

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Melipona quadrifasciata*
anthidioides (HYMENOPTERA, APIDAE) NA REGIÃO
SEMIÁRIDA DA BAHIA**

LARISSA SILVA SOUZA

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
MAIO - 2014**

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Melipona quadrifasciata*
anthidioides (HYMENOPTERA, APIDAE) NA REGIÃO
SEMIÁRIDA DA BAHIA**

LARISSA SILVA SOUZA

Engenheira Agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

Coorientadora: Profa. Dra. Geni da Silva Sodré

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

M641

Souza, Larissa Silva

Variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae) na região Semiárida da Bahia / Larissa Silva Souza - Cruz das Almas, BA, 2014.

40f.; il. tab.. graf.

Orientador: Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

Coorientador: Geni da Silva Sodré

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1. Abelha - criação. 2. Abelha – melhoramento genético. 3. Abelha - meliponicultura. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD 638.1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
LARISSA SILVA SOUZA

Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
(Orientador)

Prof. Dra. Soraia Barreto Aguiar Fonteles
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

Prof. Dra. Ana Maria Waldschmidt
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-UESB

Homologada em / /

*As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu.
Devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e
sonhamos. Tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.*

(Paulo Beleki)

A minha amada família e amigos

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado;

A minha família, principalmente aos meus pais Lourival Souza e Sônia Dias, aos irmãos Júnior e Lorena, pelo amor e carinho - os pilares desta conquista;

Ao meu noivo Rafael, pela dedicação, companheirismo, paciência e amor durante minha caminhada;

Ao Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho pelo compromisso com a ciência, competência profissional, disposição e paciência no processo de orientação desde a época de iniciação científica até os dias atuais;

A Coorientadora Profa. Dra. Geni da Silva Sodré pelo profissionalismo, entusiasmo e contribui es durante a minha trajetória acad mica;

Aos professores Dr. Eddy Oliveira e Dra. Ana Maria Waldschmidt pela seriedade científica e grande ajuda na realiza o das análises moleculares;

Aos colegas do Grupo Insecta, pelos momentos agradáveis que tornaram a realiza o deste trabalho muito mais prazerosa, além da gratificante amizade fundamentada na união de todos e objetivos em comum;

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular da UESB - Jequi , em especial ao Marcos Canário, S mela e Anistela, pelo apoio no desenvolvimento dos trabalhos;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho;

A CAPES pela concessão da bolsa durante todo o período do curso.

A FAPESB pelo apoio financeiro ao Pedido N  7353/2009, Temo de Outorga PPP0064/2010.

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO01

CAPÍTULO 1

Diversidade genética de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae) na região semiárida da Bahia09

CAPÍTULO 2

Estudo da variabilidade genética entre gerações de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae) submetida à criação racional27

CONSIDERAÇÕES FINAIS40

VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Melipona quadrifasciata anthidioides* (HYMENOPTERA, APIDAE) NA REGIÃO SEMIÁRIDA DA BAHIA

Autor: Larissa Silva Souza

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

RESUMO: As abelhas indígenas sem ferrão estão entre os principais polinizadores da flora brasileira. A criação racional de abelhas sociais sem ferrão ou meliponicultura surge como uma atividade que atende aos princípios de sustentabilidade promovendo diversificação agrícola e aproveitamento dos recursos naturais de forma viável. No entanto, muitas espécies estão seriamente ameaçadas de extinção em consequência da perda do hábitat e isolamento, causados principalmente pelo desmatamento, uso indiscriminado de defensivos agrícolas e grandes queimadas. O conhecimento da biodiversidade de determinadas espécies e populações é uma ferramenta básica para a sua conservação. A abelha mandaçaia (*Melipona quadrifasciata anthidioides*) ocupa lugar de destaque entre os meliponíneos para a criação e produção de mel. O presente estudo teve como analisar a diversidade genética de *Melipona quadrifasciata anthidioides* no estado da Bahia. Foram analisadas colônias provenientes das regiões de distribuição da espécie, onde posteriormente foram manejadas racionalmente no intuito de avaliar a variabilidade genética entre as gerações Parental, F1 e F2. Tal diversidade genética foi verificada por meio de análise molecular utilizando marcadores microssatélites. Ao final deste estudo, verificou-se alta variação genética, evidenciando um alto fluxo gênico entre as populações nos locais de estudo. Quando submetidas à criação racional em meliponários, esta diversidade genética foi mantida, não havendo a perda da variabilidade genética ou endogamia e ausência de diferenciação populacional ao longo das gerações analisadas.

Palavras-chaves: Abelhas sem ferrão; diversidade genética; mandaçaia.

GENETIC VARIABILITY OF *Melipona quadrifasciata anthidioides* (HYMENOPTERA, APIDAE) IN THE SEMIARID REGION OF BAHIA

Author: Larissa Silva Souza

Advisor: Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

ABSTRACT: The indigenous stingless bees are major pollinators of flora. The rational creation of social stingless bees or beekeeping emerges as an activity that meets the principles of sustainability by promoting agricultural diversification and exploitation of natural resources in a viable manner. However, many species are seriously endangered as a result of loss of habitat and isolation, mainly caused by deforestation, indiscriminate use of pesticides and large fires. The knowledge of the biodiversity of certain species and populations is a basic tool for their conservation. The mandaçaia bee (*Melipona quadrifasciata anthidioides*) occupies a prominent place among stingless bees for the creation and production of honey. The present study was to analyze the genetic diversity of *Melipona quadrifasciata anthidioides* in the state of Bahia. Colonies from regions of the species, which subsequently were managed rationally in order to assess the genetic variability among Parental, F1 and F2 generations were analyzed. Such genetic diversity was verified by molecular analysis using microsatellite markers. At the end of this study, there was high genetic variation, indicating a high gene flow between populations in the study sites. When subjected to rational creation in meliponary this genetic diversity was maintained, with no loss of genetic variability or inbreeding and lack of population differentiation across generations analyzed.

Keywords: Stingless Bees; genetic diversity; mandaçaia bees.

INTRODUÇÃO

As abelhas da subfamília Meliponinae (Hymenoptera, Apidae), também conhecida como abelhas indígenas sem ferrão ou meliponíneos, são abelhas sociais encontradas em regiões tropicais e subtropicais do mundo (MICHENER, 2007). Estas abelhas encontram-se subdivididas em duas tribos: Meliponini, formada apenas pelo gênero *Melipona*, que é encontrado exclusivamente na região Neotropical (América do Sul, Central e Ilhas do Caribe) e Trigonini, que agrupa grande número de gêneros e está distribuída em toda a área de distribuição da subfamília (CAMPOS e PERUQUETTI, 1999).

Dos 56 gêneros válidos, 33 são exclusivamente neotropicais, com 417 espécies descritas (CAMARGO e PEDRO, 2013). No Brasil, são descritas cerca de 300 espécies de meliponíneos, caracterizadas pela sua elevada diversidade de formas, tamanhos e hábitos de nidificação (CAMPOS & PERUQUETTI, 1999; KERR, 1998).

O gênero *Melipona* tem o maior número de espécies, cerca de 70 (MOURE et al., 2007), e pode ser encontrado em toda a região Neotropical, do México à Misiones, Argentina, com maior diversidade na bacia do Amazonas (CAMARGO E PEDRO, 1992, SILVEIRA et al., 2002). No Estado da Bahia destacam-se três espécies de melíponas: a uruçú (*Melipona scutellaris*) e duas mandaiaias (*Melipona quadrifasciata* e *Melipona mandacaia*), consideradas como produtoras de mel, pólen, além da produção de enxames para meliponários (CARVALHO et al. 2003).

A abelha *Melipona quadrifasciata* Lep., conhecida popularmente como "mandaiaia" é subdividida em duas subespécies: *Melipona quadrifasciata anthidioides* e *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*. A subespécie *M. q.*

quadrifasciata é encontrada nos estados do sul (São Paulo, Paraná e Santa Catarina) (MOURE & KERR, 1950), enquanto que a subespécie *M. q. anthidioides* pode ser encontrada desde o nordeste do estado de São Paulo até o extremo norte da Chapada Diamantina, na Bahia, estendendo-se a oeste até Minas Gerais e ao centro de Goiás (BATALHA-FILHO et al., 2009). Na Bahia pode ser encontrada em quase todo o estado sendo a região semiárida, por motivos climáticos e florísticos, a predominante desta espécie (NUNES, 2013).

As populações com um padrão morfológico semelhante a *M. q. quadrifasciata* foram relatadas no norte de Minas Gerais, Sergipe e nordeste da Bahia (BATALHA-FILHO et al., 2009). No entanto, as abelhas do norte de Minas Gerais e nordeste da Bahia e Sergipe, diferem geneticamente de *M. q. quadrifasciata* e são semelhantes a *M. q. anthidioides*. Waldschmidt et al. (2000), por exemplo, ao estudar estas duas subespécies de *Melipona*, detectou um marcador RAPD em indivíduos de Januária (Norte de Minas Gerais), que estava presente em *M. q. anthidioides*, mas ausente em *M. q. quadrifasciata*. Da mesma forma, Batalha-Filho et al. (2009), com base em análise de PCR -RFLP do gene COI, mostrou similaridade genética entre *M. q. quadrifasciata* e *M. q. anthidioides* do norte de Minas Gerais, Bahia e Sergipe Nordeste, ambos com um padrão morfológico semelhante ao de *M. q. quadrifasciata*.

