

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

USO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES NA ANÁLISE
DE PRODUTIVIDADE EM *Melipona scutellaris*
(HYMENOPTERA: APIDAE: MELIPONINI)

ROMISON DE SOUZA TEIXEIRA

MANAUS
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ROMISON DE SOUZA TEIXEIRA

USO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES NA ANÁLISE
DE PRODUTIVIDADE EM *Melipona scutellaris*
(HYMENOPTERA: APIDAE: MELIPONINI)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Gislene Almeida Carvalho-Zilse
Co-orientador: Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva

MANAUS
2011

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAM

T266u Teixeira, Romison de Souza
Uso de marcadores microssatélites na análise de produtividade em
Melipona scutellaris (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) / Romison de
Souza Teixeira. - Manaus, AM : UFAM, 2011.
57 f.: il. color. ; 30 cm

Inclui referências.

Dissertação (Mestre em Biotecnologia). Universidade Federal do
Amazonas. Orientador: Prof. Dra. Gislene Almeida Carvalho-Zilse.

1. Abelha sem ferrão 2. Meliponicultura 3. Biologia molecular I.
Carvalho-Zilse, Gislene Almeida (Orient.) II. Título

CDU (2007): 595.799(043.3)

ROMISON DE SOUZA TEIXEIRA

USO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES NA ANÁLISE
DE PRODUTIVIDADE EM *Melipona scutellaris*
(HYMENOPTERA: APIDAE: MELIPONINI)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

APROVADA EM: 17/06/2011

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gislene Almeida Carvalho-Zilse, Presidente
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Profa. Dra. Ana Maria Waldschmidt
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Profa. Dra. Ana Maria Bonetti
Universidade Federal de Uberlândia

Ao meu pai Raimundo Paz Teixeira (In Memorium). À minha mãe Clariza de Souza Teixeira pelo seu esforço em dar a educação aos filhos e preciosos ensinamentos de valorização da vida. Aos meus irmãos que sempre estiveram dispostos para ajudar no decorrer de mais uma trajetória de meus estudos. À minha esposa Tânia de Jesus Corrêa que sempre me incentivou e ao meu lado labutou e se manteve firme nos momentos de dificuldades. Aos meus filhos Hugo Lennon, Louane Tainá, Lucas Matheus e Tatiane Cristina, que com seus sorrisos meigos me confortaram nos momentos de cansaço e me incentivaram a concluir meu objetivo.

DEDICO.

À Deus pela sua proteção e oportunidade à vida;

Aos meus familiares pelo apoio;

À Dr^a. Gislene Almeida Carvalho-Zilse por ter acreditado no meu potencial, pelas suas orientações e tempo dispensado durante a realização deste trabalho;

Ao Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva pela sua co-orientação;

Aos colegas do Grupo de Pesquisas em Abelhas pela amizade e colaboração;

À MSc. Izaura Bezerra Francini pelo incentivo;

À Dr^a. Jacqueline da Silva Batista que sempre se colocou à disposição e se fez presente nos momentos necessários;

À MSc. Kyara Martins Formiga pela ajuda inegável nos momentos de necessidade;

A todos os colegas pesquisadores do Laboratório Temático de Biologia Molecular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pela ajuda dispensada, em especial a Antonio Saulo Machado;

À Universidade Federal do Amazonas pelo curso de Pós-Graduação em Biotecnologia;

À coordenação e docentes do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia pelo ensino e aprendizagem;

Aos colegas de turma que me incentivaram;

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pela estrutura para a realização do trabalho;

Ao Dr. Rogério Marcos de Oliveira Alves pela doação do material biológico utilizado no presente estudo;

À Dr^a. Miriam Silva Rafael pela oportunidade concedida aos cursos de microssatélites do PROCAD;

Aos professores Dr^a. Anete Pereira de Souza, Dr^a. Maria Imaculada Zucchi, Dr. Marcelo Cavallari, Dr^a. Tatiana de Campos e Dr^a. Adna Souza pelos ensinamentos no curso de microssatélites do PROCAD;

À FAPEAM, CNPq, FINEP (Fronteira) e PROCAD-Amazônia pelo auxílio financeiro.

AGRADEÇO

Em realidade, somos mais do que conhecemos de nós mesmos e, com frequência, ouvimos sair de nossos lábios coisas que não acreditávamos ser capazes de dizer.

OG MANDINO.

RESUMO

No Brasil existem mais de 190 espécies de abelhas da tribo Meliponini, com destaque para o gênero *Melipona* que são as mais visadas para produção de mel e pólen. Dentre as espécies nativas, a abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 conhecida popularmente como Uruçu do Nordeste, destaca-se como economicamente útil, constituindo sustento de diversas famílias brasileiras que exploram seus produtos com a atividade de criação denominada Meliponicultura. No entanto, os criadores fazem a multiplicação intensa das colméias sem atentar para o valor da seleção ou melhoramento genético como fator de aumento da produtividade. Este trabalho objetivou utilizar locos microssatélites para comparar colônias de *Melipona scutellaris* após seleção genética visando possível correlação entre marcador e colméias mais e menos produtivas. Foram amostradas 30 colônias (cinco abelhas operárias adultas/colônia) de uma geração F2 classificadas como mais e menos produtivas para mel e pólen, mantidas e cultivadas no meliponário da Universidade Federal do Recôncavo Baiano, cidade Cruz das Almas - BA. O DNA total das amostras foi extraído e amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando 10 locos microssatélites heterólogos para a avaliação, sendo dois desenvolvidos para *M. bicolor* e oito desenvolvidos para *M. seminigra*. A genotipagem foi realizada com auxílio de sequenciador automático e os dados obtidos analisados em programas de estatística descritiva. Todos os locos microssatélites geraram produtos de amplificação via PCR. Os locos microssatélites se mostraram polimórficos com um total de 56 alelos diferentes, com tamanhos e frequências variadas. Os locos desenvolvidos para *M. seminigra* e amplificados pela primeira vez em *M. scutellaris*, apresentaram heterozigosidade observada superior e um número de alelos maior quando comparado com o número de alelos e heterozigosidade observada encontrados na espécie de origem dos *primers*. Observou-se alelos de alta frequência nas duas classes de colônias. A média da heterozigosidade observada e a média da diversidade genética para todos os locos avaliados apresentaram valores próximos para as duas classes de colônias. A maioria dos locos se apresentou em equilíbrio de Hardy-Weinberg e, pelas altas frequências de alelos encontrados nas duas classes de colônias reforçam a idéia que microssatélites podem estar ligados a genes importantes. Observaram-se alelos exclusivos com frequências e tamanhos variados para ambas as classes. Desta forma, não é possível inferir com segurança que estejam relacionados com a produtividade em *M. scutellaris*, necessitando de mais estudos nesta área.

ABSTRACTS

In Brazil there are over 190 species of bees of the tribe Meliponini, especially *Melipona* the genre that are more targeted for production of honey and pollen. Among the native species, "the stingless bee" *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 popularly known as the Northeast Uruçu, stands out as economically useful, providing livelihood for several Brazilian families with products that exploit their creation activity called Meliponiculture. However, the creators make the intense multiplication of the hives without regard to the value of the selection or genetic improvement as a factor in increasing productivity. This study aimed to use microsatellite loci to comparing *Melipona scutellaris* colonies after genetic selection in order to verify a possible correlation between marker and more and less productive colonies. We sampled 30 colonies (five adult worker bees per colony) from an F2 generation classified as less productive and more for honey and pollen maintained and cultured at the Federal University Recôncavo Baiano of meliponary, city Cruz das Almas - BA. The total DNA sample was extracted and amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using 10 microsatellite loci heterologous to the evaluation and was developed to two *M. bicolor* and eight developed for *M. seminigra*. Genotyping was performed with the aid of automated sequencer and data were analyzed with descriptive statistics programs. All microsatellite loci amplification products generated via polymerase chain reaction. The microsatellite loci proved polymorphic with a total of 56 different alleles, with sizes and varying frequency. The loci developed for *M. seminigra* and amplified the first time in *M. scutellaris*, showed heterozygosity observed higher and a number of alleles and higher when compared with the number of alleles and observed heterozygosity found in species of origin of the *primers*. Observed high frequency of alleles in the two classes of colonies. The average observed heterozygosity and mean genetic diversity for all loci analyzed had similar values for the two classes of colonies. Most loci presented in Hardy-Weinberg equilibrium, and the high frequency of alleles found the study for both classes of colonies reinforces the idea that microsatellite markers may be linked to important genes. Observed alleles with frequencies and sizes for both classes. Thus, you cannot safely infer that are related to productivity in *M. scutellaris*, requiring more research in this area.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Abelha da espécie *Melipona interrupta manaosensis* visitando flor.....13
- Figura 2.** Ninho de *Melipona scutellaris* com rainha fisogástrica em destaque (círculo).....15
- Figura 3.** Abelhas operárias de *Melipona scutellaris* cuidando da prole.....15
- Figura 4.** Corte longitudinal de um oco de árvore, mostrando a estrutura interna de um ninho de meliponínio.....16
- Figura 5.** Regiões de distribuição dos Meliponínios (destaque em vermelho) no mundo.....17
- Figura 6.** Oficina de Educação Ambiental sobre abelhas e meio ambiente.....18
- Figura 7.** Criação técnica de meliponínios (Meliponicultura).....19
- Figura 8.** Espécie de abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* Latreille, 1811.....20
- Figura 9.** Entrada de ninho de *Melipona scutellaris* evidenciando a abelha guarda.....21
- Figura 10.** Perfil de amplificação em teste gradiente de temperatura dos locos MSM08 (A) e MIM07 (B) apresentando bandas inespecíficas em *Melipona scutellaris* em gel de agarose 1,5% corado com gelRed.....35
- Figura 11.** Perfil de amplificação em teste gradiente de temperatura dos locos Mbi36 (A) e Mbi11 (B) mostrando bandas inespecíficas em *Melipona scutellaris* em gel de agarose 1,5% corado com gelRed.....36
- Figura 12.** Perfil de amplificação dos locos MSM02 (1), MSM03 (2), MSM04 (3), MSM05 (4), MSM07 (5), MSM12 (6) e MSM13 (7) em *Melipona scutellaris* em gel de agarose 1,5% corado com gelRed.....37
- Figura 13.** Perfil de amplificação teste com *primer* cauda M13 para os locos MSM02 (1), MSM03 (2), MSM04 (3), MSM05 (4), MSM07 (5), MSM09 (6), MSM12 (7) e MSM13 (8) em *Melipona scutellaris* em gel de agarose 1,5% corado com gelRed.....38
- Figura 14.** Perfil de amplificação com fluorescência FAM para os locos MSM07 (A) e MSM09 (B) em gel de agarose 1,5% corado com gelRed.....39
- Figura 15.** Padrão de genotipagem de alelos com fluorescência FAM analisado no programa Fragment Profiler v. 1.2, exemplificado pelo loco MSM03.....41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Origens e sequências dos <i>primers</i> (F = forward; R = reverse) testados para locos microssatélites na amplificação de DNA em <i>Melipona scutellaris</i>	32
Tabela 2. Origem, sequências e motivos de repetição do <i>primers</i> selecionados e utilizados na amplificação de locos microssatélites em <i>Melipona scutellaris</i>	36
Tabela 3. Concentrações ótimas de reagentes para amplificação de locos microssatélites em <i>Melipona scutellaris</i> por PCR.....	37
Tabela 4. Condição de ciclos da PCR para amplificação dos locos microssatélites com <i>primer</i> M13 marcado com fluorescência.....	39
Tabela 5. Tamanho de fragmentos esperados (FE) para locos microssatélites utilizados	40
Tabela 6. Heterozigosidade observada (H_o), Número (N) e tamanho dos fragmentos (F) em pares de bases, amplificados em <i>Melipona scutellaris</i> comparado as espécies de origem dos <i>primers</i>	42
Tabela 7. Números (N) e tamanhos dos fragmentos (F) em pares de bases amplificados em <i>M. scutellaris</i> nas colônias mais produtivas e menos produtivas, suas respectivas heterozigosidades observadas (H_o).....	46
Tabela 8. Tamanho de alelos em pares de bases (F) e as frequências alélicas (F_a) nos locos analisados nas colônias mais e menos produtivas de <i>Melipona scutellaris</i>	48
Tabela 9. Diversidade genética (DG) por loco microssatélite nas colônias mais produtivas e menos produtivas de <i>Melipona scutellaris</i>	50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Biologia das abelhas	13
1.2 Os Meliponini.....	14
1.2.1 <i>Distribuição mundial dos meliponínios</i>	16
1.2.2 <i>Importância ecológica, econômica e social dos meliponínios</i>	17
1.3 Caracterização da espécie	19
1.4 Marcadores Genético-Moleculares.....	22
1.4.1 <i>Uso de marcadores microssatélites em abelhas</i>	23
1.5 Produtividade em <i>Melipona</i>	25
2. OBJETIVO	28
2.1 OBJETIVO GERAL.....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Material biológico.....	29
3.2 Extração e quantificação de DNA.....	29
3.3 Testes de amplificação de DNA com <i>primers</i> heterólogos	30
3.3.1 <i>Amplificação dos locos microssatélites</i>	31
3.4 Genotipagem de locos microssatélites	33
3.5 Análises dos dados	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Comparação entre as colônias mais produtivas e menos produtivas de <i>Melipona scutellaris</i>	45
5. CONCLUSÕES	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biologia das abelhas

As abelhas apresentam posição de destaque entre os Hymenoptera em virtude da sua principal contribuição na natureza: a polinização (Carvalho-Zilse, 2006). As abelhas fazem parte da superfamília Apoidea com os mais variados graus de sociabilidade. Estão descritas 16.325 espécies vivas de abelhas, distribuídas em 425 gêneros pertencentes a sete famílias (Michener, 2000).

As abelhas, desde longa data, têm sido criadas pelo homem para a produção de mel, cera, pólen e própolis (Kerr *et al.*, 1996), entretanto, estes insetos atuam como importantes agentes polinizadores dos quais muitas espécies de plantas necessitam para sua reprodução e manutenção da variabilidade genética. Dessa ação polinizadora feita por esses insetos (Figura 1), depende a produção de frutos e sementes que servem de alimentos a incontáveis outras espécies (Silveira *et al.*, 2002).



