

# ESTUDIO DE MICROSATÉLITES EN LAS ABEJAS SIN AGUIJÓN *MELIPONA COLIMANA* Y *M. BEECHEII* DE MESOAMÉRICA

## STUDY OF MICROSATELLITE MARKERS IN STINGLESS BEES *MELIPONA COLIMANA* AND *M. BEECHEII* FROM MESOAMERICA

Hurtado-Burillo, M.<sup>1\*</sup>; Martínez, J.<sup>1A</sup>; May-Itzá, W. de J.<sup>2A</sup>; Quezada-Euán, J.J.G.<sup>2B</sup>  
y De la Rúa, P.<sup>1B</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Zoología y Antropología Física. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Murcia. España. \*miguel.hurtado@um.es; <sup>A</sup>tinto1984@yahoo.es; <sup>B</sup>pdelarua@um.es

<sup>2</sup>Departamento de Apicultura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Itzimná. Mérida, Yucatán. México. <sup>A</sup>mayitza@uady.mx; <sup>B</sup>quean@uady.mx

### PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Diversidad genética. Deforestación. Meliponicultura. México. Cuba.

### ADDITIONAL KEYWORDS

Genetic diversity. Deforestation. Meliponiculture. Mexico. Cuba.

### RESUMEN

En este estudio, se ha analizado por primera vez la variabilidad de los *loci* de microsatélites en la especie silvestre de abejas sin aguijón *Melipona colimana*. Los datos obtenidos se han comparado con los de una población insular de la especie domesticada *M. beecheii*. Los resultados del genotipado de los individuos de *M. colimana*, indican que la secuencia de los *loci* de microsatélites está conservada dentro del género *Melipona*. Los parámetros poblacionales estudiados (número de alelos y valores de heterocigosidad) no mostraron diferencias significativas entre las dos especies estudiadas, estando ambos dentro del rango observado en otras especies del género. Estos valores fueron inferiores en la población insular de *M. beecheii* con respecto a otras poblaciones continentales de la misma especie analizadas previamente, lo cual coincide con lo observado en estudios previos de otros organismos insulares. La especie silvestre *M. colimana* es susceptible a los efectos de la deforestación, por ello se han comparado parámetros poblacionales de colmenas situadas en una zona deforestada y en otra conservada. La diversidad poblacional no ha mostrado diferencias significativas, probablemente debido a que las perturbaciones del medio estudiado son recientes y aún no se han reflejado en la diversidad genética de estos insectos.

### SUMMARY

In this study, variability of microsatellite *loci* has been for the first time analyzed in the wild stingless bee *Melipona colimana*. Data have been compared with those obtained from an insular population of the managed species *M. beecheii*. Genotyping results in *M. colimana* demonstrate that microsatellite *loci* sequences are conserved within the genus *Melipona*. Population parameters such as number of alleles and heterocigosity values, were not significantly different between the two studied species, both being within the observed range in other *Melipona* species. Values of the insular *M. beecheii* population were lower than in previously studied continental populations of the same species, in agreement with the results obtained in other island organisms. Wild *M. colimana* colonies are susceptible to deforestation effects, so that, we have compared the genetic parameters of colonies from a deforested area with those of a conserved area. Population diversity was not significantly different, may be due to recent environmental perturbations that are not yet reflected in the genetic diversity of these insects.

### INTRODUCCIÓN

Las abejas sin aguijón son insectos eusociales (Apidae: Meliponini) que se distribuyen por las zonas tropicales del plane-

ta, conociéndose alrededor de 500 especies de 42 géneros diferentes (Michener, 2007; Camargo y Pedro, 2008). El género *Melipona* abarca unas 40 especies presentes en la zona tropical americana (Michener, 2007), entre las que se encuentran *Melipona colimana* Ayala, 1999 y *M. beecheii* Bennett, 1831. *M. colimana* es endémica de la provincia mexicana de Jalisco, aparece en bosques de pino-encino a más de 1000 metros de altitud, en donde habita en los troncos de los árboles y no es manejada para la producción de miel (Quezada-Euán, 2005). Sin embargo, *M. beecheii* es el meliponino más común en México con una amplia distribución a lo largo de las dos costas y la península de Yucatán, así como en Belice, Cuba y Jamaica, aunque su distribución por el Caribe podría estar influida por su uso en la meliponicultura. A diferencia de *M. colimana*, esta especie es explotada desde épocas precolombinas para la producción de miel, cera y polen, siendo manejadas en jobones o cajas especialmente diseñadas para ello.