As abelhas pertencentes a tribo Meliponini são elementos importantes para o meio ambiente, principalmente no que se refere a sua atuação nos ecossistemas como agentes polinizadores. Estima-se que cerca de mais de 60% das culturas vegetais tropicais são polinizadas por abelhas sem ferrão (BROSI, 2009). Em termos econômicos, sabe-se que a polinização mediada por estas abelhas vem contribuindo com bilhões de dólares para a economia tropical (RICKETTS et al., 2008). Além disso, a criação racional destas abelhas contribui para o aumento da renda familiar, por meio da comercialização dos seus subprodutos e serviços.

Apesar da importância ecológica e econômica dos meliponíneos em geral, algumas espécies vêm sofrendo redução populacional. Vários fatores têm sido apontados para o agravamento desta situação, dentre eles, a degradação e desmatamento de florestas, uso indiscriminado de defensivos agrícolas, queimadas e ações de meleiros (LAUTENBACH et al., 2012), além

da escassa difusão de informações sobre a criação e manejo destas espécies. Ademais, a redução da diversidade de abelhas pode ser acompanhada pela perda de muitas espécies de plantas que dependem delas para polinização (LA SALLE e GAULD, 1993).

Marcadores moleculares aplicados ao estudo de abelhas

Os marcadores moleculares são ferramentas que podem diferenciar dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998). Estes oferecem a possibilidade de acessar o genótipo do indivíduo e diferenciam-se basicamente pela tecnologia utilizada para revelar a variabilidade presente no DNA, bem como pela habilidade em detectar diferenças entre indivíduos, pelo custo, pela facilidade de uso, pela consistência e pela repetibilidade (MILACH, 1998). Do ponto de vista molecular, a variação genética, denominada polimorfismo, é o resultado de mudanças espontâneas no DNA genômico que podem ser mensuradas por meio de diferentes técnicas moleculares (LEÓN E JONES, 2005).

Até a metade da década de 1960 as análises populacionais eram baseadas em características fenotípicas, sendo as análises morfométricas responsáveis pela maioria dos estudos de filogenia, taxonomia e sistemática das abelhas Apidae (MORESCO, 2009). Os recentes avanços na biologia molecular abriram novas perspectivas para a pesquisa em conservação de espécies, genética de populações, filogeografia e taxonomia, por meio da utilização de marcadores moleculares. Podem ser divididos em dois tipos, aqueles baseados em enzimas (isoenzimas e aloenzimas) e naqueles baseados em ácidos nucleicos (marcadores de DNA).

Dentre os vários tipos de marcadores moleculares, os baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), tais como: RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), RFLP (digestão do DNA com enzimas de restrição), ISSR (intersequência de repetição simples), e SSR (sequência de repetição simples), são os que têm demonstrado eficiência em estudos de genética de populações (MIRANDA, 2012).

Em estudos com abelhas, um dos primeiros trabalhos foi realizado por Mestriner (1969), onde se verificou a variabilidade alélica em locos isoenzimáticos em amostras de *Apis mellifera ligustica* introduzidas no Brasil. Berezovskaya et al. (2002) detectaram variação genética interespecífica em cinco espécies do gênero *Bombus*, demonstrando assim que o marcador ISSR poderia ser útil para ajudar a elucidar os problemas ligados à sua classificação taxonômica. Paplauskiené et al. (2006) detectou marcadores ISSR específicas para a subespécie *Apis mellifera carnica* e *Apis mellifera caucasica* que permitiu a diferenciação genética entre as duas subespécies.

Dentre os marcadores de DNA, os microsatélites são caracterizados por serem repetições de sequências simples (SSR) em regiões do genoma constituído por sequências de repetição curtas que consiste de um a seis nucleótidos (HANCOCK, 1999). Como apresentam alto grau de polimorfismo, expressão codominante, presença abundante em todo o genoma e relativa facilidade de execução técnica, os microsatélites têm sido bastante utilizados e considerados os marcadores ideais para estudos genéticos de populações de insetos (FRANCISCO et al., 2006). A principal limitação da técnica é a escassez de loci sequenciados e sequência de primers disponíveis na literatura para alguns grupos de organismos, a grande quantidade de trabalho necessário para o desenvolvimento prévio de marcadores e elevado custo deste desenvolvimento (MATIOLI, 2001).

Para os estudos de abelhas os primeiros trabalhos foram realizados para o desenvolvimento de primers microsatélites para abelhas *A. mellifera* e *Bombus terrestris*, descritos por Estoup et al. (1993) e, em 1995, estes “primers” começaram a ser utilizados para estudar a estrutura genética de populações destes organismos, bem como para outras espécies de abelhas. Já para abelhas da tribo Meliponini, os primeiros microsatélites foram descritos para a espécie *Melipona bicolor* (PETTERS et al., 1998). Em virtude da inexistência de primers microsatélites específicos para a maioria das espécies do gênero *Melipona*, Viana et al. (2011) testaram a transferabilidade de 49 loci microsatélites para as espécies *M. scutellaris*, *M. mondury*, *M. mandacaia* e *M. quadrifasciata*.

A partir de então, os marcadores microsatélites vêm sendo utilizados para os mais diversos estudos genético-populacionais de abelhas. A poliandria em *M. scutellaris* foi confirmada por meio da análise de sete locos, demonstrando que a rainha desta espécie acasala com mais de um macho (SOARES, 2001). Francisco et al. (2006) utilizando primers heterólogos, analisaram o número de alelos e heterozigosidade para loci microsatélites em *Plebeia remota*, *Partamona mulata*, *P. helleri*, evidenciando um déficit de heterozigotos. Lopes et al. (2010) verificaram o aumento de heterozigosidade observada e esperada e o número de alelos, comparado a diversidade genética entre primers espécie-específicos e heterólogos em populações de *M. rufiventris*, *M. mondury* em Minas Gerais.

Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo, conhecer a diversidade genética de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, por meio de marcadores microsatélites, visando à obtenção e disponibilização de novas informações sobre a biologia, ecologia e genética desta abelha sem ferrão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATALHA-FILHO H., MELO G. A. R.; WALDSCHMIDT, A. M.; CAMPOS, L. A. O.; FERNANDES-SALOMÃO, T. M. Geographic distribution and spatial differentiation in the color pattern of abdominal stripes of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae), **Zoologia**, v.26, p.213–219, 2009.
- BEREZOVSKAYA, O. P.; MOROZ, O. Y.; SIDORENKO, A. P. Intra-and interspecific differences in ISSR-PCR characteristics of Bumble bees (Hymenoptera, Bombinae), **Cytology and Genetics**, v.36, p.25–31, 2002.
- BROSI, B. J. The complex responses of social stingless bees (Apidae: Meliponi) to tropical deforestation. **Forest Ecology and Management**, v.258, p.1830-1837, 2009.
- CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini review. **Apidologie**, v.23, p.509-522, 1992.

- CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. In: Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em 22 de setembro de 2013.
- CAMPOS, L. A. O.; PERUQUETTI, R. C. **Biologia e criação de abelhas sem ferrão**. Viçosa: Conselho de Extensão. Universidade Federal de Viçosa, Informe Técnico, Ano 20, n.82. 1999. 36p.
- CARVALHO, C. A. L.; ALVES, R. M. O.; SOUZA B. A. **Criação de abelhas sem ferrão: aspectos práticos**. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI, 2003. 42 p. (Série Meliponicultura – 01).
- ESTOUP, A.; SOLIGNAC, M.; HARRY, M. et al. Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 6, p. 1427-1431, 1993.
- ESTOUP, A.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M. et al. Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. **Genetics**, v.140, p.679–695, 1995.
- FERREIRA, E. M.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3º ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 56p.
- FRANCISCO, F. O.; BRITO, R. M.; ARIAS, M. C. Allele number and heterozygosity for microsatellite loci for an endemic stingless bee *Melipona seminigra merrillae* (Apidae, Meliponini). **Neotropical Entomology**, v.35, n.5, p.638-643, 2006.
- HANCOCK, J. M. Microsatellites and other simple sequences: Genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER, C. (eds) **Microsatellites: Evolution and Applications**. Oxford University Press, New York, p. 1-9, 1999.
- KERR, W. E. **As abelhas e o meio ambiente**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 12. 1998, Salvador, BA. Anais... Salvador: 1998. p. 27-30.
- LA SALLE, J.; GAULD, I. D. Hymenoptera: Their diversity and their impact on the diversity of other organisms. In: La Salle J, Gauld ID (Eds.). **Hymenoptera and Biodiversity**. 1993. 348 p.