Figura 1. Abelha da espécie *Melipona interrupta manaosensis* visitando flor.

As abelhas se alimentam quase que exclusivamente de pólen e néctar e precisam visitar um grande número de flores para satisfazerem suas necessidades

individuais, das crias e da colônia (Corbet *et al.*, 1991). Por este motivo são mais eficientes polinizadoras, pois 90% das espécies de plantas com flores e 80% dos vegetais de interesse econômico são polinizados por esses insetos (Nogueira-Couto, 1998).

O sistema de acasalamento dos himenópteros pode ser dividido em endogâmico e panmítico, ou seja, quando os machos se acasalam obrigatoriamente com suas irmãs ou mãe ou ao acaso, respectivamente (Kerr *et al.*, 1996). O principal mecanismo de determinação de sexo nas abelhas é haplodiplóide, ou seja, ovos fertilizados produzem fêmeas que são diplóides (2n) e ovos não fertilizados dão origem aos machos haplóides (n) (Carvalho, 2001). Entretanto, podem ser originados machos diplóides a partir de ovos fertilizados que apresentam homozigose no loco CSD (*Complementary Sex Determination*) determinante de sexo (Hansselmann *et al.*, 2008), sendo estes machos inviáveis para a reprodução (Carvalho, 2001). Os machos diplóides das populações panmíticas, em geral, são estéreis, ou cegos, ou têm o número de espermatozoides muito menor, ou são mortos pelas operárias ao emergirem dos favos (*Melipona*), ou são comidos pelas operárias antes de terem oito dias de vida larval (*Apis mellifera*) (Kerr *et al.*, 1996).

1.2 Os Meliponini

Dentre os Apoidea, a família Apidae é constituída de abelhas corbiculadas. Destacam-se as altamente sociais com ferrão (Tribo Apini) e sem ferrão (Meliponini) de acordo com Michener (2007). As abelhas ditas ~~as~~ abelhas sem ferrão+apresentam ferrão vestigial e vivem em colônias perenes com algumas dúzias a até centenas de indivíduos (Kerr *et al.*, 1996).

As características morfológicas comuns dos meliponínios são aquelas geralmente descritas para os demais insetos e artrópodes em geral, onde membros e apêndices segmentados e articulados são necessários devido ao rígido exoesqueleto constituído principalmente de quitina (Kerr *et al.*, 1996). Entretanto, as abelhas desta tribo se diferenciam das outras por características particulares como: ferrão atrofiado, redução e fragilidade de venação e pela ausência de pêlos nos olhos (Moure, 1961; Michener, 1990).

O nível de organização social, ou seja, a eussocialidade, comum a todos os meliponínios, é caracterizada pela sobreposição de gerações dentro da colméia e divisão de trabalho reprodutivo entre as castas (rainha e operária) (Michener, 2000).

As rainhas e machos são responsáveis pela reprodução (Figura 2) e as operárias cuidam da prole e da manutenção da colônia (Wilson, 1971) (Figura 3).



Figura 2. Ninho de *Melipona scutellaris* com rainha fisogástrica em destaque (círculo).



Figura 3. Abelhas operárias de *Melipona scutellaris* cuidando da prole.

Conforme Kerr (1996) nos meliponínios a dominância da rainha em relação às operárias é exercida através de sinais de dominância ritualizados, além da parte feromonal. Os enxames nidificam em vários locais, sendo que a grande maioria usa ocos de árvores (Figura 4), em diferentes alturas. Os ninhos são construídos basicamente de batume (própolis e barro) e cerume (cera e própolis) (Nogueira-Neto, 1997).



Figura 4. Corte longitudinal de um oco de árvore, mostrando a estrutura interna de um ninho de meliponínio (**A**- casulo; **B**- células de cria; **C**- Potes de mel e pólen).

1.2.1 Distribuição mundial dos meliponínios

As abelhas da Tribo Meliponini apresentam ampla distribuição pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Figura 5) e estima-se que exista um grande número de espécies não descritas (Michener, 2007). Camargo e Pedro (2007) citam 32 gêneros exclusivamente neotropicais, com 391 espécies reconhecidas.

Distribuem-se nas regiões de clima tropical e subtropical do planeta, exceto ao leste das Ilhas Salomão no Pacífico; ao sul estendem-se para as regiões temperadas na Austrália, América do Sul e na África, e para o Norte vão um pouco além do Trópico de Câncer (Michener, 2007). Sua maior diversidade encontra-se nos trópicos (região Neotropical e Indo-Malaia) apesar de certos táxons estarem restritos a zonas subtropicais do hemisfério sul (Moure, 1961; Kerr e Maule, 1964; Camargo, 1989; Michener, 1990; Camargo e Pedro, 1992; Nogueira-Neto, 1997).

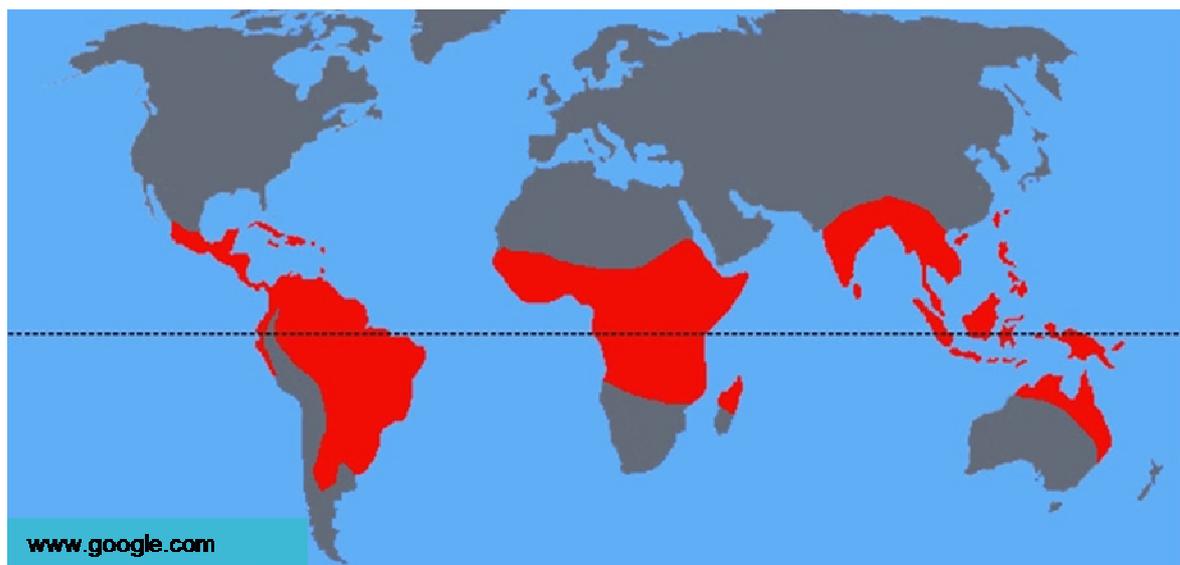


Figura 5. Regiões de distribuição dos Meliponínios (destaque em vermelho) no mundo.

Os meliponínios formam grupos isolados e mais especializados, onde os indivíduos dependem das características climáticas e florísticas de suas respectivas regiões de origem (Kerr, 1996).

Dos gêneros existentes no Brasil, *Melipona* é o que apresenta o maior número com 192 espécies conhecidas (Silveira *et al.*, 2002). Muitas espécies de meliponínios são nativas do Brasil e demonstram uma refinada e longa evolução e adaptação aos mais variados ecossistemas existentes neste país (Carvalho-Zilse, 2006).

1.2.2 Importância ecológica, econômica e social dos meliponínios

Muitas são as razões para estudar e criar abelhas sem ferrão: algumas estão em perigo de extinção, principalmente, devido à destruição do seu habitat pelo homem (Kerr, 1996; Kerr, 2002a; Kerr, 2002b); são considerados animais de

convivência pacífica; são os principais agentes de polinização da flora nativa, chegando a ser responsáveis por até 90% da polinização conforme o ecossistema (Kerr *et al.*, 2001); contribuem de forma direta nos programas de reflorestamento e de melhoria do pasto apícola, assim como, para melhores rendimentos da fruta e de sementes dos vegetais (Imperatriz-Fonseca *et al.*, 2006), sobretudo das culturas de importância econômica para o homem (Slaa *et al.*, 2006), como por exemplo a maçã, café, guaraná etc.

Apresentam importância econômica e social, pois quando cultivadas podem gerar fonte de renda a muitas famílias pela venda de seus produtos como mel e pólen, assim como, com a reprodução e venda de colméias (Carvalho *et al.*, 2003). Proporciona convívios sociais entre os criadores que ficam constantemente buscando orientações sobre como melhorar a sua criação. Também são úteis em programas de Educação Ambiental (Figura 6) (Kerr *et al.*, 1996), por serem facilmente manipuladas por pessoas de qualquer idade.



Figura 6. Oficina de Educação Ambiental sobre abelhas e meio ambiente.

A atividade de criação de meliponínios denomina-se Meliponicultura (Figura 7). É uma atividade tradicional em quase todas as regiões do Brasil e onde as colônias são mantidas em cabaças, cortiços, caixas rústicas ou padronizadas. Começou primeiramente pelos indígenas e foi, ao longo dos tempos, praticada por pequenos e médios produtores, despertando interesses de novos criadores e de instituições (Kerr *et al.*, 1996). Entretanto, a atividade de exploração de produtos de

meliponínios é bastante antiga, com registros dessa prática desde os Maias (Costa-Pinto, 2007).

Dentre as mais de 200 espécies nativas, a abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* popularmente conhecida como Uruçu do Nordeste, destaca-se como economicamente útil, constituindo sustento de diversas famílias nordestinas. Esta espécie é de grande relevância para a meliponicultura nacional, pois essa é a espécie de abelha do gênero *Melipona* mais estudada e criada no Brasil (Carvalho-Zilse e Kerr, 2004).



Figura 7. Criação técnica de meliponínios (Meliponicultura).

1.3 Caracterização da espécie

No Brasil, uma das primeiras espécies domesticadas foi a espécie *M. scutellaris* Latreille, 1811 (Figura 8) pelos indígenas e, mais tarde, pelos portugueses que dominaram a técnica de criação. Estes selecionaram colônias para maior produção de mel, dando início à criação de meliponínios no Nordeste brasileiro, que se denominou Meliponicultura racional (Kerr, 1998).

Mariano Filho (1911) afirmou que a abelha *M. scutellaris* se distribuía desde a Amazônia até o Estado da Bahia. Esta afirmação pode ser pelo fato de que vieram para a Amazônia muitos nordestinos na época da colonização e trouxeram os seus

termos regionais atribuindo %uruçu+ para algumas abelhas amazônicas (Nogueira-Neto, 1970).



Figura 8. Espécie de abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* Latreille, 1811.

O termo %uruçu+ que significa na língua tupi %abelha grande+ desperta a exploração de seus ninhos por parte de meleiros que visam o mel para utilização como medicamento, levando à diminuição das populações naturais.

Os desmatamentos, madeireiras, extrativismo e aração, que levam a destruição de ninhos no solo e ocos de árvores, contribuem também para o processo de desaparecimento de populações desses insetos (Carvalho-Zilse, 2006).

Os ninhos de *M. scutellaris* têm entrada típica, sempre com abertura no centro de raias de barro convergentes, sendo que também podemos encontrar ninhos cujas raias de barro são elevadas que lembram uma coroa, frequentemente voltada para baixo. A entrada que dá passagem para as abelhas é guardada por uma única operária (Figura 9).



Figura 9. Entrada de ninho de *Melipona scutellaris* evidenciando a abelha guarda.

Segundo Almeida (1974), as principais árvores da mata pernambucana onde *M. scutellaris* nidifica são: Ingá (*Inga sp*), Pau de arco roxo (*Tabebuia avellanadae*), Pau pombo (*Tapirira guianensis*), Mungaba (*Bombax gracilipes*), Camaçari (*Caraipa densifolia*), Embiriba (*Eschweilera luschnathii*), Jatobá (*Hymenaea martiana*), Cajá (*Spondias lútea*), Pau de alho (*Galezia gorazema*) Sucupira mirim (*Bowdichia virgilloides*), Prijui (*Micropholis sp*), Louro (*Ocotea sp*), Pau de arco (*Tabebuia roseoalba*), Murici (*Byrsonima sericea*), Pau de arco amarelo (*Tabebuia chrysotricha*), Visgueiro (*Parkia pendula*). Na região de Catu-BA, as famílias botânicas mais visitadas pela urucu para as coletas de néctar foram Mimosaceae, Caesalpinaceae e Myrtaceae (Carvalho *et al.*, 1998), dados também encontrados por Almeida (1974) na região de Pernambuco.

Atualmente, a distribuição de *Melipona scutellaris* se restringe a áreas de matas úmidas no nordeste do Brasil, onde utiliza ocos de árvores para nidificação. Devido a ações antrópicas, como desmatamento, intensificação de atividades agrícolas e também às mudanças climáticas, as populações tem sofrido severas reduções, tanto em número quanto na dimensão de sua área de distribuição original (Giannini *et al.*, 2010). No Estado da Bahia esta espécie está presente em grande

área geográfica, destacando-se o litoral e as serras da chapada, associadas principalmente às áreas de matas úmidas (Alves, 2010).

1.4 Marcadores Genético-Moleculares

Marcadores genéticos são ferramentas muito utilizadas para estudo e análise de DNA. Marcador molecular são locos gênicos que apresentam variabilidade e podem ser usados para verificar diferenças entre dois ou mais indivíduos, duas ou mais populações (Avisé, 1994; Silva e Russo, 2000).