Las abejas sin aguijón juegan un papel esencial en la producción primaria de los ecosistemas al ser polinizadoras de multitud de especies vegetales (Roubik, 1989). Su importancia ecológica radica también en la especificidad que presentan determinadas plantas para ser polinizadas por ellas: aproximadamente un 33% de las plantas de selvas tropicales son exclusivamente visitadas por estas abejas (Wilms *et al.*, 1996). Además son efectivas polinizadoras en invernaderos (Kakutani *et al.*, 1993). A causa de su necesidad de árboles maduros, vivos y huecos, para hacer sus nidos (González-Acereto, 2008), de su reducida capacidad de dispersión, debida a la corta distancia de vuelo de las obreras y el escaso movimiento de sus enjambres (Imperatriz-Fonseca y Engels, 1990; Roubik, 2006), las especies silvestres son especialmente susceptibles de extinción en zonas sometidas a amenazas de origen antrópico como la fragmentación, destrucción y degradación de los hábitats,

el uso de herbicidas y pesticidas que reducen la disponibilidad de plantas silvestres y con ello su fuente de alimento (Kerr *et al.*, 2001). Por ello, es fundamental evaluar la diversidad genética de las poblaciones ya que su disminución conlleva una reducción del potencial adaptativo de las especies. Entre las herramientas moleculares, los microsatélites han sido usados en estudios de genética de poblaciones de abejas sin aguijón (Borges *et al.*, 2010; Quezada-Euán *et al.*, 2007, 2012). Lopes *et al.* (2010) demostraron que el uso de microsatélites específicos dio una mayor frecuencia de polimorfismo y de alelos por locus en dos especies del género *Melipona* que al usar marcadores diseñados para otras especies del mismo género. Igualmente Viana *et al.* (2011) pusieron en marcha el análisis de microsatélites en cuatro especies de *Melipona* usando cebadores diseñados para otras especies del mismo género.

El objetivo del presente estudio es poner en marcha el análisis de marcadores microsatélites en la especie silvestre *M. colimana*. Para probar su eficacia se compararon los resultados con los obtenidos en la especie manejada *M. beecheii*. De esta especie ya se tienen datos sobre la variabili-

**Tabla I.** Información sobre los muestreos de *M. colimana* y *M. beecheii*. (Sampling information of *M. colimana* and *M. beecheii*).

| Especie            | Localidad            | Colonias |
|--------------------|----------------------|----------|
| <i>M. colimana</i> |                      |          |
|                    | Tecalitlán (Jalisco) | 24       |
|                    | San Isidro (Jalisco) | 6        |
|                    | Total                | 30       |
| <i>M. beecheii</i> |                      |          |
|                    | Nueva Paz            | 10       |
|                    | San Nicolás          | 4        |
|                    | San José             | 8        |
|                    | Jaruco               | 4        |
|                    | Consolación Sur      | 2        |
|                    | Jagüey Grande        | 2        |
|                    | Total                | 30       |

## ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES EN MELIPONINOS MESOAMERICANOS

dad de los mismos *loci* de microsatélites en poblacionales continentales (Quezada-Euán *et al.*, 2007) por lo que se ha usado como referencia. Una vez que se constató la efectividad de estos marcadores en la especie, se compararon parámetros poblacionales obtenidos en colonias de *M. colimana* situadas en una zona recientemente deforestada con los de colonias de una zona conservada, para evaluar el efecto de dicha actuación en la diversidad genética de esta especie.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se han estudiado un total de 60 colonias silvestres de *M. colimana* de dos áreas

del estado de Jalisco, una conservada (Tecalitlán) y la otra deforestada (San Isidro), más otras 30 colonias manejadas de *M. beecheii* de Cuba (**tabla I, figura 1**). *M. colimana* presenta una distribución restringida a áreas específicas de la provincia biogeográfica del Eje Volcánico Transversal (Yañez-Ordoñez, 2008) por lo que es difícil encontrar colonias de esta especie. Sin embargo, *M. beecheii* es la especie más común de su género en Mesoamérica y tiene una amplia distribución (Ayala, 1999). En ambos casos, se muestrearon abejas obreras adultas del interior del nido de cada colmena y se conservaron en etanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La extracción de ADN se realizó a partir



**Figura 1.** Localidades de muestreo marcadas con círculos negros. (Sampling sites labelled with black dots).

de dos patas traseras de un ejemplar por colonia. Para la amplificación de los *loci* de microsatélites se realizaron dos reacciones múltiples de PCR. En la primera reacción (R1) se amplificaron conjuntamente los *loci* T4-171 y T7-5 (Paxton *et al.*, 1999), y en la segunda (R2) Mbi254, Mbi259, Mbi278, Mbi28 y Mbi201 (Peters *et al.*, 1998). Las reacciones de amplificación se prepararon con un volumen total de 12,5  $\mu$ L con el reactivo PCR beads Pure Taq™ Ready-To-Go™ (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). El programa de amplificación fue de 95 °C durante 5 minutos de desnaturalización inicial, 30 ciclos de 30 segundos a 96 °C, 30 segundos a 55 °C (R1) o 57 °C (R2), y 30 segundos a 72 °C, y una elongación final de 10 minutos a 72 °C.

Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis capilar en un secuenciador ABI® 3730 DNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) y con un estándar de tamaño interno (Servei Central de Suport a la Investigació Experimental de la Universidad de Valencia, España). El tamaño de los fragmentos de amplificación se determinó con el programa GeneMapper® v4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). El nivel de polimorfismo fue evalua-

do mediante parámetros poblacionales (R: rango del tamaño de los alelos de los *loci* de microsatélites, A: número de alelos, Ho: heterocigosidad observada, He: heterocigosidad esperada) obtenidos con el programa GenAlex v6.41 (Peakall y Smouse, 2006). Para comprobar la presencia de alelos nulos en cada uno de los *loci* se usó el programa Micro-checker (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

Dado el diferente número de ejemplares analizados en cada una de las dos áreas de muestreo de *M. colimana*, se llevó a cabo un análisis de rarefacción, para estimaciones objetivas de la riqueza alélica (Leberg, 2002), con el programa HP-RARE 1.0 (Kalinowski, 2005). Una vez obtenidos los datos se comprobó si existían diferencias estadísticamente significativas con la prueba t de Student ([http://www.physics.csbsju.edu/stats/t-test\\_bulk\\_form.html](http://www.physics.csbsju.edu/stats/t-test_bulk_form.html)).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parámetros de diversidad por *locus* obtenidos en las dos especies del género *Melipona* estudiadas se muestran en la **tabla II**. Todos los *loci* fueron polimórficos excepto Mbi259, que mostró una sola alternativa alélica de 177 pares de bases (pb) en *M. beecheii* y 180 pb en *M. colimana*. En

**Tabla II.** Parámetros de diversidad por *locus* obtenidos para *M. colimana* y *M. beecheii*. (Diversity parameters per *locus* obtained for *M. colimana* and *M. beecheii*).