- LAUTENBACH, S.; SEPPELT, R.; LIEBSCHER, J.; DORMANN, C. F. Spatial and Temporal Trends of Global Pollination Benefit. **Plos One**, v.7, n.15, 2012.
- LEÓN, J. H.; JONES, W. A. Genetic differentiation among geographic populations of *Gonatocerus ashmeadi*, the predominant egg parasitoid of the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca coagulate*. **Journal of Insect Science**, v.5, n.2, 2005.
- LOPES, D. M.; SILVA, F. O.; SALOMÃO, T. M. F.; CAMPOS, L. A. O.; TAVARES, M. A scientific note on the characterization of microsatellite loci for *Melipona mondury* (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie**, v.41, p.138-140, 2010.
- MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 202p. 2001.
- MICHENER, C. D. **The bees of the world**, 2^a ed. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, 2007. 953p.
- MILACH, S. C. K. **Marcadores Moleculares em plantas**/editado por Sandra Cristina Kothe Milach.-Porto Alegre. 141p, 1998.
- MIRANDA, E. A. **Diversidade e estrutura genética de *Melipona mandacaia* SMITH 1863 (HYMENOPTERA, APIDAE)**. Dissertação (Mestrado em Genética, Biodiversidade e Conservação). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2012. 63p.
- MORESCO, A. R. C. **Análise populacional de *Melipona marginata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de RFLP do DNA mitocondrial e microssatélites**. Dissertação de mestrado, São Paulo: Universidade de São Paulo, 2009.
- MOURE, J. S.; KERR, W. E. Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apoidea). **Dusenya**, v.12, p.105-129, 1950.
- MOURE, J. S., URBAN, D.; MELO, G. A. R. **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**. Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba, 2007.
- NUNES, L. A.; PASSOS, G. B.; CARVALHO, C. A. L.; ARAUJO, E. D. Size and shape in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera; Meliponini). **Brazilian Journal of Biology**, v.73, n.4, p. 887-893, 2013.

- PAPLAUSKIENÉ, V.; CEKSTERYTE, V.; PAPLAUSKIENÉ, I.; TAMASAUSKIENE, D.; RACYS, J. The use of ISSR for the assessment of genetic diversity. **Biologija**, v.3, p.16–20, 2006.
- PETERS, J. M.; QUELLER, D. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; STRASSMANN, J. E. Microsatellite loci for stingless bees. **Molecular Ecology**, v.7, p.784–787, 1998.
- RICKETTS, T. H.; REGETZ, J.; DEWENTER, I. S.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; BOGDANSKI, A.; GEMMILL-HERREN, B.; GREENLEAF, S. S. KLEIN, A. M.; MAYFELD, M. M.; MORANDIN, L. A.; OCHIENG, A.; VIANA, B. F. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecology Letters**, v.11, p.499–515, 2008.
- SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Brazilian bees, Systematics and Identification**. Fundação Acangaú, Belo Horizonte, 2002. 253p.
- SOARES, K. **O uso de marcadores microssatélites no estudo de acasalamento em *Melipona scutellaris***. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 2001. 49p.
- VIANA, M. V. C.; MIRANDA, E. A.; FRANCISCO, A. K.; CARVALHO C. A. L. de; WALDSCHMIDT, A. M. Transferability of microsatellite primers developed for stingless bees to four other species of the genus *Melipona*. **Genetics and Molecular Research**, v.10, n.4, p.3942-3947, 2011.
- WALDSCHMIDT, A. M.; BARROS, E. G.; CAMPOS, L. A. O. A molecular marker distinguishes the subspecies *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) **Genetic and Molecular Biology**, v.3, p.609–611, 2000.

CAPÍTULO 1

Diversidade genética de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae) na região semiárida da Bahia ¹

¹ Artigo a ser ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Neotropical Entomology.

Diversidade genética de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae) na região semiárida da Bahia

RESUMO: As abelhas sem ferrão são encontradas em regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo o Brasil um dos principais locais de ocorrência. Estas abelhas têm sua importância na polinização de culturas e produção de mel. Os estudos moleculares têm possibilitado o estudo, caracterização e monitoramento de diversas espécies de meliponíneos. O presente trabalho objetivou conhecer a diversidade genética de *Melipona quadrifasciata anthidioides* em sua área de ocorrência, no estado da Bahia. As amostras foram coletadas em diferentes cidades do estado da Bahia e analisadas por meio da utilização dos marcadores microssatélites Mbi232, Mbi233, Mbi254, Mru14 e Mquad19. O número médio de alelos por locos da população em estudo foi 4,2, variando entre 2 e 10. A heterozigosidade média observada (H_o) entre as populações variou de 0,4 e 0,77 e a heterozigosidade média esperada (H_e) variou entre 0,32 e 0,53. A AMOVA mostrou que 6% da variação genética está entre as populações e 94% dentro das populações, evidenciando um alto fluxo gênico entre as populações, justificado pela proximidade entre os locais amostrados neste estudo.

Palavras-chaves: Abelhas sem ferrão; diversidade; mandaçaia.

Genetic diversity of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae) in the semiarid region of Bahia

ABSTRACT: The stingless bees are found in tropical and subtropical regions of the world, with Brazil being one of the main places of occurrence. These bees have their importance in crop pollination and honey production. Molecular studies have allowed the study, characterization and monitoring of several species of stingless bees. This study aimed to investigate the genetic diversity of *Melipona quadrifasciata anthidioides* in its range in the state of Bahia. The samples were collected in different cities in the state of Bahia and analyzed by using microsatellite markers Mbi232, Mbi233, Mbi254, Mru14 and Mquad19. The average number of alleles per locus of the study population was 4.2, ranging between 2 and 10. The average observed heterozygosity (H_o) between populations ranged from 0.4 to 0.77 and the mean expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.32 to 0.53. The AMOVA showed that 6% of the genetic variation among populations and 94% within populations, indicating a high gene flow between populations, explained by the proximity of the sites sampled in this study.

Keywords: Stingless bees; diversity; "Mandacaia" Bee.

INTRODUÇÃO

As abelhas da subfamília Meliponinae (Hymenoptera, Apidae), conhecidas como “abelhas indígenas sem ferrão” ocupam grande parte das regiões de clima tropical e temperado subtropical do planeta (NOGUEIRA-NETO, 1997). Atualmente são descritas cerca de 600 espécies de meliponíneos, distribuídas em 56 gêneros, em áreas tropicais e subtropicais (COTORPASSI-LAURINO et al., 2006).

No Brasil concentra-se grande parte das espécies conhecidas, dentre estas, a abelha mandaçaia (*Melipona quadrifasciata anthidioides*), que possui ampla distribuição e importância em todo o território nacional, podendo ser encontrada desde o nordeste do estado de São Paulo até o extremo norte da Chapada Diamantina, na Bahia, estendendo-se a oeste até Minas Gerais e ao centro de Goiás (BATALHA-FILHO et al., 2009). No estado da Bahia, pode ser encontrada em quase todo o estado sendo a região semiárida, por motivos climáticos e florísticos, a predominante desta espécie (NUNES et al., 2013).

As abelhas sem ferrão destacam-se dentre os principais grupos de polinizadores em ecossistemas tropicais, sendo elementos importantes para o desenvolvimento e manutenção destes. Entretanto, encontram-se em eminente risco de extinção, devido às modificações nos ecossistemas tropicais, causadas, principalmente, pelo desmatamento, uso indiscriminado de defensivos agrícolas e ação predatória de meliívoros, além de grandes queimadas (KERR et al., 1996).

Neste sentido, o conhecimento da variabilidade genética de determinadas espécies e populações é uma imprescindível ferramenta para a sua conservação. O estudo da variabilidade genética pode ser realizado por meio da utilização de marcadores moleculares (FRANCOY et al., 2008; ZAYED, 2009).

Nos últimos anos, os avanços tecnológicos têm permitido a utilização de vários tipos de marcadores genéticos para estudos populacionais. A partir da análise dos marcadores moleculares, é possível estimar de maneira acurada aspectos da estrutura populacional tais como subdivisões de populações, dispersão, fluxo gênico e tamanho efetivo da população, dando subsídios para inferir sobre adaptação, estratégias para o melhoramento e história evolutiva.

Dentre os marcadores moleculares, os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) têm ganhado destaque. São sequências simples de uma a seis pares de base, repetidas em tandem (HANCOCK, 1999), e distribuídas aleatoriamente pelo genoma (SCHLOTTERER e WIEHE, 1999). Estes marcadores têm sido amplamente utilizados em estudos com vários organismos, devido ao seu elevado grau de polimorfismo e por serem codominantes (LOPES et al., 2010).

Neste contexto, o presente trabalho objetivou conhecer a variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata anthidioides* em sua área de ocorrência, na região semiárida da Bahia, por meio da utilização de marcadores microssatélites, visando à obtenção e disponibilização de novas informações sobre a biologia, ecologia, genética e preservação desta abelha sem ferrão.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no meliponário do Núcleo de Estudo dos Insetos (INSECTA), do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), município de Cruz das Almas-BA, em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), durante o período de março de 2012 a fevereiro de 2014.

Coleta das amostras

As amostras de abelhas *Melipona quadrifasciata anthidioides* foram coletadas em diferentes cidades da região semiárida do estado da Bahia (Figura 1). Coletou-se 10 indivíduos de cada colônia. O material coletado foi armazenado em álcool puro e preservado em freezer a -20°C até o momento da extração. Os locais de coleta encontram-se descritos na Tabela 1.



Figura 1. Origem das amostras de *Melipona quadrifasciata anthidioides* no estado da Bahia, Brasil (Mapa adaptado da SEI - Superintendência de Estudos Econômicos e Sociais da Bahia)

Tabela 1. Localização geográfica, altitude e número de amostras de *Melipona quadrifasciata anthidioides* coletadas na região semiárida da Bahia.