Com o desenvolvimento das tecnologias modernas e avanços da genética e da biologia molecular, principalmente com a tecnologia do DNA recombinante, da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e do sequenciamento automático do DNA, houve o surgimento de vários tipos de marcadores moleculares que detectam o polimorfismo genético diretamente no DNA, apresentando como vantagens a obtenção de um número quase ilimitado de polimorfismos genéticos, identidade do genótipo sem a influência ambiental, e possibilidade de gerar maior quantidade de informação genética por loco no caso de marcadores co-dominantes (Faleiro, 2007). O polimorfismo é a ocorrência regular e simultânea na mesma população heterozigota de dois ou mais tipos distintos de formas de alelos (Faleiro, 2007).

Entre os diversos marcadores genéticos existentes, os marcadores microssatélites vêm sendo apontados como a classe de marcadores mais informativa na estimação de parâmetros genético-populacionais (Gao *et al.*, 2002; Conte, 2004). Os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) são sequências de uma a seis bases de comprimento repetidas consecutivamente (*in tandem*) e são raros em regiões codificadoras (Hancock, 1999). Eles estão distribuídos aleatoriamente pelo genoma (Schlötterer e Wiehe, 1999). Apresentam altos níveis de polimorfismo, são multialélicos e são co-dominantes, contendo maior quantidade de informação genética por loco (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Utilizando iniciadores que flanqueiam as regiões repetitivas, os locos microssatélites podem ser amplificados através da PCR. A PCR é uma técnica que envolve a síntese enzimática *in vitro* de sequências de DNA alvo as quais são duplicadas a cada ciclo criando uma reação em cadeia, pois cada molécula sintetizada pode servir de molde para o próximo ciclo (Faleiro, 2007). Conforme Lopes (2008) o polimorfismo nos microssatélites corresponde a diferença de tamanho dos fragmentos encontrados. Desta forma, cada elemento amplificado que

possua um tamanho diferente, representa um alelo diferente do mesmo loco (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Apesar de comumente serem considerados marcadores neutros, ou seja, que não apresentam relação com efeitos fenotípicos, há evidências de os SSRs não estão distribuídos ao acaso em regiões codificantes de proteínas, em UTRs e em introns. You-Chun *et al.* (2004) apresentam uma revisão da distribuição de SSRs dentro ESTs (expressed sequence tags) e genes incluindo codificantes de proteínas, 5q e 3q UTRs e introns, discutindo as consequências das trocas no número de repetições SSR nestas regiões tanto para procariotos quanto eucariotos. Estes autores observaram que os efeitos causados pela expansão ou contração de SSR dentro dos genes podem eventualmente levar a trocas fenotípicas, o que indica que SSRs dentro de genes podem estar sujeitos a forte pressão seletiva mais que em outras regiões do genoma em consequência da sua importância funcional. Desta forma, SSR podem fornecer base molecular para uma rápida adaptação a mudanças ambientais tanto em procariotos como em eucariotos. Em animais, aproximadamente 10% dos SSR estão em regiões codificantes (Edwards *et al.*, 1998; Jurka e Pethiyagoda 1995; van Lith e van Zutphen 1996; Moran 1993) em cereais, até 7,5% das EST são microssatélites (Kantety *et al.* 2002; Thiel *et al.* 2003). SSRs desenvolvidos a partir de ESTs (EST-SSR ou eSSR) podem ser usados como marcador funcional putativo para sinalizar genes funcionais correspondentes (Guo *et al.*, 2007).

1.4.1 Uso de marcadores microssatélites em abelhas

Estoup *et al.* (1993) desenvolveram os locos microssatélites de *Apis mellifera* e *Bombus terrestris*, dando início ao estudo genético em abelhas com o uso de marcadores microssatélites. Em 1995 os autores verificaram as variações dos microssatélites em *Apis mellifera* para estudo de estrutura populacional e encontraram padrões de variações em várias partes do mundo. Em 18 locos da espécie de *Apis mellifera* analisados, 18 eram polimórficos (Rowe *et al.*, 1997). Em 1998, Peters *et al.* desenharam os primeiros *primers* específicos para o gênero *Melipona*, sendo desenvolvidos na espécie *M. bicolor*, e testados em operárias adultas coletadas em vários meliponários de São Paulo dentre os quais 18 locos se mostraram polimórficos.

Desde então, muitos trabalhos vem sendo realizados utilizando estes marcadores e demonstrando a alta possibilidade de uso de *primers* heterólogos entre espécies do gênero *Melipona*. Paxton *et al.* (1999) derrubaram a teoria de que no grupo dos meliponínios as fêmeas se acasalam com um só macho utilizando locos desenvolvidos para *M. bicolor*. Soares (2001) confirmou a poliandria também para *M. scutellaris*, analisando sete locos evidenciando que mais de um macho se acasala com a rainha nesta espécie.

Francisco (2002), a partir de sete locos polimórficos para *M. bicolor* e *S. postica*, mostrou que não há fluxo gênico entre colméias de *Plebeia remota* provenientes de duas cidades diferentes do Paraná, mas que estavam mantidas no mesmo meliponário há vários anos.

Carvalho-Zilse e Kerr (2006) utilizaram microssatélites para estudos populacionais em *Melipona scutellaris*. Dos dez *primers* heterólogos específicos para *M. bicolor* testados em *M. scutellaris*, sete foram utilizados com sucesso. A partir destes pôde-se observar uma boa frequência de heterozigotos, refletindo comportamento de migração a curtas distâncias. Os autores também testaram *primers* desenvolvidos para *Apis mellifera* e não obtiveram bons resultados em *M. scutellaris* revelando bandas fracas e inespecíficas, indicando que a transferência destes marcadores é melhor entre grupos mais próximos. Quezada-Euán *et al.* (2007), utilizando *primers* microssatélites heterólogos desenvolvidos para *M. bicolor*, *B. terrestris* e *T. carbonaria*, verificaram diferenças morfológicas e moleculares entre populações de *M. beecheii* geograficamente distantes.

Carvalho-Zilse *et al.* (2009), analisaram a variabilidade genética e estruturação populacional em *Melipona scutellaris* oriundas de meliponários de quatro Estados brasileiros (Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia). O estudo se baseou em cinco locos microssatélites e os autores utilizaram cinco *primers* heterólogos desenvolvidos para *Melipona bicolor*, obtendo sucesso nas ampliações. Trinta e um dos alelos encontrados estavam bem distribuídos entre as populações de *M. scutellaris*.

Francini *et al.* (2009), desenharam 15 *primers* para locos microssatélites de *Melipona seminigra merrillae* e 11 de *Melipona interrupta manausensis*, ambas, abelhas sem ferrão da Amazônia. Testando os quinze *primers* em *M. seminigra* foi possível a detecção de nove locos polimórficos com o número de alelos por loco variando de dois a oito. Os *primers* específicos para *M. interrupta manausensis* foram testados para amplificação cruzada em três espécies de *Melipona*: *M.*

eburnea, *M. rufiventris* e *M. seminigra merrillae*, nove dos marcadores microssatélites se mostraram polimórficos e dois monomórficos.

1.5 Produtividade em *Melipona*

A exploração dos produtos de abelhas pelo homem, principalmente mel e pólen, é uma prática bem antiga. No Brasil os índios utilizavam esses produtos de meliponínios como remédio e complemento alimentar muito antes da chegada dos colonizadores. A criação de abelhas sem ferrão foi passada de geração a geração e persiste até hoje, sendo uma atividade que ocorre praticamente em todos os estados brasileiros, principalmente no norte e nordeste. Esta prática levou pesquisadores a desenvolverem vários estudos sobre meliponínios, visando a utilização técnica e conservação destes na natureza.

É comum os meliponicultores buscarem um melhor desempenho de suas colônias de meliponínios quanto à produtividade de mel e pólen. Para isso, fazem intensa multiplicação de suas colônias e troca e/ou inserção de rainhas férteis entre as colméias para alcançar o objetivo, sem atentar para a seleção ou melhoramento genético para aumento da produtividade. Conforme Kerr (1996) quando uma rainha de *Melipona* produz machos diplóides, as operárias matam os machos e também a rainha. Essa variabilidade genética, diminuída por parte da perda de alelos *csd* é resultado do número de colméias na área de reprodução, recomendado número superior de 44 colônias para que se mantenha a variabilidade evitando a morte de colônias (Kerr & Vencovsky, 1982).

A seleção e melhoramento genético de colméias de abelhas nativas sem ferrão ainda é uma atividade incipiente no Brasil e as primeiras iniciativas para seleção e melhoramento genético das colméias estão em andamento. De acordo com Souza (1995), nos estudos com abelhas é possível a utilização de vários tipos de sistemas de acasalamentos e de seleção com vistas à obtenção de colônias geneticamente superiores. O desempenho das colônias é o resultado das interações entre composição genética da população e o ambiente, o que tornam as rainhas peças fundamentais em qualquer estratégia para melhoria da produtividade das colméias, uma vez que, por meio de suas qualidades herdáveis, estão intimamente ligadas às suas colônias. Desta forma, a herdabilidade genética causa um grande impacto sobre os interesses humanos, pois grande parte dos alimentos que consumimos, são oriundos de organismos de interesse econômico que podem ser

melhorados geneticamente com o objetivo de explorar ao máximo o potencial das espécies conhecidas (Waldschmidt, 2003).

Estudos visando a produtividade em meliponíneos estão em andamento. Rebelo (2011) estudou pela primeira vez a composição nutricional, química e espectroscópica de pólen de abelhas sem ferrão da Amazônia usando a técnica inovadora de RMN (Ressonância Magnética Nuclear), tendo como um dos resultados na pesquisa, a descoberta de ácido acético no pólen, sugerindo-se fermentação acética pela ação de bactérias, provavelmente devido à elevada umidade apresentada pelo produto.

Evangelista-Rodrigues *et al.* (2008) analisaram a produtividade em colméias de *Melipona scutellaris*, avaliando os seus parâmetros produtivos em ambiente de criação. Foi usado como parâmetro o armazenamento de alimento e feita contagens dos potes nas colméias classificando-os como: potes abertos, potes fechados e potes vazios, separando-os de acordo como conteúdo (mel ou pólen). Os resultados mostraram que existe uma correlação com o crescimento da colônia e o período de florada da região e que colônias nidificadas em caixas do mesmo tamanho e sob as mesmas condições climáticas e locais, apresentam crescimento diferenciado.

Alves (2010) analisou os parâmetros biométricos e produtivos de colônias de abelhas sem ferrão, usando sessenta acessos Parentais e duas gerações consecutivas de *Melipona scutellaris*. Os acessos foram provenientes de diversas localidades do Estado da Bahia e a avaliação realizada a cada ciclo de 90 dias. Inicialmente foram estudados nos acessos parentais os seguintes parâmetros biométricos para verificar variações que indicasse a possibilidade de seleção: número dos potes de pólen e potes de mel; tamanho dos potes de pólen e potes de mel; peso dos potes de pólen; volume dos potes de mel; produção de pólen; produção de mel; peso da colônia; tamanho da glossa; tamanho dos favos; número de favos; estimativa da população; área da corbícula e massa da rainha fisogástrica das colônias Parentais. Desta análise inicial, treze parâmetros apresentaram diferenças significativas e foram utilizados para verificar correlação entre características produtivas e biométricas em 165 colônias de *M. scutellaris* das gerações F1 e F2, apresentando resultado positivo em quatro interações: número dos potes de pólen X produção de pólen; tamanho dos potes de pólen X peso dos potes de pólen; produção de mel X número de potes de mel; tamanho dos potes de mel X volume dos potes de mel. O autor verificou também a herdabilidade dos parâmetros biométricos e produtivos em 165 colônias pertencentes a diferentes

gerações do programa de cruzamento de *M. scutellaris*. Os cinco parâmetros de herdabilidade que apresentaram maior representabilidade - a produção de mel, a produção de pólen, o peso da colônia, o tamanho da glossa e tamanho dos favos - foram utilizados para a classificação de produtividade de 52 colônias da geração F2 na florada de eucalipto. O trabalho desenvolvido por Alves permitiu a classificação de colônias de *M. scutellaris* em mais produtivas e menos produtivas, de acordo com os parâmetros que utilizou na pesquisa. Trinta colônias da geração F2 (15 mais produtivas e 15 menos produtivas) forneceram o material biológico utilizado nesta dissertação, como será apresentado na seção Material e Métodos.

Muitos estudos sobre abelhas estão baseados nas características morfológicas e comportamentais destes animais. Devido à grande importância que as abelhas apresentam na natureza e a relação que mantém com o homem, principalmente na economia e alimentação, promovendo sustento e/ou complemento financeiro a diversas famílias, é relevante que se estude estes animais para melhoria de rendimento produtivo e para conservação destes na natureza.

Em meliponínios estudos com base na genética molecular são bastante recentes. Marcadores microssatélites tem sido aplicados com sucesso em diferentes análises genéticas em meliponínios, especialmente em estudos genético-populacionais. No entanto, esta é a primeira investigação sobre uma possível correlação destes marcadores com produtividade em colônias de abelhas sem ferrão.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a possível correlação entre marcador genético e produtividade em colônias de *Melipona scutellaris* visando disponibilizar um marcador molecular de rastreabilidade de colméias.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar, por meio de marcadores microssatélites, colônias mais e menos produtivas de *Melipona scutellaris*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Cinco abelhas operárias adultas de cada uma de 15 colônias mais produtivas (75 indivíduos) e 15 colônias menos produtivas (75 indivíduos) de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 foram utilizadas para as análises de DNA microssatélite. As amostras utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir de um plantel de 60 acessos oriundos de diversas áreas de ocorrência da espécie *M. scutellaris* no estado da Bahia, conforme limites de distribuição das áreas de registro definidos por Alves (2010). Tais colônias serviram de material biológico para desenvolvimento da Tese de Doutorado de Rogério Marcos de Oliveira Alves da Universidade Federal do Recôncavo Baiano (UFRB), cidade Cruz das Almas . BA. Após aclimação no Meliponário da UFRB, as colônias foram multiplicadas formando a geração F1. De acordo com 13 parâmetros biométricos e produtivos, as colônias foram classificadas em mais produtivas, menos produtivas e intermediárias. Em seguida, as rainhas das mais produtivas foram trocadas de colônias com as rainhas menos produtivas. Em sequência, as colônias foram multiplicadas e formaram a geração F2. Na geração F2, 52 colônias foram avaliadas quanto à produtividade numa florada de eucalipto, sendo utilizados os cinco parâmetros de herdabilidade mais significativos para tal classificação, a saber: a produção de mel, a produção de pólen, o peso da colônia, o tamanho da glossa e tamanho dos favos. A partir destas análises, as colônias foram classificadas em mais (+PD) e menos produtivas (-PD) e, de cada colônia, foram coletadas as operárias adultas para este trabalho.

