond M., Rousset, F. (1995). **GENEPOP (VERSION 1.2): POPULATION GENETICS SOFTWARE FOR EXACT TESTS AND** *Jour. Heredity*, 86:248-249.

Rosenberg, N. A., NORDBORG, M. (2002). **GENEALOGICAL TREES, COALESCENT THEORY AND THE ANALYSIS OF GENETIC POLYMORPHISMS.** *Nature Reviews Genetics*, 3, 380-390.

Roubik, D. W. (1989). **ECOLOGY AND NATURAL HISTORY OF TROPICAL BEES.** Cambridge, Cambridge University Press. 514p.

Ruttner, F. (1988). **BIOGEOGRAPHY AND TAXONOMY OF HONEYBEES.** Springer-Verlag, Berlin. 284p.

Silveira, F. A., Melo, G. A. R., Almeida, E. A. B. (2002). **ABELHAS BRASILEIRAS – SISTEMÁTICA E IDENTIFICAÇÃO.** Editora Composição e Arte, Minas Gerais, Brasil. 1ª edição. Pg 86.

Silvestre, D. (2002). **SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DO GENOMA MITOCONDRIAL DE *Melipona bicolor* (HYMENOPTERA, APIDAE,**

- MELIPONINI**). São Paulo, USP, 119p. Tese de Doutorado (Biologia Genética). Universidade de São Paulo.
- Simon, C.; Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P. (1994). **EVOLUTION, WEIGHTING, AND PHYLOGENETIC UTILITY OF MITOCHONDRIAL GENE SEQUENCES AND A COMPILATION OF CONSERVED POLYMERASE CHAIN REACTION PRIMERS.** *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 651-701.
- Schuelke, M. (2000). **AN ECONOMIC METHOD FOR THE FLUORESCENT LABELING OF PCR FRAGMENTS.** *Nature Biotechnology*, 18, 233-234.
- Strassmann, J. E., Solís, C. R., Peters, J. M., 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**” (J.D. Ferraris e S.R. Palumbi, Eds.), pp. 163-178, 528-549, Wiley-Liss, Inc, New York.
- Stuchi, A. L. P. B. (2006). **ESTRUTURA DE POPULAÇÕES EM ABELHAS JATAÍ (*Tetragonisca angustula* Latreille) POR MEIO DE IZOENZIMAS.** Maringá, PR. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007). **MEGA4: MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETICS ANALYSIS (MEGA) SOFTWARE VERSION 4.0.** *Mol.Biol. and Evol.* 24, 1596-1599.
- Templeton, A. R. (2006). **POPULATION GENETICS AND MICROEVOLUTIONARY THEORY.** John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ. 704p.
- Velthuis, H. H. W. (1997). **A BIOLOGIA DAS ABELHAS SEM FERRÃO.** USP e Universiteit Utrecht. São Paulo – SP.

- Walsh, P.S., Metzger D.A., Higuchi, R. (1991). **CHELEX 100 AS A MEDIUM FOR SIMPLE EXTRACTION OF DNA FOR PCR-BASED TYPING FROM FORENSIC.** *Biotechniques*, 10, 506-513.
- Warrior, D., & Gall, J. (1985). **THE MITOCHONDRIAL DNA OF *Hydra attenuata* AND *Hydra littoralis* CONSISTS OF TWO LINEAR MOLECULES.** *Arch. Sci. Geneva* 38: 439-445.
- Wolstenholme, D. R. (1992). **ANIMAL MITOCHONDRIAL DNA: STRUCTURE AND EVOLUTION.** Academic Press, New York.
- Woyke, J. (1963). **REARING AND VIABILITY OF DIPLOID DRONE LARVAE.** *Journ. Of Apic. Res.*, 2:77-84.
- Woyke, J. (1980). **EFFECT OF SEX-ALLELE HOMO-HETEROZIGOTY ON HONEY BEE COLONY POPULATIONS AND THEIR HONEY PRODUCTION. FAVORABLE DEVELOPMENT CONDITIONS AND UNRESTRICTED QUEENS.**] *Journal of Apicultural Research*, 19, 51-63.
- Yokoyama, S., Nei, M. (1979). **POPULATION DYNAMICS OF SEX-DETERMINING ALLELES IN HONEY BEES AND SELF-INCOMPATIBILITY ALLELES IN PLANTS.** *Population. Genetics*, 91, 609-926.
- Zayed, A., Roubik, D., Packer, L. (2004). **USE OF DIPLOID MALE FREQUENCY DATA AS AN INDICATOR OF POLLINATOR DECLINE.** *Proc. R. Soc. Lond.* 271: S9-S12.