Localidade	Latitude	Longitude	Altitude (m)	N
Barro Alto	11°46'01"	41°54'20"	722	03
Barrocas	11°31'40"	39°04'40"	393	03
Conceição do Coité	11°33'40"	39°17'09"	425	07
Cafarnaum	11°41'21"	41°28'06"	760	06
Canarana	11°41'06"	41°46'10"	718	03
Itaberada	12°31'39"	40°18'25"	279	05
Mundo Novo	11°51'32"	40°28'21"	520	03
Quijingue	10°45'09"	39°12'33"	350	05
Rui Barbosa	12°17'02"	40°29'38"	360	03
Tucano	10°57'47"	38°47'12"	200	02
Várzea da Roça	11°36'30"	40°08'01"	458	03
Total				43

Extração de DNA

O DNA total de uma operária por colônia foi extraído segundo o protocolo de Waldschmidt et al. (1997). Após a retirada do abdômen, cada indivíduo foi triturado em 1 mL do tampão de extração. O macerado foi incubado em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Para a desproteínização utilizou-se 1 mL de clorofórmio P.A. gelado por duas vezes. Após cada desproteínização, o macerado foi centrifugado a 13000 rpm por 7 minutos a 4°C. Para a precipitação do DNA utilizou-se álcool isopropílico gelado, seguida do armazenamento em freezer a -20°C em *overnight*. Em seguida, o material foi submetido à centrifugação a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C, e o precipitado obtido foi lavado por duas vezes em com álcool etílico 70% gelado e seco a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspenso em 100 µL de Tampão, pH 8,0, e armazenado a -30°C. Para a quantificação e verificação da integridade e pureza do DNA extraído, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% e fotodocumentados.

Amplificação das regiões microssatélites

Após teste de polimorfismo com 15 primers e seleção de loci polimórficos, o loco específico Mquad19 (TAVARES et al., 2013) e os locos heterólogos Mbi232, Mbi233, Mbi254 (PETERS et al., 1998) e Mru14 (LOPES et al. 2009) (Tabela 2), foram amplificados segundo o protocolo de Peters et al. (1998).

A reação de amplificação de 10µL consistiu em 0,4µM de primer F, 0,4µM de primer R, 1,5mM de MgCl₂, 0,1mM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfatado (dATP, dNTP, dGTP, dTTP), 1X de tampão, 0,5U de Taq DNA polimerase e 20ng de DNA total. O programa de amplificação teve uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos; 40 ciclos de 92°C por 30 segundos, temperatura padronizada para cada loco por 1 minuto, 72° por 30 segundos; e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 8%, e visualizados através de coloração com nitrato de prata 0,2% e fotodocumentados.

Tabela 2. Locos microssatélites e sequência dos *primers* utilizados em *Melipona quadrifasciata*

Loci	Tamanho (pb)	Sequência (5'-3')	Repetição	Ta (°C)
Mbi232	128	F: TTTTCTCTTAAATTTCTTCT R: CTTACTCGACGACTTTATTT	(CTT) ₁₃	50
Mbi233	119	F: ACGAGCACGGGCCATAA R: GATCCATCGACCGCTTCTT	(GAA) ₁₅	56
Mbi254	213	F: CAATCGTTGGAAGGGAAC R: GGACCTATACCCAAGTCCAT	(AAG) ₁₁	58
Mru14	136	F: GCTGTTTCCCTGTTCGAG R: CCCCTATCTTTTATGCCG	(TCG) ₈ TT (GTC) ₄	59
Mquad 19	120	F: GGGACGCACGATCTCGGACG R: GGACACGCCCGTGGGAAGAG	(TC) ₈	64

Ta(°C) = Temperatura de anelamento utilizada.

Análises estatísticas

A correção de alelos nulos foi feita utilizando o programa FreeNA (CHAPUIS e ESTOUP, 2007) com o algoritmo de Maximização de Expectativa de Dempster *et al* (1977). A diversidade alélica (A), porcentagem de locos polimórficos, heterozigosidades médias observada (H_o) e esperada (H_e), desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg com correção sequencial de Bonferroni, a distância genética de Nei (1972) e a análise de variância molecular (AMOVA) com dois níveis hierárquicos (entre grupos e dentro dos grupos) foram calculados pelo programa GeneAIEx 6.5 (PEAKALL e SMOUSE, 2012). A estatística F foi calculada pelo programa TFGA (MILLER, 1997). O agrupamento Bayesiano foi estimado por meio do programa STRUCTURE 2.3.2 (PRITCHARD *et al.*, 2000), baseado em um modelo onde o indivíduo é atribuído à uma população de acordo com suas frequências alélicas. Foram assumidos modelos de frequências alélicas correlacionadas e ancestralidade miscigenada, 100.000 interações de *burnin* e 100.000 interações de MCMC (Markov chain Monte Carlo). O número K de populações estruturadas foi calculado com 10 repetições com K de 1 a 8.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número médio de alelos por locos foi 5,4, variando entre 2 e 10. Observou-se que os locos heterólogos apresentaram maior número de alelos por loco em relação aos específicos para *M. q. anthidioides* (Tabela 3), uma vez que a proximidade filogenética permite sucesso na transferência de marcadores (CARVALHO-ZILSE e KERR, 2006; WERNECK, 2008; VIANA et al., 2011). Em outro estudo com a *M. quadrifasciata* foi encontrado maior polimorfismo, 3 a 15 alelos por loco, provavelmente devido à maior abrangência dos locais de amostragem, em sete Estados brasileiros, e conseqüentemente o número de amostras analisadas por localidade (TAVARES et al., 2013).

Tabela 3. Número de alelos por loco (A), heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e) e desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$).

Locus	A	H_o	H_e	HWE
Mbi232	06	0,75	0,58	ns
Mbi233	10	0,84	0,69	ns
Mbi254	05	0,47	0,36	ns
Mru14	04	0,68	0,58	ns
Mquad19	02	0,20	0,13	ns
Média	5,4	0,59	0,47	

O percentual médio de polimorfismo encontrado foi de 85,45% (Tabela 4). Estudos utilizando marcadores ISSR encontraram um percentual de 67% de polimorfismo em *M. quadrifasciata* no Estado de Minas Gerais (NASCIMENTO et al., 2010) e 72,47% em *Melipona mandacaia* no Estado da Bahia (MIRANDA et al., 2012).

Não houveram desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$) ou presença de alelos exclusivos, indicando um baixo nível de endogamia na população em estudo. Alelos exclusivos e desvios do EHW foram detectados por TAVARES et al. (2013) em populações do Norte de Minas Gerais, São Cristóvão (Sergipe) e Ourolândia (BA), provavelmente devido ao isolamento das

populações causado pela degradação ambiental.

A heterozigidade média observada (H_o) entre as populações variou de 0,40 a 0,77 e a heterozigidade média esperada (H_e) variou entre 0,32 e 0,53 (Tabela 4). Estes valores foram superiores aos apresentados por Tavares et al. (2013), que utilizaram nove locos específicos, e encontraram H_o variando entre 0,03 a 0,21 e H_e com valores entre 0,23 a 0,47. Segundo os autores, as diferenças entre os valores de heterozigidade esperada e observada podem ser explicadas por um número pequeno de alelos em cada população, com um ou poucos em maior frequência. Os valores da heterozigidade média encontrado em populações de *M. quadrifasciata* em fragmentos de Minas Gerais também foram inferiores ao detectado no presente estudo. Por meio de marcadores microssatélites, encontrou-se valores de $H_o = 0,046$ e $H_e = 0,086$ (SILVA, 2007). A destruição de habitats, e conseqüente redução populacional da espécie, apresentou-se como uma explicação para os baixos níveis de variabilidade detectados no estudo.

Tabela 4. Heterozigidade observada (H_o), Heterozigidade esperada (H_e) e Porcentagem de polimorfismo dos alelos (%) de *M. q. anthidioides* em diferentes localidades da Bahia.

Localidade	H_o	H_e	%P
Barro Alto	0,50	0,32	60
Barrocas	0,77	0,53	100
Canarana	0,60	0,40	80
Cafarnaum	0,56	0,43	80
C. do Coité	0,68	0,50	100
Itaberaba	0,40	0,40	80
Mundo Novo	0,60	0,47	80
Quijingue	0,60	0,52	100
Rui Barbosa	0,77	0,53	100
Tucano	0,60	0,52	80
V. da Roça	0,40	0,51	80
Média	0,59	0,47	85,45

A matriz de distância genética utilizando o índice de Nei (1972), calculada entre pares de localidades, variou entre 0,106 (Cafarnaum e Mundo Novo) e 0,696 (Barrocas e Várzea da Roça) com média de 0,32 (Tabela 5). O valor de F_{ST} foi de 0,02 e o valor de F_{IS} foi 0,03, indicando baixa estruturação populacional e baixo nível de endogamia em nível de indivíduo (WRIGHT, 1978). Os valores encontrados neste estudo foram inferiores a relatos anteriores para a espécie. TAVARES et al. (2013) encontraram um valor de F_{ST} de 0,23, justificado pelo fato de os autores analisarem conjuntamente duas diferentes subespécies de *M. quadrifascita*, abrangência da área de coleta em sete Estados e isolamento das populações devido a degradação ambiental.