Estas amostras foram colocadas em álcool absoluto e enviadas ao Laboratório de Genética de Abelhas (LGA) do Grupo de Pesquisas em Abelhas (GPA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) local onde foram realizadas as análises genéticas.

3.2 Extração e quantificação de DNA

Do tórax individual das amostras, o DNA total foi extraído utilizando o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), conforme instruções do fabricante e com algumas modificações, seguiu-se o seguinte protocolo, a saber: o tórax de cada

uma das 150 abelhas operárias foi separado do restante do corpo e colocado individualmente em microtubos de 1,5 mL para congelamento a -80 °C. Após o congelamento, foi macerado até que estivesse todo fragmentado. Em cada tubo, contendo o tórax macerado, foram adicionados 600 μ L do mix contendo EDTA 0,5M pH 8,0 + Nuclei Lysis Solution previamente preparados e refrigerados em gelo. A seguir foi adicionado 17,5 μ L de Proteinase K (10mg/ μ L). As amostras foram, então, incubadas em banho seco a 55 °C em overnight. Adicionou-se 3 μ L de Solução de RNase (1 μ g/ μ L) ao lisado nuclear e homogeneizou-se manualmente cinco vezes por inversão, incubando-se no banho seco a 37° C por 25 minutos. Após retirar os microtubos da incubadora, estes foram resfriados por cinco minutos a temperatura ambiente. Adicionou-se 200 μ L de Protein Precipitation Solution agitando-se vigorosamente no μ vórtex+por 20 segundos. Os microtubos foram, então, colocados no gelo por cinco minutos. A seguir, os tubos foram centrifugados por 10 min/13.400 rpm à temperatura ambiente. Transferiu-se o sobrenadante para microtubos de 1,5 mL completando-se o volume com Isopropanol absoluto a temperatura ambiente para precipitação do DNA. Homogeneizou-se manualmente por inversão por 10 minutos e centrifugou-se a 11.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. O Isopropanol absoluto foi descartado e adicionou-se 600 μ L de etanol 70% gelado (-20 °C). Então, os microtubos foram invertidos para lavar bem o *pellet* e centrifugados por 10 min a 11.000 rpm. Retirou-se o etanol cuidadosamente para não descolar o *pellet* e inverteu-se os tubos em papel toalha, deixando secar naturalmente até escorrer bem o fluxo do etanol. Adicionou-se 100 μ L de Rehydration Solution para hidratação do *pellet* por incubação a 65° C por 1 hora. As amostras foram estocadas a -20° C.

A integridade e a pureza do DNA extraído foram analisadas em equipamento NANODROP 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo scientific).

3.3 Testes de amplificação de DNA com *primers* heterólogos

Inicialmente foi utilizada uma única amostra de DNA de uma abelha *Melipona scutellaris*, correspondente a uma das colônias mais produtivas para teste de amplificação com 18 (dezoito) pares de *primers* heterólogos de locos microssatélites (Tabela 1) disponíveis no Laboratório de Genética de Abelhas (GPA-INPA). Destes, 06 (seis) foram desenvolvidos para *Melipona bicolor* (Peters *et al.*, 1998) e já

testados com sucesso em *M. scutellaris* por Carvalho-Zilse *et al.* (2009) e 12 (três desenvolvidos para *Melipona interrupta manaosensis* e nove para *Melipona seminigra merrillae*) por Francini *et al.* (2009) que pela primeira vez foram testados em *M. scutellaris*. As concentrações de reagentes, assim como a temperatura de anelamento e condições de ciclagem para otimizar a amplificação de DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (Mullis e Faloona, 1987) variaram para todos os locos neste primeiro momento de testes.

3.3.1 Amplificação dos locos microssatélites

Para realização do trabalho, dos 18 pares de *primers* testados, foram selecionados 10 pares que amplificaram locos polimórficos. Estes locos foram então analisados para um total de 150 abelhas adultas (operárias) das colônias mais (+PD) e menos produtivas (-PD).

A otimização da PCR, permitiu o ajuste da amplificação de todos os locos microssatélites a uma mesma concentração de reagentes, temperatura de anelamento, volume final e condições de ciclagem. As amplificações foram feitas em Termociclador Verity (Applied Biosystems).

Para a PCR de genotipagem em sequenciador automático foram adicionadas caudas M13 aos *primers* e sintetizados iniciadores M13 marcados com fluorescência FAM e HEX conforme técnica desenvolvida por Schuelke (2000), com algumas modificações nas concentrações dos reagentes na reação de PCR e condições de ciclagem, ambas descritas na seção Resultados e Discussão.

Os produtos das amplificações foram, então, submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (corado com gelRed) a 70V por 10 minutos e 90V por 50 minutos, utilizando 3,0 μ L de produto da PCR adicionado a 5,0 μ L de LOAD (Azul de Bromofenol + Xileno Cianol). A determinação do tamanho dos fragmentos amplificados foi feita usando marcador molecular *Ladder* 100 pb da Invitrogen.

Após a corrida eletroforética, os géis foram fotografados em sistema de fotodocumentação digital L-Pix . Locus para verificar amplificações positivas.

Tabela 1. Origens e sequências dos *primers* (F = forward; R = reverse) testados para locos microssatélites na amplificação de DNA em *Melipona scutellaris*

SSR loco	Sequências (5' 3')	Origem
Mbi11	F: 5'CGTTCGTTCTTCCCAAT3' R: 5'GATCGAATTTAACCGGC3'	<i>M. bicolor</i> ¹
Mbi13	F: 5'CCCCTAACAGCCAAAGCTAT3' R: 5'CGATGCCCACTTTTCGAC3'	<i>M. bicolor</i> ¹
Mbi28	F: 5'TTTTATCGCTCCTACCTCC3' R: 5'AATCCAACAGGACGGTGT3'	<i>M. bicolor</i> ¹
Mbi32	F: 5'CTTTATCCGGTGCCTCGAA3' R: 5'GAAGGCATTCCGGGTTGTT3'	<i>M. bicolor</i> ¹
Mbi36	F: 5'GCATCGGCGTCAGCCAG3' R: 5'GCGTGTGAGGCGGTGAAG3'	<i>M. bicolor</i> ¹
Mbi88	F: 5'CGCGCCGTACGTTCTGA3' R: 5'GCGCTCGAGCAGCGTT3'	<i>M. bicolor</i> ¹
MSM02	F: 5'GTATTGCTCGTTTTTCTTTTCT3' R: 5'AATTCGTGGCGTTGTTTT3'	<i>M. seminigra</i> ²
MSM03	F: 5'GCGCCCTAGCATCAGAAAC3' R: 5'CACGGGAAGACAAAAGACAAAT3'	<i>M. seminigra</i> ²
MSM04	F: 5'GAAAAGGCTCGATTAGGAAAGT3' R: 5'CAGCGATCGTGGTGAGAAAA3'	<i>M. seminigra</i> ²
MSM05	F: 5'GCGCCCTAGCATCAGAAAC3' R: 5'CACGGGAAGACAAAAGACAAAT3'	<i>M. seminigra</i> ²
MSM07	F: 5'AATTAGTAGCGCCTTCCTTCT3' R: 5'AGTAGTCCCATTGCTTCATTTT3'	<i>M. seminigra</i> ²
MSM08	F: 5'CGACGACGACGAGTAACAGT3' R: 5'GATTCCTCGACCATTCTTCC3'	<i>M. seminigra</i> ²
MSM09	F: 5'CGGCCCAAATTGTCTCCTC3' R: 5'ACCCATTTACCTTGCGTTCAT3'	<i>M. seminigra</i> ²
MSM12	F: 5'TCCTTCCCTCCTACTCAGAT3' R: 5'TCCTTCCCTCCTACTCAGAT3'	<i>M. seminigra</i> ²
MSM13	F: 5'TGATGACATGAGTGGGTAT3' R: 5'TATTGATGTGTCTCGTTTTAT3'	<i>M. seminigra</i> ²
MIM05	F: 5'TCTTCTACTCTCCTTCCCTCTC3' R: 5'AACAAACTGACATTCCAAACAC3'	<i>M. interrupta</i> ³
MIM07	F: 5'ACTAACCTCTTCTTTTGTCC3' R: 5'ACTCTTCGTCTCGTCGTG3'	<i>M. interrupta</i> ³
MIM08	F: 5'TTGAGCGAGGAATAGCAGAA3' R: 5'GCCTTAATTTACTCGTTTGATG3'	<i>M. interrupta</i> ³

¹Peters et al. (1998); ²Francini et al. (2009); ³Francini et al. (2010)

3.4 Genotipagem de locos microssatélites

A genotipagem das amostras foram realizadas em Analisador de DNA MegaBACE 1000 seguindo o seguinte procedimento: primeiramente foram identificadas as placas de 96 μ wells+para genotipagem e colocadas na luz UV por 15 minutos para esterilização. Em seguida preparado em microtubo um mix contendo Tween 0,1% + ET550-R padrão de genotipagem dando um μ órtex+vigoroso para homogeneizar os componentes. Para cada placa de genotipagem, foi preparada uma placa de 96 μ wells+ contendo em cada pocinho 60 μ L de tampão de carregamento LPA 1X. Também se preparou 12 tubos para MegaBACE 1000, sendo que, 06 contendo 600 μ L de tampão de carregamento LPA 1X e 06 contendo matriz para genotipagem. Para cada μ well+da placa de genotipagem foram aplicados 8,0 μ L do mix (Tween+ ET550-R) e 1,2 μ L de produto de PCR. As placas de genotipagem, logo após preparadas, foram cobertas com adesivos e envolvidas em papel alumínio. Em seguida, foram submetidas a um μ órtex+vigoroso para misturar bem o mix com o produto de PCR e μ spin+na centrífuga a 13.000 rpm por 10 segundos, para depois serem condicionadas em freezer a -20° C. Para injeção no MegaBACE 1000, as placas de genotipagem foram colocadas em termociclador (Eppendorf Gradiente) para desnaturação das amostras a 95° C por três minutos e refrigeradas em gelo. O tempo de injeção para genotipagem no MegaBACE 1000 foi de 100 minutos.

3.5 Análises dos dados

As análises estatísticas foram voltadas para parâmetros de variabilidade genética. Para verificar a diversidade genética usaram-se testes de estatística descritiva. As colônias foram agrupadas em duas grandes classes, colônias mais produtivas (+PD) e colônias menos produtivas (-PD). O padrão e o tamanho dos alelos presentes nos locos microssatélites utilizados no presente estudo, foram analisados no programa Fragment Profiler v1.2. Para verificar a ocorrência de amplificação preferencial e presença de alelos nulos foi utilizado o programa Micro-Checker (Oosterhout *et al.*, 2004).

Para a verificação da diversidade gênica, a quantificação de alelos por loco, a presença de alelos exclusivos, a heterozigosidade observada (H_o) (Nei, 1978), as

frequências alélicas, o equilíbrio de Hardy-Weinberg, as frequências genótípicas e as estatísticas F (Weir e Cockerham, 1984) utilizou-se os programas MSTOOLS e FSTAT v.2932 (Goldet, 1995).

As análises das colônias mais produtivas e menos produtivas foram feitas em separado, para que houvesse a possibilidade para fazer as comparações entre as mesmas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As extrações de DNA do tórax de um total de 150 abelhas (operárias) correspondente às colônias mais produtivas (75 amostras) e menos produtivas (75 amostras) mostraram uma variação de rendimento de 18 ng/ L a 674,7 ng/ L. Esta variação provavelmente foi em decorrência do tempo de estocagem dos indivíduos, o que pode deteriorar as amostras. O DNA de cada amostra foi diluído para uma concentração de 50ng/ L em um volume final 50 L de solução trabalho, exceto para o indivíduo cuja concentração de DNA na extração ficou abaixo de 50ng/ L.

Para todos os 18 (dezoito) pares de *primers* testados foram realizadas várias reações para otimizar a amplificação de locos microssatélites via PCR em *M. scutellaris*, variando concentração de reagentes, temperatura de anelamento e ciclagem. O loco MIM05 de *M. interrupta* não amplificou, sugere-se possível diferença de homologia nas sequências de DNA entre as duas espécies. Os locos MIM07 e MIM08 de *M. interrupta* e o loco MSM08 de *M. seminigra*, amplificaram, mas não de maneira satisfatória e, em todas as reações, apresentaram bandas inespecíficas (Figura 10 A e B). Estes locos foram descartados para as análises.

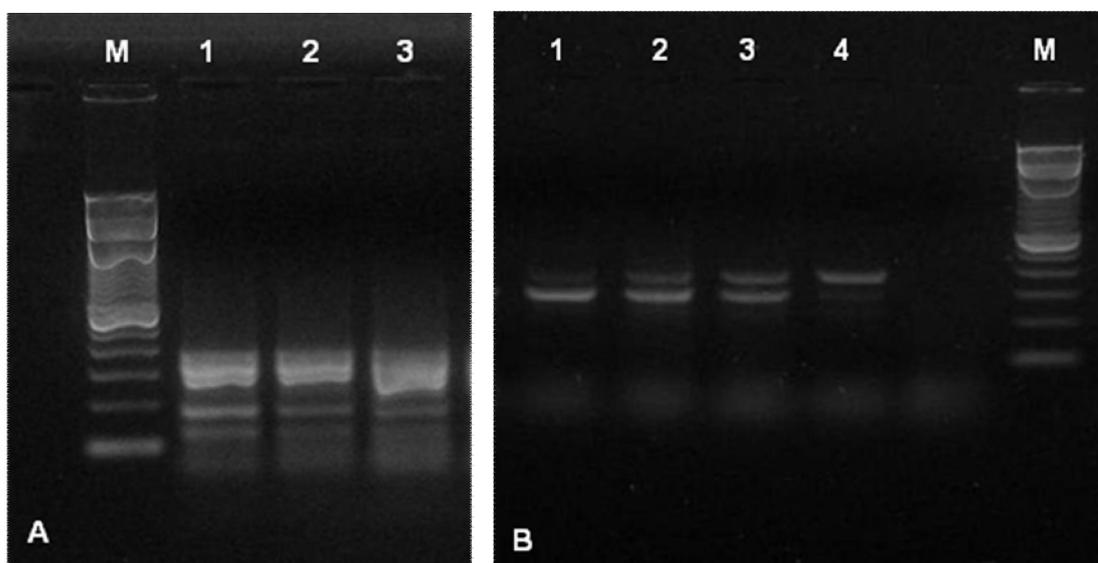


Figura 10. Perfil de amplificação em teste gradiente de temperatura dos locos MSM08 (A) e MIM07 (B) apresentando bandas inespecíficas em *Melipona scutellaris* em gel de agarose 1,5% corado com gelRed; **M**. Marcador de peso molecular de 100pb INVITROGEN; 1 a 4 - indivíduo de uma das colônias mais produtivas.