Tabela 5. Distância genética de NEI (1972)

Pop	BA	BR	CA	CF	CC	IT	MN	QU	RB	TU	VR
BA	0,00										
BR	0,64	0,00									
CA	0,29	0,40	0,00								
CF	0,12	0,42	0,17	0,00							
CC	0,34	0,36	0,21	0,14	0,00						
IT	0,30	0,35	0,34	0,14	0,18	0,00					
MN	0,13	0,50	0,25	0,11	0,28	0,31	0,00				
QU	0,20	0,34	0,15	0,15	0,15	0,31	0,17	0,00			
RB	0,54	0,48	0,56	0,44	0,48	0,43	0,45	0,36	0,00		
TU	0,35	0,39	0,26	0,30	0,25	0,31	0,36	0,23	0,32	0,00	
VR	0,24	0,70	0,44	0,23	0,26	0,30	0,22	0,35	0,36	0,32	0,00

Legenda: BA= Barro Alto; BR= Barrocas; CA= Canarana; CF= Cafarnaum; CC= Conceição do Coité; IT= Itaberaba; MN= Mundo Novo; QU= Quijingue; RB= Rui Barbosa; TU= Tucano; VR= Várzea da Roça.

A Análise Molecular de Variância (AMOVA) mostrou que 6% da variação genética está entre as localidades e 94% dentro das localidades (Tabela 6). Este resultado evidencia a alta semelhança e um alto fluxo gênico entre as populações, justificado pela proximidade entre os locais amostrados neste

estudo. Estes valores foram superiores ao encontrados para populações de *M. quadrifasciata* localizadas em fragmentos florestais no estado de Minas Gerais, onde se detectou que 42,93% e 55,42% da variação genética total estão distribuídas entre e dentro das populações, respectivamente (SILVA, 2007). Resultados semelhantes foram encontrados em outras espécies de abelhas do gênero *Melipona*. Em populações de *M. mandacaia* pertencentes ao estado da Bahia, verificou-se que 70,39% da variação genética encontrada está dentro das localidades, enquanto que 29,61% da variação foi relacionada com a variação entre os locais, evidenciando que a espécie está moderadamente estruturada nas localidades analisadas (MIRANDA et al., 2012).

Tabela 6. Análise molecular de variância (AMOVA) para cinco locos microsatélites em população de *M. q. anthidioides* no estado da Bahia.

Fonte de variação	GL	%	Estatística <i>F</i>	
Entre grupos	10	6%	Φ_{st}	0,06*
Dentro de grupos	63	94%		
Total	73	100%		

*valor significativo ($p < 0.001$)

Os resultados da análise de agrupamento Baysiana executada no programa Structure indicaram o valor ótimo de $K = 4$ (Figura 2).

A análise de agrupamento pelo método UPGMA indica a formação de dois grupos geneticamente diferentes, porém as distâncias genéticas entre os grupos são pequenas e os valores de bootstrap não são significantes (abaixo de 0,95), refletindo a baixa estruturação das localidades analisadas (Figura 3). Este resultado pode ser explicado pela grande semelhança entre as populações em estudo, decorrentes da proximidade das localidades abrangidas.

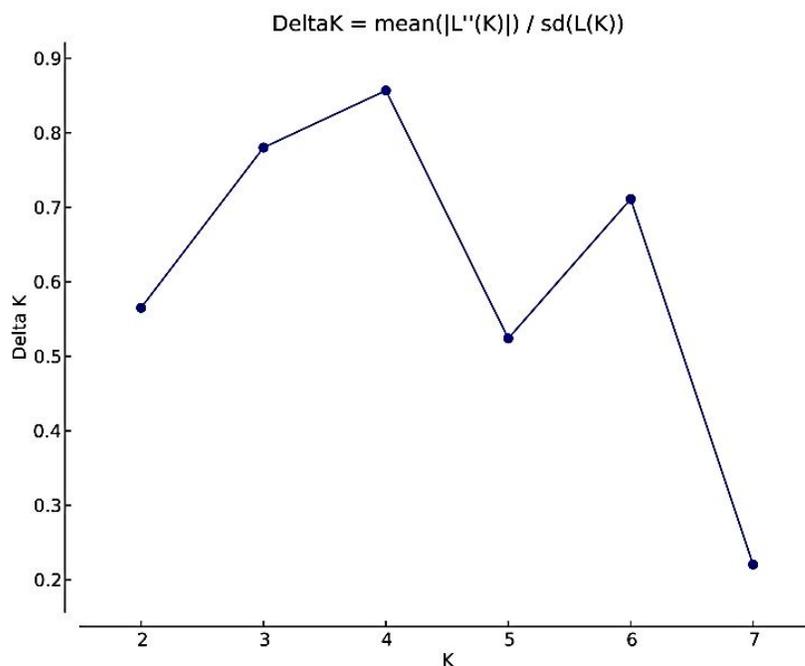


Figura 2. Valores de DeltaK, calculado pelo programa Structure (PRITCHARD et al., 2000), o maior valor de DeltaK corresponde ao K ótimo.

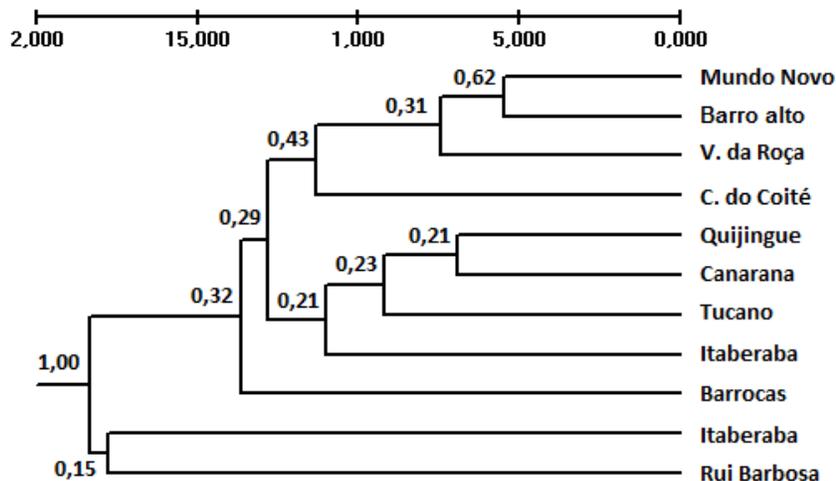


Figura 3. Dendrograma baseado no método UPGMA, evidenciando as distâncias genéticas médias de colônias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* no estado da Bahia.

A representação gráfica da estrutura populacional de *M. q. anthidioides* resultante da análise Bayesiana demonstra a semelhança genética entre os indivíduos, que descendem de quatro populações distintas, as quais não foram identificadas (Figura 4).

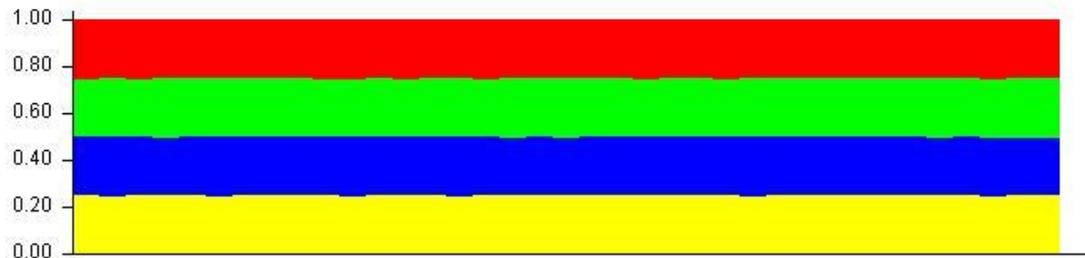


Figura 4. Análise Bayesiana de 5 locos de microssatélites evidenciando o melhor resultado de populações de *Melipona quadrifasciata anthidioides* nas localidades amostradas.

A área mais restrita de coleta do presente trabalho, em relação ao estudo de Tavares et. al. (2013), e a proximidade entre as localidades amostradas podem explicar a baixa estruturação e o equilíbrio encontrado. É provável que o nível de fragmentação dos habitats de *M. quadrifasciata* entre as localidades amostradas no Estado da Bahia ainda permita suficiente fluxo gênico para a espécie, ou que o efeito será detectado em gerações futuras.

CONCLUSÕES

Considerando as amostras analisadas, observou-se que há baixa estruturação das localidades analisadas, demonstrando a grande semelhança entre as localidades em estudo, decorrentes da proximidade das localidades abrangidas por este estudo. Pesquisas futuras são indispensáveis para a melhor caracterização da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATALHA-FILHO H., MELO G. A. R.; WALDSCHMIDT, A. M.; CAMPOS, L. A. O.; FERNANDES-SALOMÃO, T. M. Geographic distribution and spatial differentiation in the color pattern of abdominal stripes of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae), **Zoologia**, v.26, p.213–219, 2009.
- CARVALHO-ZILSE, C. D.; KERR, W. E. Utilização de marcadores microsatélites para estudos populacionais em *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). **Magistra**, v.18, n.4, p.213-220, 2006.
- CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D. W.; DOLLIN, A.; HEARD, T.; AGUILAR, I. B.; VENTURIERI, G.; EARDLEY, C.; NOGUEIRA-NETO, P. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**, v.37, p.275-292, 2006.
- CHAPUIS, M. P.; ESTOUP, A. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, n.3, p.621-631, 2007.
- DEMPSTER, A. P.; LAIRD, N. M.; RUBIN, D. B. Maximum Likelihood from Incomplete Data via the EM Algorithm. **Journal of the Royal Statistical Society**, v.39, n.1, p.1-38, 1977.
- FRANCOY, T. M. et al. A morfometria geométrica de asas e a identificação dos Meliponini. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 8., 2008, Ribeirão Preto: **Anais...** VIII Encontro sobre Abelhas, Ribeirão Preto - SP, 2008, p.252-254.
- HANCOCK, J. M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER, C. (eds.). **Microsatellites: Evolution and Applications**, p.1-9, Oxford University Press, New York, 1999.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha Uruçu: biologia, manejo e conservação**. Fundação Acangaú, Belo Horizonte. 1996.
- LOPES, D. M.; SILVA, F. O.; SALOMÃO, T. M. F.; CAMPOS, L. A. O.; TAVARES, M. G. Microsatellite loci for the stingless bee *Melipona rufiventris* (Hymenoptera, Apidae). **Molecular Ecology Res**, v.9, p.923-925, 2009.