Os locos Mbi11, Mbi28, Mbi36, Mbi88 de *M. bicolor* (Figura 11A e B) também não amplificaram de maneira satisfatória, evidenciando bandas inespecíficas. Estes *primers* também foram excluídos da execução deste trabalho.

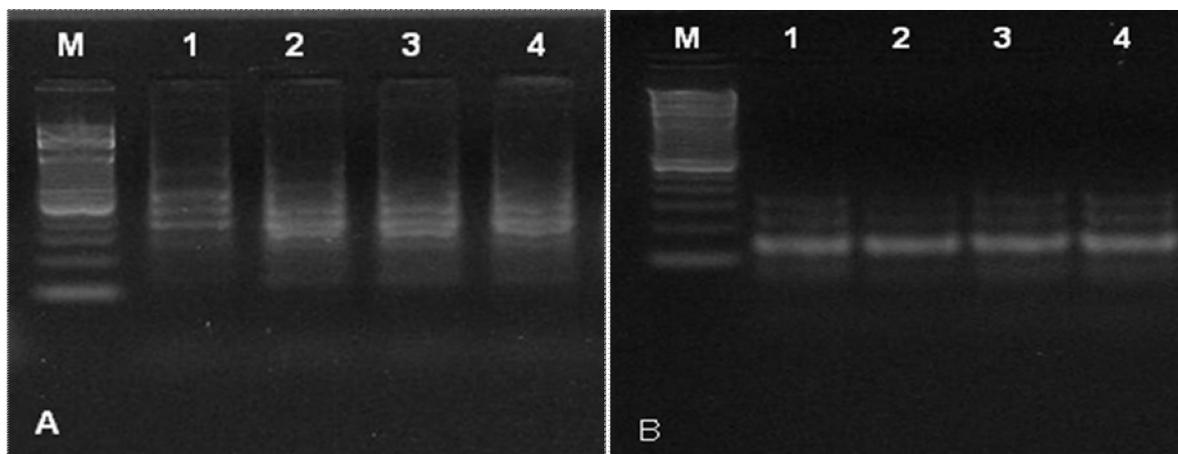


Figura 11. Perfil de amplificação em teste gradiente de temperatura dos locos Mbi36 (A) e Mbi11 (B) mostrando bandas inespecíficas em *Melipona scutellaris* em gel de agarose 1,5% corado com gelRed; **M** . Marcador de 100pb INVITROGEN; 1 a 4 - indivíduo de uma das colônias mais produtivas.

Dos *primers* heterólogos testados, foram selecionados 10 locos microssatélites polimórficos para análises do presente estudo, cujos motivos de repetição estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Origem, sequências e motivos de repetição dos *primers* selecionados e utilizados na amplificação de locos microssatélites em *Melipona scutellaris*.

Loco SSR	Motivo de repetição	Origem
Mbi13	(GTC) ₁₀	<i>M. bicolor</i> ¹
Mbi32	(GGA) ₆ (GGAGAA) ₅	
MSM02	(TC) ₅ (TCTT) ₅	<i>M. seminigra</i> ²
MSM03	(CA) ₉	
MSM04	(ACGATT) ₂	
MSM05	(GAAAGA) ₂	
MSM07	(AAAATT) ₂	
MSM09	(AC) ₃₆	
MSM12	(TGAAT) ₂	
MSM13	(ATAAA) ₃	

¹Peters *et al.* (1998); ²Francini *et al.* (2009)

A eletroforese dos locos Mbi13, Mbi32, MSM02, MSM03, MSM04, MSM05, MSM07, MSM09, MSM12 e MSM13 mostrou amplificação satisfatória sem produção de bandas inespecíficas (Figura 12), permitindo interpretar os resultados com segurança.

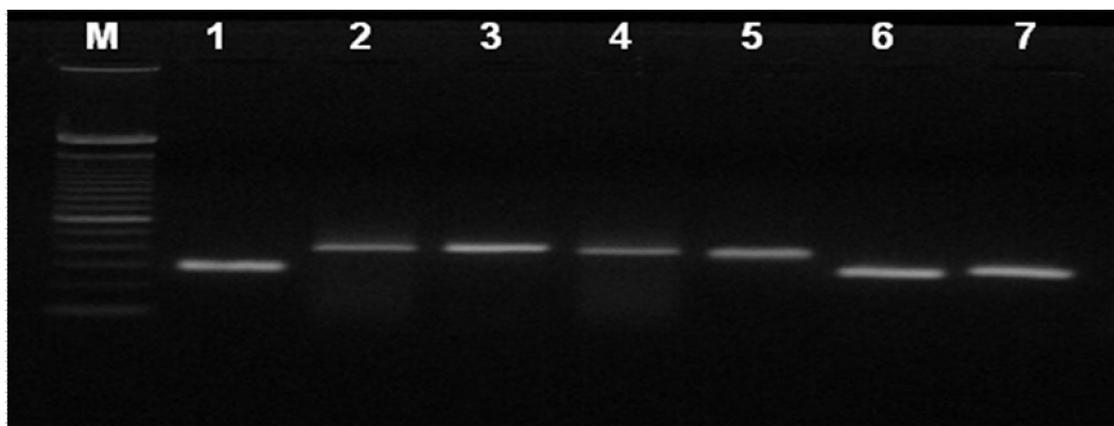


Figura 12. Perfil de amplificação dos locos MSM02 (1), MSM03 (2), MSM04 (3), MSM05 (4), MSM07 (5), MSM12 (6) e MSM13 (7) em *Melipona scutellaris* em gel de agarose 1,5% corado com gelRed; **M** - Marcador *Ladder* de 100pb INVITROGEN.

Para a amplificação dos locos microssatélites selecionados, as condições de concentração de reagentes para a PCR, a um volume final de 25 μ L, foram iguais para todos os locos MSM, exceto a concentração dos *primers* Mbi (Tabela 3) e acréscimo de BSA (*Bovine Serum Albumin* - 1X) para aumentar a estabilidade da DNA Polimerase na reação.

Tabela 3. Concentrações ótimas de reagentes para amplificação de locos microssatélites em *Melipona scutellaris* por PCR.

Reagentes	Concentração	
	Locos Mbi	Locos MSM
Tampão da enzima (Promega)	1X	1X
Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$)	2mM	2mM
Desoxinucleotídeos (dNTPs)	0,2 mM	0,2 mM
<i>Taq</i> DNA polimerase	1U	1U
<i>Primers</i> (<i>Forward</i> e <i>Reverse</i>)	1,4 pmol	0,4 pmol
DNA	50 ng	50 ng
BSA	1X	-

A temperatura de anelamento foi de 57°C para todos os locos e as condições de temperatura de ciclagem da PCR foram: 93°C por dois minutos, 93°C por 35 segundos, 57°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos (35 ciclos) e amplificação final a 72°C por 10 minutos.

A PCR usando *primers Forward* com cauda M13 (5'GTAAAACGACGGCCAGT3') na posição 5' também foi satisfatória (Figura 13).

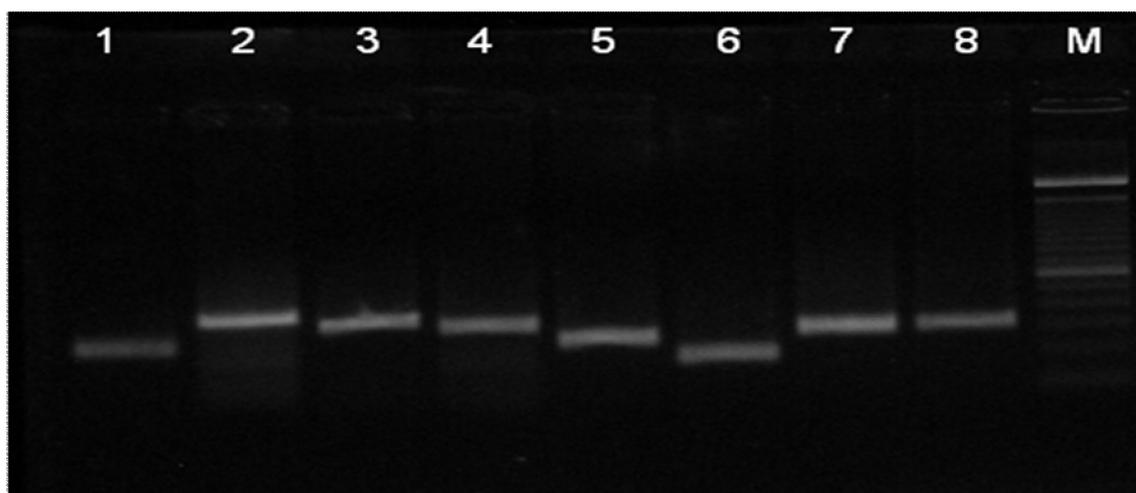


Figura 13. Perfil de amplificação teste com *primer* cauda M13 para os locos MSM02 (1), MSM03 (2), MSM04 (3), MSM05 (4), MSM07 (5), MSM09 (6), MSM12 (7) e MSM13 (8) em *Melipona scutellaris* em gel de agarose 1,5% corado com gelRed; **M** . Marcador de 100pb INVITROGEN.

Foram feitas as PCR para genotipagem com fluorescência FAM e HEX para todos os locos e para todas as amostras das colônias mais e menos produtivas (Figura 14).

A reação de PCR foi conduzida a um volume final de 12,5 μ L. As concentrações de reagentes para estas reações foram mantidas as mesmas das anteriores, exceto as concentrações dos *primers Forward* e *Reverse* devido à inserção na reação do *primer* M13 marcado com fluorescência FAM e HEX.

As concentrações dos reagentes foram: Tampão da enzima (Promega) 1X, MgCl₂ 2mM, dNTPs 0,2 mM, 1U de *Taq* DNA polimerase, *primer Forward* e *Reverse* 1,05 pmol (locos Mbi) e 0,3 pmol (locos MSM), *primer* M13 0,35 pmol (locos Mbi) e 0,1 pmol (locos MSM), 50ng de DNA molde e BSA 1X (locos Mbi).

Nesta etapa, a temperatura dos ciclos da PCR foi diferente à anterior somente no anelamento do *Primer* M13 (Tabela 4). A temperatura de anelamento de 57°C foi comum para todos os locos.

A marcação com fluorescências FAM ou HEX dos locos microssatélites (Tabela 5) se deu pelo tamanho do fragmento esperado (FE).

Na genotipagem em MegaBACE 1000, o padrão dos alelos presentes em todos os locos analisados (Figura 15) foi satisfatório.

Tabela 4. Condição de ciclos da PCR para amplificação dos locos microssatélites com *primer* M13 marcado com fluorescência.

Passo	Tempo	Temperatura	Etapas
1	2 min.	93° C	Desnaturação
2	35s	93° C	Desnaturação
3	30s	57° C	Anelamento dos <i>primers</i>
4	45s	72° C	Extensão
5	30 X (passos 2 a 4)	-	-
6	25s	93° C	Desnaturação
7	35s	53° C	Anelamento do <i>primer</i> M13
8	30s	72° C	Extensão
9	15 X o passo 6 a 8	-	-
10	15 min.	72° C	Extensão
11	Hold	4° C	-

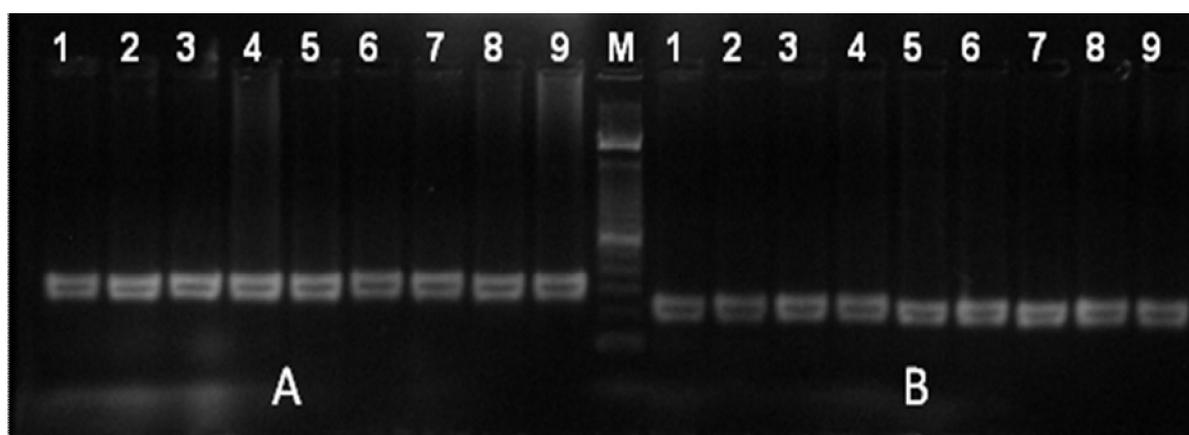


Figura 14. Perfil de amplificação com fluorescência FAM para os locos MSM07 (A) e MSM09 (B) em gel de agarose 1,5% corado com gelRed; **M** . Marcador *Ladder* 100pb INVITROGEN; A(1-9) e B(1-9) . nove indivíduos de colônias mais produtivas.

Não houve amplificação preferencial ou presença de alelos nulos nos locos de acordo com os resultados analisados, exceto para o loco Mbi32 que evidenciou possível presença de alelo nulo devido excesso de homozigoto.

Alelos nulos podem surgir devido a mutações na sequência de pareamento dos *primers* (Callen *et al.*, 1993). Segundo Chapuis e Estoup (2007) quando se utiliza *primers* em espécies diferentes para os quais estes foram desenvolvidos, é comum encontrarmos alelos nulos. No entanto, não se pode atribuir a carência de heterozigotos em uma população somente à utilização de *primers* heterólogos. O processo de endogamia também pode gerar excesso de homozigotos, diminuindo assim, a variabilidade genética. Considerando que as colônias analisadas no presente estudo estavam em confinamento e sob multiplicação intensa, era esperado que houvesse o cruzamento entre indivíduos aparentados.

Tabela 5. Tamanho de fragmentos esperados (FE) para locos microssatélites utilizados.

Locos	Tamanho fragmento (pb)	Marcação fluorescente
MSM03	291	FAM
MSM05	291	
MSM07	228	
MSM09	205	
Mbi13	129	
MSM02	227	HEX
MSM04	316	
MSM12	272	
MSM13	235	
Mbi32	154	

Locos Mbi - Peters *et al.* (1998); Locos MSM - Francini *et al.* (2009).

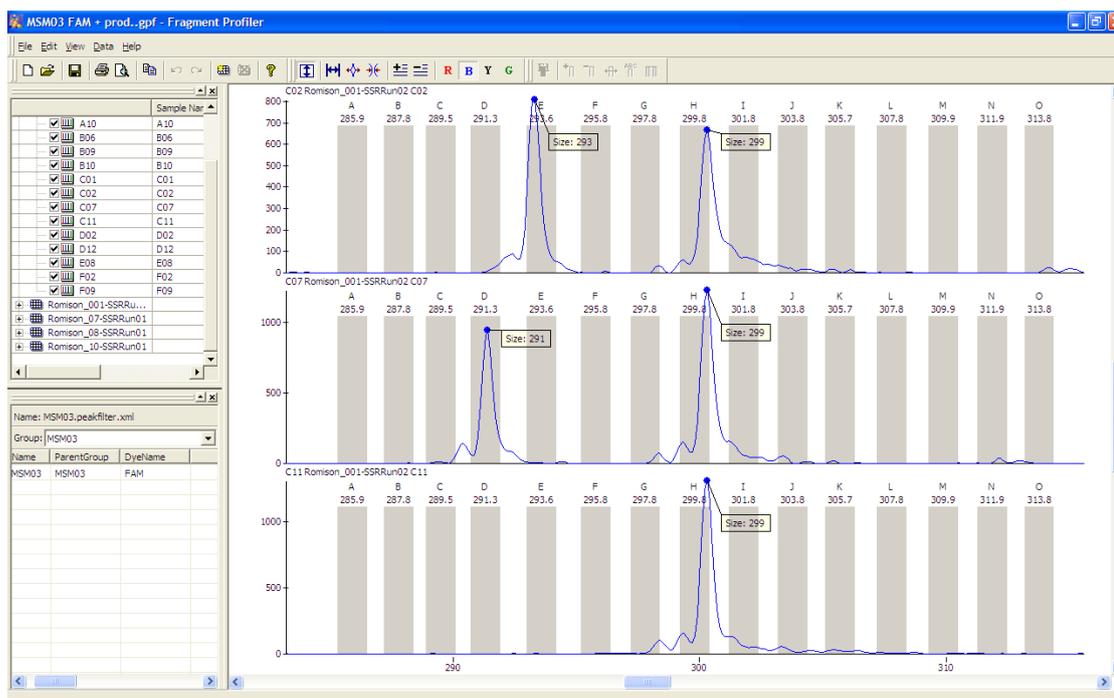


Figura 15. Padrão de genotipagem de alelos com fluorescência FAM analisado no programa Fragment Profiler v. 1.2, exemplificado pelo loco MSM03.

Em uma análise geral, todos os locos microssatélites amplificados em *M. scutellaris* se mostraram polimórficos e geraram 56 alelos de tamanhos variados, desde 102pb a 310pb (Tabela 6). O número de alelos por loco variou de dois (02) alelos a dez (10).

Comparando-se os resultados para os locos Mbi entre *M. scutellaris* e *M. bicolor* observa-se que houve uma variação em relação ao tamanho e número de alelos encontrados, o que indica que as regiões amplificadas apresentam sequências diferenciadas em tamanho entre as duas espécies (Carvalho-Zilse *et al.*, 2009). O mesmo se aplica para os locos MSM03, MSM04 e MSM09 quando comparados entre *M. scutellaris* e *M. seminigra*.

Utilizando os mesmos locos microssatélites Mbi em *M. scutellaris*, Carvalho-Zilse e Kerr (2006) amplificaram seis (6) alelos para Mbi13 variando o tamanho dos fragmentos entre 107pb a 122pb e dois (2) alelos para o loco Mbi32 com tamanhos entre 123pb a 126pb. Observa-se que houve variação entre os números de fragmentos amplificados para *Melipona scutellaris* neste trabalho em relação ao realizado por Carvalho-Zilse e Kerr (2006), contudo, verifica-se que o tamanho dos alelos são muito próximos (Mbi13-108pb e Mbi32-124pb) (Tabela 6). Esta variação do número e tamanho de alelos encontrados para *M. scutellaris* nos dois trabalhos, pode ser devido ao número amostral ou ainda a metodologia utilizada na separação

de fragmentos amplificados, pois, dependendo do suporte utilizado na separação, diferenças de poucos pares de bases podem ocorrer (Lopes, 2008).

Tabela 6. Heterozigidade observada (Ho), Número (N) e tamanho dos fragmentos (F) em pares de bases, amplificados em *Melipona scutellaris* comparado as espécies de origem dos primers.

Locos	<i>M. scutellaris</i>			<i>M. bicolor</i> ¹			<i>M. seminigra</i> ²				
	N	F		Ho	N	F	Ho	N	F	Ho	
Mbi13	4	102	105	108	0,39	4	129	0,88	-	-	-
		117									
Mbi32	6	118	121	124	0,48	4	154	0,66	-	-	-
		127	130	133							
Total	10					8					
Média	5				0,44	4		0,77			
MSM02	10	215	217	219	0,53	-	-	-	2	227	0,30
		221	223	225							
		227	231	233							
		235									
MSM03	9	267	269	271	0,68	-	-	-	3	291	0,68
		273	275	277							
		279	281	283							
MSM04	5	280	292	298	0,37	-	-	-	2	316	0,04
		304	310								
MSM05	7	257	263	269	0,32	-	-	-	3	291	0,14
		275	281	287							
		293									
MSM07	4	210	216	222	0,54	-	-	-	3	228	0,11
		228									
MSM09	7	137	141	143	0,78	-	-	-	8	205	0,51
		145	147	149							
		151									
MSM12	2	267	272		0,98	-	-	-	3	272	0,41
MSM13	2	230	235		0,18	-	-	-	3	235	0,32
Total	46								27		
Média	5,75				0,55				3,38		0,31

Locos Mbi - Peters *et al.* (1998); locos MSM - Francini *et al.* (2009).

Costa-Pinto (2007) também utilizou os dois primers para amplificar em *M. compressipes* e *M. seminigra*, obtendo respectivamente, sete (7) alelos para o loco Mbi13 (105 a 171pb) e três alelos (3) para o loco Mbi32 (145 a 166pb).

Para os locos microssatélites específicos de *M. seminigra* desenvolvidos por Francini *et al.* (2009) e testados neste trabalho pela primeira vez em *M. scutellaris*,

houve um maior número de alelos amplificados para a os locos MSM02, MSM03, MSM04, MSM05 e MSM07. Entretanto, para os locos MSM09, MSM12 e MSM13 o número de alelos amplificados foi menor comparado com o número de alelos encontrados pelos autores na espécie de origem. Observa-se também, que foram amplificados de dois (2) a dez (10) alelos por loco microssatélite em *M. scutellaris* e, na espécie de origem dos *primers* (*M. seminigra*) foram amplificados de dois (02) a oito (8) alelos por loco.

O loco MSM02 foi o que apresentou maior número de alelos, sendo dez (10) no total e variação de tamanho entre 215pb e 235pb. Francini e colaboradores (2009) amplificaram dois (2) alelos para esse loco. Percebe-se, no entanto, que para este loco o tamanho de fragmento amplificado em *M. seminigra* (227pb) também foi amplificado em *M. scutellaris* (227pb). Observa-se que os fragmentos amplificados em *M. scutellaris* de 228pb, 272pb e 235pb, respectivamente, para os locos MSM07, MSM12 e MSM13, também foram encontrados em *M. seminigra*. Estes resultados evidenciam que para estes locos as regiões de amplificação são bem conservadas em *M. seminigra* e *M. scutellaris*. Nota-se também que no loco MSM05 houve amplificação de fragmento (293pb) com tamanho próximo ao da espécie de origem dos *primers* (291pb). Tal diferença em poucos pares de bases certamente se deva ao método de separação de fragmentos amplificados (Lopes, 2008), onde neste trabalho foi usado fluorescência em sequenciador automático que consegue detectar diferenças em até um par de bases e Francini *et al.* (2009), utilizaram prata em poliacrilamida.

Quanto às heterozigosidades observadas (H_o) na comparação com as espécies de origem dos *primers* (Tabela 6), *M. scutellaris* apresentou heterozigosidade menor que a observada em *M. bicolor* para os locos Mbi13 e Mbi32. Carvalho-Zilse e Kerr (2006) e Carvalho-Zilse *et al.* (2009), para os mesmos locos amplificados em *M. scutellaris* obtiveram heterozigosidades inferiores aos de *M. bicolor*. Entretanto, as heterozigosidades observadas neste trabalho para os mesmos locos (Mbi13 - H_o 0,39 e Mbi32 - H_o 0,48) amplificados em *M. scutellaris* foram bem superiores às encontradas por Carvalho-Zilse e colaboradores, sugerindo-se a diferença das heterozigosidades ao número amostral utilizado em cada trabalho. Costa-Pinto (2007) para os mesmos locos citados, também evidenciou menor heterozigosidade observada em *M. compressipes* (Mbi13 - H_o 0,38 e Mbi32 - H_o 0,39) e *M. seminigra* (Mbi13 - H_o 0,42 e Mbi32 - H_o 0,16) em comparação com *M. bicolor*. Os autores atribuíram esta diferença no fato de que em

cada colméia de *M. bicolor* pode haver até cinco rainhas fisogástricas ativas (postura simultânea), aumentando assim, a variabilidade genética dentro da colônia. Esta poliginia não é comum em *M. scutellaris*, tendo sido registrada apenas uma vez na literatura (Carvalho *et al.*, 2011).

Entretanto, Lopes (2008) em um estudo comparativo entre o uso de *primers* específicos e heterólogos em *M. rufiventris* e *M. mondury* no estado de Minas Gerais mostrou como resultado um aumento expressivo de heterozigosidade esperada e heterozigosidade observada, bem como, aumento no número médio de alelos com o uso de *primers* específicos para as espécies em comparação com os *primers* heterólogos. A autora mostrou que o uso de *primers* específicos aumenta o nível de polimorfismo, tanto em número de alelos quanto ao número de heterozigotos e sugeriu cautela com o uso de *primers* heterólogos, pois apesar de poderem ser utilizados com sucesso em espécies filogeneticamente próximas, os resultados podem variar devido a influência de vários fatores.

Contudo, os resultados obtidos por Lopes (2008) não se aplicam ao que foi observado como resultado neste trabalho para os locos específicos de *M. seminigra* (MSM) amplificados pela primeira vez em *M. scutellaris*. Foram amplificados, para os oito (8) locos usados, um total de 46 alelos em *M. scutellaris* (*primers* heterólogos) contra 27 alelos amplificados por Francini *et al.* (2009) para *M. seminigra* utilizando os mesmos *primers* (específicos neste caso). A diferença em número de alelos amplificados para *M. scutellaris* em relação a *M. seminigra* foi 19 alelos a mais. A média da heterozigosidade observada (H_o) em *M. scutellaris* para todos os locos MSM também foi superior, com H_o de 0,55 em comparação à média observada em *M. seminigra* com H_o de 0,31. Ressaltamos, no entanto, que as amostras de *M. scutellaris* utilizadas neste trabalho eram provenientes da 2ª geração de 60 colônias matrizes de origens distintas do Estado da Bahia e, portanto, com esperado alto índice de variabilidade genética. Outro fator que certamente contribuiu para o grande número de alelos encontrados foi a amostragem que aqui foi três vezes maior que a utilizada por Francini *et al.* (2009).

4.1 Comparação entre as colônias mais produtivas e menos produtivas de *Melipona scutellaris*

Quando comparados os resultados das colônias mais produtivas (+PD) e menos produtivas (-PD), nota-se que três dos quatro alelos do loco Mbi13 amplificaram para ambas as categorias de colônias (Tabela 7). No entanto, foi observado um alelo exclusivo (117pb) nas colônias mais produtivas (+PD). A heterozigosidade observada (H_o 0,41) para este loco nas colméias +PD também foi maior do que a heterozigosidade observada (H_o 0,35) nas colônias -PD, no entanto, as heterozigosidades das duas classes permaneceram menor do que a heterozigosidade da espécie de origem (H_o 0,88).

Analisando o loco microssatélite Mbi32, as colônias -PD apresentaram dois alelos exclusivos (118pb e 130pb). A heterozigosidade observada (H_o 0,57) foi maior para essas colônias do que a heterozigosidade observada (H_o 0,39) nas colônias +PD, contudo, com níveis menores do que encontrado na espécie de origem dos *primers* (0,66).