- LOPES, D. M.; CAMPOS, L. A. DE O.; SALOMÃO, T. M. F.; TAVARES, M. G. Comparative study on the use of specific and heterologous microsatellite primers in the stingless bees *Melipona rufiventris* and *M. mondury* (Hymenoptera, Apidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.33, n.2, p.390-393, 2010.
- MILLER, M. P. **Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3**: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author. 1997.
- MIRANDA, E. A.; BATALHA-FILHO, H.; OLIVEIRA, P. S.; ALVES, R. M. O.; CAMPOS, L. A. O.; WALDSCHMIDT, A. M. Genetic Diversity of *Melipona mandacaia* SMITH 1863 (Hymenoptera, Apidae), an Endemic Bee Species from Brazilian Caatinga, Using ISSR. **Psyche**, 2012.
- NASCIMENTO M. A.; BATALHA-FILHO, H.; WALDSCHMIDT, A. M.; TAVARES, M. G.; LUCIO CAMPOS, A. O.; SALOMÃO, T. M. F. Variation and genetic structure of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) populations based on ISSR pattern. **Genetics and Molecular Biology**, v.33, n.2, p.394-397, 2010.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **America Naturalist**, Chicago, v. 106, p. 283-292, 1972.
- NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. Ed. Nogueirapis, São Paulo. 1997.
- NUNES, L. A.; PASSOS, G. B.; CARVALHO, C. A. L.; ARAUJO, E. D. Size and shape in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera; Meliponini). **Brazilian Journal of Biology**, v.73, n.4, p. 887-893, 2013.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research, an update. **Bioinformatics**, v.28, p.2537-2539, 2012.
- PETERS, J. M.; QUELLER, D. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; STRASSMANN, J. E. Microsatellite loci from the stingless bees. **Molecular Ecology**, v.7, p.783-792, 1998.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHEENS, M.; DONNELLY, P. Interference of population structure using multilocus genotype data, **Genetics**, v.155, p. 945-

959, 2000.

SILVA, R. B. da. **Variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) no estado de Minas Gerais - Brasil.**

Viçosa, Minas Gerais, 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa.

SCHLÖTTERER, C.; WIEHE, T. **Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps.** In D. B. GOLDSTEIN, & C. SCHLÖTTERER (Eds.), *Microsatellites*, p. 238-248. Oxford: Oxford University Press, 1999.

TAVARES, M. G.; PIETRANI, N. T.; DURVALE, M. DE C.; RESENDE, H. C.; CAMPOS, L. A. DE O. Genetic divergence between *Melipona quadrifasciata* Lepelletier (Hymenoptera, Apidae) populations. **Genetics and Molecular Biology**, v.36, n.1, p.111-117, 2013.

VIANA, M. V. C.; MIRANDA, E. A.; FRANCISCO, A. K.; CARVALHO C. A. L. de; WALDSCHMIDT, A. M. Transferability of microsatellite primers developed for stingless bees to four other species of the genus *Melipona*. **Genetics and Molecular Research**, v.10, n.4, p.3942-3947, 2011.

WALDSCHMIDT, A. M.; SALOMÃO, T. M. F.; BARROS, E. G.; CAMPOS, L. A. O. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Brazilian Journal Genetic**, v.20, p.421-423, 1997.

WERNECK, M. do V. **Uso de marcadores microssatélites para análise genética de populações de *Melipona mandacaia* SMITH, 1863 (HYMENOPTERA, APOIDEA) no Estado da Bahia.** Viçosa, Minas Gerais, 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural populations.** University of Chicago. Chicago, 1978.

ZAYED, A. Bee Genetics and Conservation. **Apidologie**, v.40, n.3, p.237-263, 2009.

CAPÍTULO 2

ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE GERAÇÕES DE *Melipona quadrifasciata anthidioides* (HYMENOPTERA, APIDAE) SUBMETIDA À CRIAÇÃO RACIONAL¹

¹ Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico: Anais da Academia Brasileira de Ciências

ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE GERAÇÕES DE *Melipona quadrifasciata anthidioides* (HYMENOPTERA, APIDAE) SUBMETIDA À CRIAÇÃO RACIONAL

RESUMO: A meliponicultura é responsável pela geração de emprego e renda e consequente fixação do homem no campo. Além do baixo custo de implantação e fácil manejo, essa atividade comercial destaca-se pelo fato de contribuir para a preservação dessas abelhas. Todavia, estudos apontam que as práticas de manejo realizadas na criação de abelhas em meliponários levam à diminuição da variabilidade genética e consequente isolamento populacional. O presente estudo objetivou identificar a variabilidade genética de uma população de abelhas mandaçaia (*Melipona quadrifasciata anthidioides*) submetida ao manejo racional em meliponário. Colônias de diferentes regiões da Bahia, após período de aclimação, foram transferidas para caixas padronizadas e divididas, originando as gerações parental, F1 e F2. A diversidade genética das gerações obtidas foi analisada por meio da utilização dos marcadores microssatélites Mbi232, Mbi233, Mbi254, Mru14 e Mquad19. Os locos analisados apresentaram-se bastante polimórficos, não havendo a perda da variabilidade genética ou endogamia e ausência de diferenciação populacional ao longo das gerações analisadas.

Palavras-chaves: Meliponicultura; abelha mandaçaia; diversidade genética.

**STUDY OF GENETIC VARIABILITY BETWEEN GENERATIONS OF
Melipona quadrifasciata anthidioides (HYMENOPTERA, APIDAE)
SUBMITTED TO RATIONAL CREATION**

ABSTRACT: The beekeeping is responsible for the generation of employment and income and consequent keeping people in the field. Besides the low cost of deployment and easy management, business activity contributes to the preservation of these bees. However, studies have shown that management practices carried out in raising bees in meliponários leads to decreased genetic variability and consequent population isolation. The present study aimed to identify the genetic variability of a population of bees mandaçaia (*Melipona quadrifasciata anthidioides*) subjected to rational management in meliponary. The study was developed in meliponary the Center for the Study of Insects - Insecta, the Center for Agricultural, Environmental and Biological Sciences, Federal University of Reconcavo of Bahia - UFRB. Colonies of different regions of Bahia, after acclimation period, were transferred to standard boxes and divided, giving rise to parental generations, F1 and F2. The genetic diversity of generations obtained was analyzed by using microsatellite markers Mbi232, Mbi233, Mbi254, Mru14 and Mquad19. Loci analyzed were quite polimórficos, with no loss of genetic variability or inbreeding, and no population differentiation across generations analyzed. Variability, generations

Keywords: Meliponiculture; "Mandacaia" Bee; genetic diversity.

INTRODUÇÃO

A meliponicultura, criação racional de abelhas sem ferrão, é uma atividade em crescente desenvolvimento, encontra-se difundida em quase que todo o território brasileiro. Essa atividade foi iniciada pelos índios e por pequenos e médios produtores, onde utilizavam seus produtos para o consumo e comércio (KERR et al., 1996).

A criação de abelhas sem ferrão para fins econômicos tem se tornado cada vez mais conhecida, destacando-se como uma importante alternativa de renda e ocupação ao homem do campo, isso devido ao seu baixo custo de implantação, fácil manejo e preservação dessas abelhas (FREITAS, 2004; AIDAR, 2010).

Estudos demonstraram que a interferência humana tem levado a redução da diversidade genética de animais domésticos (BRUFORD et al., 2003). A redução da diversidade genética é explicada, principalmente, pelo fato de ocorrer diminuição do tamanho populacional efetivo e da diversidade genética (WRIGHT et al., 2005; ZEDER et al., 2006).

Para evitar a ocorrência de fenômenos populacionais como o citado acima, Kerr e Vencovsky (1982) relatam que existe a necessidade de ter um mínimo de 44 colônias de uma mesma espécie, a fim de manter um número de alelos sexuais na população evitando a endogamia. Se a população for menor que 44 colônias, esta será eliminada entre 15 a 30 gerações pela perda gradativa da variabilidade genética – “Efeito Yokoyama e Nei” (YOKOYAMA e NEI, 1979). Isto se justifica pela grande quantidade de machos diplóides que são produzidos quando há aumento de endogamia (KERR et al., 1996).