O loco MSM02 amplificou nove (9) alelos tanto para colônias mais produtivas e menos produtivas de *M. scutellaris*. O alelo 225pb foi exclusivo para as colônias +PD e o alelo 231pb exclusivo para as colônias -PD. A maior heterozigosidade observada (H_o 0,56) para este loco ficou para as colônias +PD, sendo também maior quando comparado com as da espécie de origem dos *primers* (*M. seminigra*).

Para o loco MSM03, o nível de heterozigosidade observada (H_o) ficou com valores bem próximos nas duas classes de colônias e também quando comparadas com a heterozigosidade de origem dos *primers*.

Para as colônias +PD o loco MSM04 gerou cinco fragmentos, sendo o alelo 280pb exclusivo para essa classe de colônias. A maior heterozigosidade para este loco ($H_o = 0,43$) ficou para as colônias -PD e superior à heterozigosidade observada ($H_o = 0,04$) da espécie de origem.

O loco MSM05 apresentou alelos exclusivos de 263pb e 293pb nas colônias +PD e os alelos de 257pb, 269pb e 287pb exclusivos na classe de colônias -PD. Para este loco a heterozigosidade observada ficou com níveis bem próximos para as duas classes de colônias ($H_o = 0,33$ em +PD e $H_o = 0,32$ em -PD).

Tabela 7. Números (N) e tamanhos dos fragmentos (F) em pares de bases amplificados em *M. scutellaris* nas colônias mais produtivas e menos produtivas, suas respectivas heterozigosidades observadas (Ho).

Colônias		Locos Mbi		Locos MSM							
		13	32	02	03	04	05	07	09	12	13
+PD	N	4	4	9	9	5	4	4	6	2	2
	F	102	121	215	267	280	263	210	137	267	230
		105	124	217	269	292	275	216	143	272	235
		108	127	219	271	298	281	222	145		
117		133	221	273	304	293	228	147			
			223	275	310			149			
			225	277				151			
			227	279							
			233	281							
		235	283								
	Ho	0,41	0,39	0,56	0,69	0,32	0,33	0,45	0,86	1,00	0,36
-PD	N	3	6	9	9	4	5	4	7	2	1
	F	102	118	215	267	292	257	210	137	267	235
		105	121	217	269	298	269	216	141	272	
		108	134	219	271	304	275	222	143		
		127	221	273	310	281	228	145			
		130	223	275		287		147			
		133	227	277				149			
			231	279				151			
			233	281							
		235	283								
	Ho	0,35	0,57	0,49	0,66	0,43	0,32	0,63	0,70	0,96	0,00

Alelos exclusivos em cada loco estão destacados em negrito.

No loco MSM07 foram encontrados quatro alelos comuns para as duas classes de colônias, sendo que a maior heterozigosidade ficou para as colônias -PD (Ho = 0,63). Foi encontrado alelo exclusivo de 141pb para o loco MSM09 nas colônias -PD e a heterozigosidade observada (Ho = 0,86) foi maior nas colônias +PD.

Quando se analisa os fragmentos amplificados em *M. scutellaris* para o loco MSM12 nota-se que os dois (2) alelos de 267pb e 272pb aparecem nas colônias +PD e -PD e a heterozigosidade observada com níveis bem próximos nas duas classes de colônias. Para este loco, na demonstração das freqüências alélicas (Tabela 8), todos os indivíduos apresentaram genótipos heterozigotos para as colônias mais produtivas, sendo que, para as colônias menos produtivas foi detectado somente um indivíduo homozigoto.

Inversamente ao resultado anterior, para o loco MSM13 nas colônias -PD somente o alelo 235pb foi encontrado, sendo os indivíduos dessa classe de colônias todos homozigotos, evidenciando a fixação deste alelo ($F_a = 1,00$). Nas colônias +PD, além do alelo 235pb, foi encontrado também o alelo 230pb sendo este exclusivo para essa classe de colônias. Na análise geral este loco foi o que apresentou menor heterozigosidade observada ($H_o = 0,18$) em relação aos outros locos utilizados neste trabalho e em comparação com a heterozigosidade esperada ($H_o = 0,32$) da espécie de origem (*M. seminigra*).

Foram observados alelos exclusivos para sete dos dez locos analisados e amplificados em *M. scutellaris* nas classes de colônias +PD e -PD. Os locos MSM03, MSM07 e MSM12 apresentaram fragmentos de tamanhos iguais para as duas classes. A análise da média de heterozigosidade observada (H_o) para todos os locos (Tabela 7) nas duas classes de colônias (+PD e -PD) mostrou que estão com níveis de heterozigosidade observada bem próximas, sendo média $H_o = 0,54$ para as colônias mais produtivas e $H_o = 0,51$ para as colônias menos produtivas.

As frequências alélicas (F_a) (Tabelas 8) para todos os locos e para as duas classes de colônias (+PD e -PD) mostraram uma grande variação. A maior frequência (F_a) foi de 1,00 para o alelo 235pb do loco MSM13 das colônias menos produtivas e a menor frequência (F_a) foi de 0,007 para os alelos 225pb (MSM02), 267pb e 269pb (MSM03), 138pb (MSM09) das colônias mais produtivas e para os alelos 130pb (Mbi32), 233pb (MSM02), 267pb e 269pb (MSM03), 257pb (MSM05), 138pb e 140pb (MSM09) das colônias menos produtivas.

Tabela 8. Tamanho de alelos em pares de bases (F) e as frequências alélicas (Fa) nos locos analisados nas colônias mais e menos produtivas de *Melipona scutellaris*.

Loco	Mais Produtivas (+PD)		Menos Produtivas (-PD)	
	F		F	Fa
Mbi13	102	0.023	102	0.008
	105	0.162	105	0.169
	108	0.731	108	0.823
	117	0.085		
Mbi32			118	0.014
	121	0.043	121	0.029
	124	0.021	124	0.107
	127	0.307	127	0.679
			130	0.007
MSM02			133	0.164
	215	0.022	215	0.014
	217	0.087	217	0.022
	219	0.014	219	0.029
	221	0.022	221	0.036
	223	0.051	223	0.051
	225	0.007		
	227	0.659	227	0.717
			231	0.043
	233	0.043	233	0.007
235	0.094	235	0.080	
MSM03	267	0.007	267	0.007
	269	0.007	269	0.007
	271	0.014	271	0.077
	273	0.042	273	0.042
	275	0.077	275	0.120
	277	0.099	277	0.049
	279	0.021	279	0.021
	281	0.655	281	0.486
	283	0.077	283	0.190
MSM04	280	0.015		
	292	0.015	292	0.024
	298	0.037	298	0.079
	304	0.103	304	0.111
	310	0.831	310	0.786
MSM05	263	0.016	257	0.007
			269	0.043
	275	0.139	275	0.181
	281	0.820	281	0.746
	293	0.025	287	0.022

continua...

Tabela 8. Tamanho de alelos em pares de bases (F) e as frequências alélicas (Fa) nos locos analisados nas colônias mais e menos produtivas de *Melipona scutellaris*.

continuação...

Loco	Mais Produtivas (+PD)		Menos Produtivas (-PD)	
	F	Fa	F	Fa
MSM07	210	0.038	210	0.014
	216	0.100	216	0.057
	222	0.085	222	0.243
	228	0.777	228	0.686
MSM09	137	0.007	137	0.007
			141	0.007
	143	0.027	143	0.036
	145	0.014	145	0.079
	147	0.192	147	0.071
	149	0.192	149	0.150
MSM12	151	0.568	151	0.650
	267	0.500	267	0.507
MSM13	272	0.500	272	0.493
	230	0.182		
	235	0.818	235	1.00

Nota-se que na maioria dos locos microssatélites foram encontrados alelos em comum apresentando alta frequência nas duas classes de colônias (+PD e -PD). Percebe-se também que houve amplificação de alelos comuns e alelos exclusivos com baixa frequência para as duas classes de colônias.

Costa-Pinto (2007) analisando as frequências de alelos para *M. seminigra* e *M. compressipes* também encontrou alelos de alta e baixa frequência nas colméias. Carvalho-Zilse *et al.* (2009) para os locos amplificados em *M. scutellaris*, também observaram alelos com altas frequências em todas as colméias analisadas. A observação de alelos comuns com altas frequências para as duas classes de colônias (+PD e -PD) neste trabalho, em consonância com os dois outros trabalhos citados, reforçam ainda mais a idéia de esses marcadores possam estar ligados a genes importantes, como de adaptação e metabolismo, essenciais à sobrevivência das espécies (Carvalho-Zilse e Kerr, 2009). Quanto aos alelos de baixa frequência encontrados nas colônias (Tabela 8), estes podem estar sendo eliminados ou então, são alelos novos que estão surgindo na população (Costa-Pinto, 2007).

Referente aos alelos exclusivos encontrados nas duas classes de colônias as frequências (Fa) foram baixas, onde a maior foi de Fa = 0, 182 e a menor Fa =

0,007. Estes resultados sugerem que estes alelos são novos nas colônias, ou estão sendo eliminados, ou ainda, a ocorrência de fluxo gênico restrito entre as colônias.

A análise da estruturação populacional foi feita com a estatística F ao nível de 5% de significância (P-value = 0,005) para verificar se as frequências alélicas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os resultados dos testes estatísticos para a classe de colônias mais produtivas (+PD), para todos os locos microssatélites (Tabela 8), mostraram que as frequências alélicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para a classe de colônias menos produtivas (-PD), exceto para o loco MSM13 cujo alelo 235pb não foi analisado e que já se encontra fixado nesta classe de colônias (Tabela 8), todos os outros locos encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A diversidade genética por loco microssatélite (Tabela 9) nas colônias mais produtivas e menos produtivas apresentou maior índice (0,708) para o loco MSM03 e menor (0,000) para o loco MSM13, ambos nas colônias -PD. Entretanto, quando observado a média geral dos alelos para a diversidade gênica, percebe-se que as duas classes de colônias (+PD e -PD) apresentaram valores próximos, sendo respectivamente, a média de 0,444 e 0,427.

Tabela 9. Diversidade genética por loco microssatélite nas colônias mais produtivas (+PD) e menos produtivas (-PD) de *Melipona scutellaris*.

Loco	Diversidade Genética	
	+PD	-PD
Mbi13	0.436	0.297
Mbi 32	0.513	0.503
MSM02	0.547	0.475
MSM03	0.550	0.708
MSM04	0.299	0.366
MSM05	0.310	0.411
MSM07	0.380	0.470
MSM09	0.605	0.545
MSM12	0.500	0.500
MSM13	0.300	0.000
Média	0,444	0,427

Em um apanhado geral quanto às análises realizadas dos resultados obtidos nas duas classes de colônias (+PD e -PD), no que diz respeito à média das heterozigosidades observadas (H_o), as frequências dos alelos e a média da diversidade genética dos locos, os resultados mostraram um equilíbrio nas duas classes de colônias, não diferindo quanto às médias observadas. A média da diversidade genética foi satisfatória para as duas classes de colônias e mesmo sendo manejadas e mantidas em meliponário da UFRB. A variabilidade genética das colméias se manteve, o que era esperado em virtude da diversidade de origem das colônias que formaram a população parental e ao cruzamento aleatório entre fêmeas e machos.

Apesar do loco MSM13, para a classe das colônias menos produtivas (-PD), se apresentar monomórfico com 100% de indivíduos homocigotos, quanto à média de heterozigosidade observada (H_o) e das frequências alélicas (F_a) nas duas classes de colméias (+PD e -PD), mostraram resultados aceitáveis, evidenciando também, equilíbrio nas duas classes de colônias.

As frequências alélicas dos locos microssatélites analisados encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para as duas classes de colônias, exceto para o loco MSM13 que já se encontra fixado nas colônias menos produtivas.

5. CONCLUSÕES

Os locos de *Melipona interrupta*, testados pela primeira vez em *M. scutellaris*, não amplificaram e/ou amplificaram de maneira insatisfatória apresentando bandas inespecíficas.

De um total de 18 pares de *primers* microssatélites heterólogos desenvolvidos para *M. bicolor*, *M. seminigra* e *M. interrupta* testados em *Melipona scutellaris*, dez (10) locos microssatélites geraram produtos de amplificação que permitiram interpretar com segurança os resultados, a saber: Mbi13, Mbi32, MSM02, MSM03, MSM04, MSM05, MSM07, MSM09, MSM12, MSM13.

Na análise geral, todos os locos apresentaram polimorfismo, sendo que, o loco MSM03 foi o mais polimórfico e o MSM13 o menos polimórfico.

Os locos heterólogos Mbi13 e Mbi32 apresentaram nível de heterozigosidade observada e tamanhos de fragmentos diferenciados, quando comparado com resultados de trabalhos anteriores que usaram os mesmos locos em *M. scutellaris* possivelmente devido à amostragem e/ou metodologia utilizada na separação de fragmentos amplificados.

Os locos específicos para *M. seminigra*, e testados pela primeira vez em *M. scutellaris*, apresentaram nesta espécie, maior heterozigosidade média observada e maior número de alelos quando comparado com os resultados obtidos na espécie de origem.

Evidenciou-se que locos heterólogos apresentaram maior quantidade de alelos e maior heterozigosidade observada quando comparados as espécies de origem dos *primers*.

Os mesmos alelos encontrados com alta frequência nas duas classes de colônias reforçam a idéia que microssatélites podem estar ligados a genes importantes.

As duas classes de colônias mostraram média de diversidade genética com valores próximos, evidenciando que fatores externos exerceram pouca influência na variabilidade genética das colméias.