Para a manutenção da variabilidade genética da população em meliponários experimentais e comerciais deve ser realizada a introdução de novas rainhas ou rainhas acasaladas em populações diferentes, visando evitar a endogamia da população (AIDAR e KERR, 2001). Além disso, a maior diversidade de genótipos em abelhas pode ser obtida por meio da formação do plantel inicial com acessos representativos da área de dispersão da espécie (ALVES, 2010).

Entretanto, vários mecanismos para evitar endocruzamento podem ser detectados no momento do cruzamento destes indivíduos. O exemplo mais conhecido é o da *Apis mellifera*, onde machos de várias colônias se reúnem em zonas de agregação, sendo possível a representação genética de toda a população (JAFFÉ et al., 2009), bem como o fenômeno da poliandria, onde a rainha acasala com cerca de 10 a 20 machos diferentes (LAIDLAW JR e PAGE JR, 1984). Já em algumas espécies de abelhas do gênero *Bombus*, verifica-se que machos jovens são expulsos da colônia logo após a emergência, evitando assim o cruzamento com rainhas virgens da mesma colônia, diminuindo, conseqüentemente, a probabilidade de endocruzamento (PLOWRIGHT e PALLET, 1979; FOSTER, 1992).

Apesar da importância econômica e ambiental dos meliponíneos, são escassos os estudos sobre a estruturação genética de populações de abelhas quando submetidas a criação racional. Responder a estas questões torna-se essencial para determinar a viabilidade da criação racional de diversas espécies de abelhas sem ferrão. Neste sentido, o presente estudo objetivou identificar a variabilidade genética das gerações parental, F1 e F2 de abelhas mandaçaia (*Melipona quadrifasciata anthidioides*), manejadas racionalmente em meliponário.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no meliponário do Núcleo de Estudo dos Insetos (INSECTA), do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB, município de Cruz das Almas-BA em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), durante o período de março de 2012 a dezembro de 2013.

Origem das amostras

As amostras foram originadas a partir de colônias adquiridas em diferentes cidades do estado da Bahia (Conforme apresentadas na tabela 1 do Capítulo 1) e encaminhadas ao INSECTA em Cruz das Almas. Estas colônias foram reunidas em uma unidade de criação racional, onde passaram por um processo de aclimatação de 30 dias (Figura 1).



Figura 1. Meliponário do Núcleo de Estudos dos Insetos (INSECTA)/CCAAB/UFRB, Cruz das Almas-BA (Fonte: Acervo Insecta).

Após esse período, visando a obtenção das gerações F1 e F2, as colônias foram divididas de acordo com o método de perturbação mínima, segundo Oliveira e Kerr (2000). Posteriormente, as colônias foram constantemente acompanhadas e revisadas. Para a análise molecular, procedeu-se a coleta de 10 operárias, para cada colônia de cada geração (Parental, F1 e F2). O material amostrado foi acondicionado em álcool puro e preservado em freezer a -20°C até o momento da extração do DNA.

Extração de DNA

O DNA total de uma operária por colônia foi extraído segundo o protocolo de Waldschmidt et al. (1997). Após a retirada do abdômen, cada indivíduo foi

triturado em 1 mL do tampão de extração. O macerado foi incubado em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Para a desproteíntização utilizou-se 1 mL de clorofórmio P.A. gelado por duas vezes. Após cada desproteíntização o macerado foi centrifugado a 13000 rpm por 7 minutos a 4°C. Para a precipitação do DNA utilizou-se álcool isopropílico gelado, seguida do armazenamento em freezer a -20°C em *overnight*. Em seguida, o material foi submetido à centrifugação a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C, e o precipitado obtido foi lavado por duas vezes em álcool etílico 70% gelado e seco a temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado em 100 µL de Tampão TE, pH 8,0, e armazenado a -20°C. Para a quantificação e verificação da integridade e pureza do DNA extraído, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% e fotodocumentados.

Amplificação das regiões microssatélites

Após teste de polimorfismo com 15 primers e seleção de loci polimórficos, o loco específico Mquad 19 (TAVARES et al., 2013) e os locos heterólogos Mbi232, Mbi233, Mbi 254 (PETERS et al., 1998), e Mru14 (LOPES et al. 2009), foram amplificados segundo o protocolo de Peters et al (1998). A reação de amplificação de 10µL consistiu em 0,4µM de primer F, 0,4µM de primer R, 1,5mM de MgCl₂, 0,1mM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfatado (dATP, dNTP, dGTP, dTTP), 1X de tampão, 0,5U de Taq DNA polimerase e 20ng de DNA total. O programa de amplificação teve uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos; 40 ciclos de 92°C por 30 segundos, temperatura padronizada para cada loco por 1 minuto, 72° por 30 segundos; e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 8%, e visualizados através de coloração com nitrato de prata 0,2%. Em seguida, os géis foram fotodocumentados para análises posteriores.

Análises estatísticas

A correção de alelos nulos foi feita utilizando o programa FreeNA (Chapuis e Estoup, 2007) com o algoritmo de Maximização de Expectativa de Dempster et al (1977). A diversidade alélica (A), porcentagem de locos polimórficos, desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg com correção sequencial de Bonferroni, a distância genética de Nei (1972), estatística F e a análise de variância molecular (AMOVA) com dois níveis hierárquicos (entre grupos e dentro dos grupos) foram calculados com o programa GeneAEx 6.5 (PEAKALL e SIMOUSE, 2012). As heterozigosidades médias observadas e esperadas nas três gerações foram comparadas por teste t utilizando programa Assistat 7.6 (SANTOS e SILVA, 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número médio de alelos por locos das gerações parental, F1 e F2 variou entre 02 e 10, não havendo fixação ou alelos exclusivos entre gerações em estudo. (Figura1). Encontrou-se a porcentagem de locos polimórficos de 100% nas gerações parental, F1 e F2. Resultados similares foram encontrados por Santiago (2013) ao analisar, por meio de marcadores microssatélites, populações de *Tetragonisca angustula* provenientes de meliponários manejados racionalmente, onde todos os loci foram 100% polimórficos e o número de alelos variou entre 01 a 19, sendo que foi encontrado número maior de alelos nas populações naturais da espécie em relação aos meliponários analisados. O maior número de alelos encontrados pode ser explicado pela maior distância geográfica entre os pontos de coleta.

A análise de populações de *Frieseomelitta varia* provenientes de ninhos manejados racionalmente em meliponários, coletadas ao longo da distribuição natural da espécie, mostrou um número de alelos variando entre 02 a 17 (GONÇALVES et al., 2011). Tal resultado não corroborou a hipótese inicial do autor, onde este pressupunha que haveria um cenário de baixa variabilidade genética para a espécie em estudo. Os resultados apresentados por este

evidenciaram alta variabilidade genética, explicado pelo fluxo gênico dos machos, podendo introduzir novos alelos nas populações.

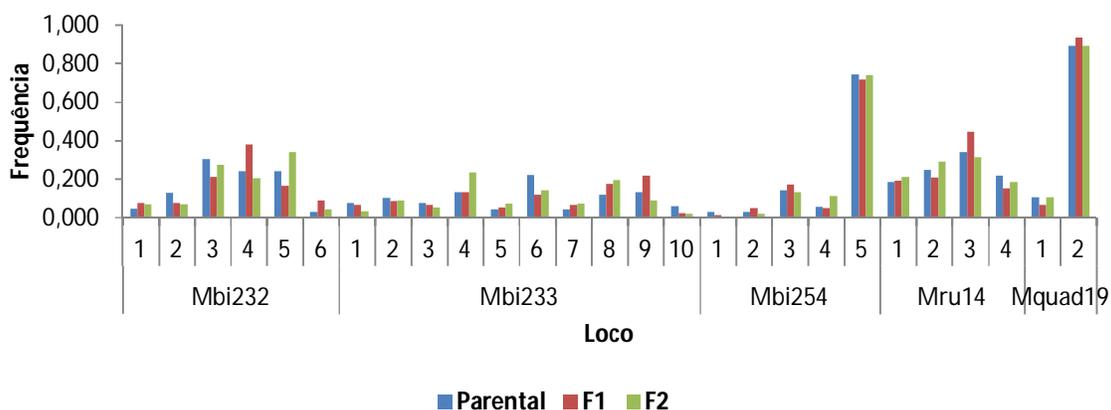


Figura 1. Variação das frequências alélicas ao longo de três gerações de *M. quadrifasciata anthidioides* quando submetidas a criação racional.

A heterozigosidade média observada (H_o) das gerações parental, F1 e F2 variou de 0,48 a 0,50 e a heterozigosidade média esperada (H_e) variou entre 0,58 e 0,60, indicando que não houve variação significativa entre as gerações analisadas (Tabela 1). Estudos realizados com *Tetragonisca angustula* provenientes de meliponários manejados racionalmente, comparados a dados de populações naturais de São Paulo e Paraná apresentaram H_o variando entre 0,44 a 0,72 e H_e entre 0,49 e 0,72, sendo que a variabilidade genética nos meliponários não são estatisticamente diferentes entre si e nem às amostras naturais ($p > 0,05$) (SANTIAGO, 2013).

Tabela 1. Heterozigosidades médias observada e esperada por geração.