Foram encontrados alelos exclusivos com frequências diversas para as duas classes de colônias. Não podemos inferir com segurança que estejam relacionados com a produtividade em *M. scutellaris*, necessitando de mais estudos nesta área.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, M. G.. 1974. *Aspectos bionômicos, ecológicos e genéticos da abelha Melipona scutellaris Latreille (1811)*. 128 f. Dissertação. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, SP.
- Alves, R. M. O.. 2010. *Avaliação de parâmetros biométricos e produtivos para seleção de colônias da Abelha Uruçu (Melipona scutellaris Latreille, 1811)*. 107 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Agrárias com Área de Concentração em Fitotecnia). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas . BA.
- Avise, J.C.. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman e Hall, New York, 528p.
- Callen, D.F.; Thompson, A.D.; Shen Y.; Phillips, H.A.; Richards, R.I.; Mulley, J.C.; Sutherland, G.R.. 1993. Incidence and origin of null alleles in the (AC)n microsatellites markers. *Am. J. Hum. Genet.* 52:922-927.
- Camargo, J. M. F.. 1989. Comentários sobre a sistemática de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae). *Anais XIV Simp. Anual da ACIESP*, 1989. 68:41-61.
- Camargo, J. M. F.; Pedro, S.R.M.. 1992. Systematics, phylogeny and biogeography of Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. *Apidologie*, 23:1-32.
- Camargo, J.M.F.; Pedro, S.R.M.. 2007. Meliponini Lepeletier, 1836. *In: Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region*. Melo, G.A.R. (Org.). Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia, 1058 p.
- Carvalho, G.A.. 2001. The number of sex alleles (CSD) in a bee population and its practical important (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Hymenoptera Research*, 10(1): 10-15.
- Carvalho, C.A.L.; Alves, R.M.O.; Souza, B. A.. 2003. *Criação de abelhas sem ferrão: aspectos práticos*. Ed. SEAGRI/DDP. Cruz das Almas-BA. 42p.
- Carvalho, C.A.L.; Moreti, A.C.C.C.; Marchini, L.C.; Alves, R.M.O.; Oliveira, P.C.F.. 1998. Espectro Polínico de Amostras de Mel da Abelha Uruçu (*Melipona scutellaris*). *Anais do XII Congresso Brasileiro de Apicultura*, Salvador-BA:189p.
- Carvalho, C.A.L; Souza, B. A.; Dias, C. S.; Alves, R. M. O.; Melo, A. F. L.; Soares, A. C. F.; Carvalho-Zilse, G. A.. 2011. Five egg-laying queens in a single colony of brazilian stingless bees (*Melipona scutellaris* Latreille). *Acta Amazonica* 41(1): 123 - 126.
- Carvalho-Zilse, G. A.. 2006. Meliponicultura na Amazônia. *Anais do VII Encontro Sobre Abelhas*. Ribeirão Preto, SP, 2006. Em CD-ROM.
- Carvalho-Zilse, G.A.; Kerr, W.E.. 2004. Substituição de rainhas fisiogástricas e distância de vôo dos machos de Tiúba (*Melipona compressipes fasciculata*) e Uruçu (*Melipona scutellaris*) (Apidae-Meliponini). *Acta Amazonica*, vol.34, n.4.
- Carvalho-Zilse, G. A.; Kerr, W. E.. 2006. Utilização de marcadores microssatélites para estudos populacionais em *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). *Magistra*, 18: 213-220.
- Carvalho-Zilse, G. A.; Costa-Pinto, M.F.F.; Nunes-Silva, C.G.; Kerr, W.E.. 2009. Does beekeeping reduce genetic variability in *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini)? *Genetics and Molecular Research*, 8 (2): 758-765.

- Chapuis, M.P.; Estoup, A.. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population. *Molecular Biology and Evolution* 24(3): 621-631.
- Conte, R.. 2004. *Estrutura Genética de Populações de Euterpe edulis Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites*. 135f. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP.
- Corbet, S. A.; Williams, I. H.; Osborne, J.L.. 1991. Bees and pollination of crops and wild flowers in the European Community. *Bee World*, Buckinghamshire, n.720, p.47-59.
- Costa-Pinto, M.F.F.. 2007. *Caracterização de locos microssatélites em duas espécies de abelhas da região Amazônica: Melipona compressipes e Melipona seminigra (Hymenoptera: Apidae: Meliponina)*. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas com ênfase em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. Manaus, AM.
- Edwards, Y. J., Elgar, G.; Clark, M.S.; Bishop, M.J.. 1998. The identification and characterization of microsatellites in the compact genome of the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*: perspectives in functional and comparative genomic analyses. *J. Mol. Biol.* 278:843. 854.
- Estoup, A.; Solignac, M.; Harry, M; Cournuet, J.M.. 1993. Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Research*, 21:1427-1431.
- Evangelista-Rodrigues, A.; Góis, G.C.; Silva, C.M.; Souza, D.L.; Souza, D.N.; Silva, P.C.C.; Alves, E.L.. 2008. Desenvolvimento produtivo de colméias de abelhas *Melipona scutellaris*. *Biotemas* 21(1):59-64.
- Faleiro, F. G.. 2007. *Marcadores genético-moleculares: aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos*. Embrapa Cerrados. Planaltina, DF. 102p.
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D.. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2ª ed. EMBRAPA-CERNARGEN, Brasília, DF. 220p.
- Francini, I. B.; Sforça, D. A.; Sousa, A. C. B.; Campos, T.; Cidade, F. W.; Zucchi, M. I.; Souza, A. P.; Nunes-Silva, C. G.; Carvalho-Zilse, G. A.. 2009a. Microsatellite loci for an endemic stingless bee *Melipona seminigra merrillae* (Apidae, Meliponini) from Amazon. *Conservation Genetics Resources* 1:487-490.
- Francini, I. B.; Sousa, A. C. B.; Sforça, D. A.; Costa-Pinto, M.F.F.; Campos, T.; Nunes-Silva, C. G.; Zucchi, M. I.; Souza, A. P.; Carvalho-Zilse, G. A.. 2010. Isolation and characterization of microsatellite loci in the stingless bee *Melipona interrupta manaosensis* (Apidae: Meliponini). *Conservation Genetics Resources*, 2:27. 30.
- Francisco, F.O.. 2002. *Diversidade genética de abelha sem ferrão Plebeia remota: análise do DNA mitocondrial e microssatélites*. 147f. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Gao, L.Z.; Schaa, B.A.; Zhang, C.H.; JIA, J.Z.; Dong, Y.S.. 2002. Assesment of population genetic structure in commom wild rice *Oryza rufipogon* Griff. Using microsatellite and allozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 173:180.

- Giannini, T.C.; Alves, D.A.; Acosta, A.L.; Imperatriz-Fonseca, V.L.; Saraiva, A.M.; Alves-dos-Santos, I.. 2010. Qual poderá ser a distribuição geográfica de *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini) no futuro? *Anais do IX Encontro Sobre Abelhas*. Ribeirão Preto, SP.
- Goudet, J.. 1995. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86(6), 485-486.
- Guo, W.; Cai, C., Wang, C.; Han, Z.; Song, X.; Wang, K. Niu, X.; Wang, C.; Lu, K.; Shi, B.; Zhang, T.. 2007. A Microsatellite-Based, Gene-Rich Linkage Map Reveals Genome Structure, Function and Evolution in *Gossypium*. *Genetics* 176: 527. 541.
- Hancock, J.M.. 1999. *Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms*. In: *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds. D.B Goldstein e C. Schlötterer), pp. 1-9, Oxford University Press, New York.
- Hasselmann, M.; Gempe, T.; Schiott, M.; Nunes-Silva, C.G.; Otte, M.; Beye, M.. 2008. Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature*, 454: 519-523.
- Imperatriz-Fonseca, V.L.; Saraiva, A.M.; de Jong, D.. 2006. *Bees as pollinators in Brazil: assessing the status an suggesting best practices*. Holos editora, Ribeirão Preto-SP. 112p.
- Jurka, J.; Pethiyagoda, C.. 1995. Simple repetitive DNA sequences from primates: compilation and analysis. *J. Mol. Evol.* 40:120. 126.
- Kantety, R. V.; La Rota, M.; Matthews, D.E.; Sorrells, M.E.. 2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Mol Biol.* 48:501. 510.
- Kerr, W.E.. 1996. *Biologia e manejo da tíúba: a abelha do Maranhão*. São Luis, Edufma. 156p.
- Kerr, W.E.. 1998. As abelhas e o meio ambiente. *Anais do Congresso Brasileiro de Apicultura*: 27-30 p.
- Kerr, W. E.. 2002a. Extinção de Espécies: a grande crise biológica do momento e como afeta os meliponíneos. *Anais do V Encontro Sobre Abelhas*, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil: 4-9 p.
- Kerr, W.E.. 2002b. Valor das Abelhas. *Jornal Eymba Acuay: a serviço das abelhas sem ferrão*. Ed. AMAV/INPA, 2p.
- Kerr, W. E.; Maule, V.. 1964. Geographic distribution of stingless bees and its implications (Hymenoptera, Apidae). *J. New York Ent. Soc.*, 57:2-17.
- Kerr, W. E.; Vencovsky, R.. 1982. Melhoramento genético em abelhas. I. Efeito do número de colônias sobre o melhoramento. *Rev. Brasil. Genet.* 2:279-285.
- Kerr, W. E.; Carvalho, G. A; Nascimento, V. A.. 1996. *Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação*. Fundação Acangaú, Paracatu, MG. 144 p.
- Kerr, W. E.; Carvalho, G. A; Silva, A. C.; Assis, M. G. P.. 2001. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parcerias Estratégicas*, 12: 20-41.
- Lopes, D.M.. 2008. *Análise moleculares em Melipona rufiventris e Melipona mondury (Hymenoptera: Apidae)*. Tese de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. 96f.

- Mariano Filho, J.. 1911. *Ensaio sobre meliponas do Brasil*. Editora do Autor. Rio de Janeiro, RJ. 140p.
- Michener, C.D.. 1990. Classification of the Apidae (Hymenoptera). *University of Kansas Science Bulletin*, 54(4):76-164.
- Michener, C.D.. 2000. *The Bees of the World*. The Johns Hopkins University Press, London, 913 pp.
- Michener, C.D.. 2007. *The Bees of the World, 2nd Ed*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 953 pp.
- Moran, C.. 1993. Microsatellite repeats in pig (*Sus domestica*) and chicken (*Gallus domesticus*) genomes. *J. Hered.* 84:274-280.
- Moure, J. M.. 1961. A preliminary supra-specific classification of the old world Meliponinae bees (Hymenoptera, Apoidea). *Studia Entomol.* 4(1-4):181-242.
- Mullis, K.; Faloona, F.. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase-catalyzed Chain Reaction. *Methods Enzymology*, 155:335-350.
- Nei, M.. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Nogueira-Couto, R.H.. 1998. Uso de atrativos e repelentes na polinização dirigida. Anais do III Encontro sobre Abelhas de Ribeirão Preto: p. 21-27.
- Nogueira- Neto, P. 1970. *A criação de abelhas indígenas sem ferrão*. Ed. Tecnapis, São Paulo - SP. 365 p.
- Nogueira-Neto, P.. 1997. *A vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. Ed. Nogueirapis, São Paulo - SP. 445p.
- Oosterhout, C. V.; Hutchinson, W. F.; Wills, D.P. M.; Shipley, P.. 2004. Micro-Checker: software for identification and correcting genotyping errors in microsatellites data. *Molecular Ecology* 4: 535-538.
- Paxton, R. J; Weißschuh, N.; Engels, W.; Hartfelder, K.; Quezada-Euán, J. J. G.. 1999. Not only single mating in stingless bees. *Naturwissenschaften*, 86:143-146.
- Peters, J.M; Queller, D.C.; Imperatriz-Fonseca, V.L.; Strassmann, J.E.. 1998. Microsatellite loci for stingless bees. *Molecular Ecology*, 7: 784-787.
- Quezada-Euán, J.J.G.; Paxton, R.J.; Palmer, K.A.; Itzá, W. de J.M.; Tay, W.T.; Oldroyd, B.P.. 2007. Morphological and molecular characters reveal differentiation in a Neotropical social bee, *Melipona Beecheii* (Apidae, Meliponini). *Apidologie* 38: 247-258.
- Rebelo, K.S.. 2011. Caracterização nutricional, química e espectroscópica do pólen coletado por abelhas sem ferrão amazônicas. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia). Manaus, AM. 111p.
- Rowe, D. J.; Rinderer, T. E. ; Stelzer, J. A.; Oldroyd, B. P.; Crozier, R. H.. 1997. Seven polymorphic microsatellite loci in honeybee (*Apis mellifera*). *Insectes Soc.* 44:85-93.
- Schlötterer, C.; Wiene, T.. 1999. Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps. *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds. D.B Goldstein e C. Schlötterer). Oxford University Press, New York. 238-248 pp.

- Schuelke, M.. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature*, 233-235.
- Silva, E.P.; Russo, C.A.M.. 2000. Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics. *In: Sole-Cava, A.M.; Russo, C.A.M.; Torpe, J.P. (eds). Marine Genetics*. Kluwer Academic Publisher. Amsterdam, 111-125p.
- Silveira, F.A.; Melo, G.A.R.; Almeida, E.A.B.. 2002. *Abelhas Brasileiras Sistemática e Identificação*. Fundação Araucária, Belo Horizonte. 253p.
- Slaa E.J., Sánchez Chaves L.A., Malagodi-Braga K., Hofstede F.E.. 2006. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*, 37: 293-315.
- Soares, K.. 2001. *O uso de marcadores microssatélites no estudo de acasalamento em Melipona scutellaris*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia . MG. 49f.
- Souza, D.C.. 1995. Melhoramento genético em abelhas (*Apis mellifera*). *Anais do XI Encontro de Genética do Nordeste*: 34-37p.
- Thiel, T., W. Michalek, R. K. Varshney, and A. Graner.. 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106:411. 422.
- van Lith, H. A., and L. F. van Zutphen.. 1996. Characterization of rabbit DNA microsatellites extracted from the EMBL nucleotide sequence database. *Anim. Genet.* 27:387. 395.
- Waldschmidt, A. M.. 2003. Importância dos estudos de genética para a meliponicultura. *Anais do Encontro Estadual de Apicultura*, Cruz das Almas . BA. 14p.
- Weir, B.S.; Cockerham, C.C.. 1984. Estimating F-statistic for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6):1358-1370.
- Wilson, E. O.. 1971. The Insect Societies. *The Beeknap Press of Havard University Press*. Cambridge, Massachusetts. 548p.
- You-Chun Li, Korol, A. B.; Fahima, T.; Nevo, E.. 2004. Microsatellites within genes: structure, function and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 21(6):991-1007.