Geração	H_o	H_e
Parental	0,483	0,606
F1	0,487	0,589
F2	0,507	0,588

Valores de H_o e H_e não diferem significativamente ($p > 0,05$)

Os resultados apresentados demonstram que, nas condições de estudo em que o trabalho foi desenvolvido, a variabilidade genética foi alta e não se mostrou significativamente diferente entre as gerações, não havendo a indícios de endogamia ou perda desta variabilidade ao longo das gerações parental, F1 e F2. Este resultado configura-se como importante ferramenta para a meliponicultura, pois, como a divisão artificial de colônias em meliponários, aparentemente, não causa diminuição da variabilidade genética, a busca de ninhos na natureza pode ser diminuída (SANTIAGO, 2013).

Resultados similares foram encontrados por Harpur et al. (2012) ao analisar populações de *Apis mellifera*, onde populações manejadas têm níveis mais elevados da diversidade genética, quando comparadas a populações naturais. Segundo os autores, este resultado pode ser justificado, dentre outros fatores, pela introdução de novos enxames para o incremento do apiário. Assim sendo, as abelhas manejadas racionalmente não sofrem redução da sua diversidade genética, e conseqüentemente, não contribuindo para o declínio ou desequilíbrio ecológico desta espécie.

Os valores de Heterozigosidades médias observada e esperada por loco encontram-se apresentados na Tabela 2. A maioria dos loci analisados não apresentou desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$), com exceção do loco Mbi232 na geração parental e F1 e Mru14 nas gerações F1 e F2, onde foram observados desvios ($p < 0,05$).

Para a espécie *Tetragonisca angustula* populações naturais não apresentaram desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$), enquanto que em populações manejadas racionalmente foram detectados desvios do EHW. Os resultados são explicados pelo seguinte fato: no primeiro caso, as práticas de manejo são inexistentes, enquanto que no segundo, devido a interferência humana e, possivelmente, endocruzamento existente em meliponários (SANTIAGO, 2013).

Tabela 2. Heterozigosidades médias observada e esperada por loco e por geração e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Geração	Loco	Ho	He	EHW
Parental	Mbi232	0,571	0,778	*
Parental	Mbi233	0,725	0,870	Ns
Parental	Mbi254	0,381	0,457	Ns
Parental	Mru14	0,524	0,736	Ns
Parental	Mquad19	0,214	0,191	Ns
F1	Mbi232	0,543	0,794	*
F1	Mbi233	0,848	0,867	Ns
F1	Mbi254	0,435	0,469	*
F1	Mru14	0,478	0,691	Ns
F1	Mquad19	0,130	0,122	Ns
F2	Mbi232	0,607	0,768	Ns
F2	Mbi233	0,929	0,857	Ns
F2	Mbi254	0,357	0,410	Ns
F2	Mru14	0,429	0,715	*
F2	Mquad19	0,214	0,191	Ns

(Legenda: * - $p < 0,05$; ns - $P > 0,05$)

CONCLUSÕES

Os locos analisados apresentaram-se bastante polimórficos, não havendo perda da variabilidade genética, aumento do nível de endogamia e diferenciação populacional ao longo das gerações analisadas, provavelmente devido a origem das colônias de diferentes localidades e a metodologia de seleção utilizada. Estudos futuros prevendo a análise de um número maior de gerações são necessários para determinar o momento ideal de introdução de novas colônias no

meliponário. Para melhor compreender a dinâmica sexual do meliponário seriam necessários o desenvolvimento de novos trabalhos, com diferentes metodologias de coleta, incluindo a coleta e genotipagem de machos, a fim de verificar a presença de machos diplóides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDAR, D. S. **A mandaçaia: biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. FUNPEC, 2010. 161p.

AIDAR, D. S.; KERR, W. E. Número de alelos XO em uma população de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.18, n.4, p.1237-1244, 2001.

ALVES, R. M. DE O. **Avaliação de parâmetros biométricos e produtivos para seleção de colônias da Abelha Uruçu (*Melipona scutellaris* Latreille, 1811)** Tese (Doutorado em Ciências Agrárias - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia) Cruz das Almas, BA, 2010.

BRUFORD, M.W.; BRADLEY, D. G.; LUIKART, G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. **Nature Reviews Genetics**, v.4, p.900–910, 2003.

CHAPUIS, M. P.; ESTOUP, A. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, n.3, p.621-631, 2007.

DEMPSTER, A. P.; LAIRD, N. M.; RUBIN, D. B. Maximum Likelihood from Incomplete Data via the EM Algorithm. **Journal of the Royal Statistical Society**, v.39, n.1, p.1-38, 1977.

FOSTER, R. L. Nestmate recognition as an inbreeding avoidance mechanism in bumble bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.65, p.238-243, 1992.

FREITAS, D. G. F.; KHAN, A. S.; SILVA, L. M. R. Nível Tecnológico e Rentabilidade de Produção de Mel de Abelha (*Apis mellifera*) no Ceará. **RER**. v.42, p.171-188, 2004.

- JAFFÉ, R.; DIETEMANN, V.; CREWE, R.; MORITZ, R. F. A. Temporal variation in the genetic structure of a drone congregation area: an insight into the population dynamics of wild African honeybees (*Apis mellifera scutellata*). **Molecular Ecology**, v.18, p.1511–1522, 2009.
- GONCALVES, P. H. P.; FRANCISCO, F. DE O.; BRITO, R. M.; TRINDADE D. Y., MAGALHAES, A.; PIOKER, F. C.; EGEEA, A. E. S.; ARIAS, M. C. A scientific note on the isolation and characterization of microsatellite loci of *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Apidologie**; v. 42, n. 5, p. 560-563, 2011.
- HARPUR, B. A.; MINAEI, S.; KENT, C. F.; ZAYED, A. Management increases genetic diversity of honey bees via admixture. **Molecular Ecology**, v.21, p.4414–4421, 2012.
- KERR, W. E.; CARVALHO G. A.; NASCIMENTO V. A. **Abelha Uruçu - Biologia, manejo e conservação**. Belo Horizonte: Acungau, 1996, 144p.
- KERR, W. E.; VENCOVSKY, R. Melhoramento genético em abelhas. I. efeito do número de colônias sobre o melhoramento. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 2, p. 279-285, 1982.
- LAIDLAW JR, H. H.; PAGE JR, R. E. **Poliandria das abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.): a utilização de esperma e relações genéticas dentro da colmeia**. Disponível em: <http://www.apinews.com/pt/artigos-tecnicos/cria-da-rainhas-genetica>. Acesso em 22 de setembro de 2013.
- LOPES, D. M.; SILVA, F. O.; SALOMÃO, T. M. F.; CAMPOS, L. A. O.; TAVARES, M. G. Microsatellite loci for the stingless bee *Melipona rufiventris* (Hymenoptera, Apidae). **Molecular Ecology Res**, v.9, p.923-925, 2009.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **America Naturalist**, Chicago, v. 106, p. 283-292, 1972.
- OLIVEIRA F.; KERR, W. E. Divisão de uma colônia de jupará (*Melipona compressipes manaosensis*) usando-se uma colmeia e o método de Fernando Oliveira. **INPA**, v.10, 2000.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research, an update. **Bioinformatics**, v.28, p.2537-2539, 2012.

- PETERS, J. M.; QUELLER, D. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; STRASSMANN, J. E. Microsatellite loci from the stingless bees. **Molecular Ecology**, v.7, p.783-792, 1998.
- SANTIAGO, L. R. **Variabilidade genética de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) de meliponários**. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Biologia/Genética. São Paulo – 2013.
- SANTOS E SILVA, F. A. **Assistat – Assistência estatística**. Disponível em: <http://www.assistat.com>, 2012.
- TAVARES, M. G.; PIETRANI, N. T.; DURVALE, M. DE C.; RESENDE, H. C.; CAMPOS, L. A. DE O. Genetic divergence between *Melipona quadrifasciata* Lepelletier (Hymenoptera, Apidae) populations. **Genetics and Molecular Biology**, v.36, n.1, p.111-117, 2013.
- PLOWRIGHT, R. C., PALLET, M. J. Worker-male conflict and inbreeding in bumblebees (Hymenoptera: Apidae). **The Canadian Entomologist**, v.111, p. 289–294, 1979.
- WALDSCHMIDT, A. M.; SALOMÃO, T. M. F.; BARROS, E. G.; CAMPOS, L. A. O. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Brazilian Journal Genetic**, v.20: 421-423, 1997.
- WRIGHT, S. I.; BI, I. V.; SCHROEDER, S. G.; YAMASAKI, M.; DOEBLEY, J. F.; MCMULLEN, M. D.; GAUT, B. S. The effects of artificial selection on the maize genome. **Science**, v.308, p.1310–1314, 2005.
- YOKOYAMA, S.; NEI, M. Population dynamics of sex-determining alleles in honey bees and self-incompatibility alleles in plants. **Genetics**, v.91, p.609-926, 1979.
- ZEDER, M. A., EMSHWILLER, E., SMITH, B. D., BRADLEY, D. G. Documenting domestication: the intersection of genetics and archaeology. **Trends in Genetics**, v.22, p.139–155, 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não foram verificados problemas relativos ao fluxo gênico da espécie em estudo, não apresentando problemas de estruturação da população, não indicando evidências de que ocorra perda de diversidade nas colônias quando submetidas a criação racional. Faz-se necessária a realização de estudos futuros, com número maior de gerações, visando informações a longo prazo.