| Locus  | R       | <i>M. colimana</i> |                |                | <i>M. beecheii</i> |       |                |                |
|--------|---------|--------------------|----------------|----------------|--------------------|-------|----------------|----------------|
|        |         | A                  | H <sub>o</sub> | H <sub>e</sub> | R                  | A     | H <sub>o</sub> | H <sub>e</sub> |
| T4-171 | 95-105  | 6                  | 0,640          | 0,656          | 93-95              | 2     | 0,615          | 0,426          |
| T7-5   | 66      | 1                  | 0,000          | 0,000          | 72-78              | 3     | 0,583          | 0,570          |
| Mbi201 | 152-158 | 4                  | 0,280          | 0,550          | 152-158            | 3     | 0,500          | 0,558          |
| Mbi254 | 203-230 | 4                  | 0,615          | 0,723          | 188-203            | 4     | 0,733          | 0,713          |
| Mbi259 | 180     | 1                  | 0,000          | 0,000          | 177                | 1     | 0,000          | 0,000          |
| Mbi278 | 84-87   | 2                  | 0,038          | 0,038          | 72-123             | 4     | 0,346          | 0,332          |
| Mbi28  | 86-113  | 4                  | 0,273          | 0,622          | 89-104             | 4     | 0,241          | 0,276          |
| Media  |         | 3,143              | 0,264          | 0,370          |                    | 3,000 | 0,431          | 0,411          |

R: rango del tamaño de los alelos de los *loci* de microsatélites; A: número de alelos; Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada.

## ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES EN MELIPONINOS MESOAMERICANOS

esta última especie, el *locus* T7-5 también mostró un único alelo de 66 pb. Los valores más altos de riqueza alélica por *locus* se observaron en *M. colimana* en los *loci* T4-171 (6), Mbi201, Mbi254 y Mbi28 (4), mientras que en *M. beecheii* el mayor valor (4) correspondió a los *loci* Mbi254, Mbi278 y Mbi28. En cuanto a la media de riqueza alélica para todos los *loci* se obtuvieron valores similares en ambas especies (3,143 en *M. colimana* y 3,000 en *M. beecheii*, diferencia no significativa,  $p=0,87$ ). Estos valores están incluidos dentro del rango de variación observado en otras especies de *Melipona*: desde 1,67 en *M. rufiventris* (Lopes *et al.*, 2010) hasta 3,78 obtenido en *M. bicolor* (Peters *et al.*, 1998), especie para la que fueron diseñados parte de los cebadores utilizados.

Los valores de heterocigosidad esperada por *locus* fueron mayores en *M. beecheii* (0,276-0,713) que en *M. colimana* (0,038-0,723) aunque no significativamente diferentes ( $p=0,80$ ). La heterocigosidad media esperada ( $H_e$ ) de la población insular de *M. beecheii* (0,411) es algo menor que la obtenida en las poblaciones continentales de *M. beecheii* estudiadas por Quezada-Euán *et al.* (2007) de México (0,535) y Costa Rica (0,711). Esto es debido, probablemente, al hecho de que las poblaciones estudiadas en este trabajo son insulares y éstas suelen presentar valores más bajos de heterocigosidad tal y como se ha observado en poblaciones insulares de la abeja de la miel *A. mellifera* (De la Rúa *et al.*, 2001).

Los bajos valores observados en *M. colimana* pueden deberse a que los cebadores usados no son específicos de esta especie; ya que los cebadores Mbi fueron diseñados en *M. bicolor* y T4-17 y T7-5 en *Scaptotrigona postica*. Estos resultados coinciden con los de Lopes *et al.* (2010) en los que se obtuvieron valores de riqueza alélica y heterocigosidad más altos en poblaciones de *M. rufiventris* y *M. mondury* analizadas con cebadores espe-

cíficos que cuando se usaron cebadores diseñados en *M. bicolor*. Otra consecuencia del uso de cebadores no específicos puede ser la presencia de alelos nulos, tal y como se ha observado en el *locus* Mbi28 en la especie *M. colimana*. Estos alelos aparecen cuando se produce una mutación en la secuencia de nucleótidos contigua al microsatélite, lo que impide la unión de los cebadores a su secuencia complementaria (Chapuis y Estoup, 2006) y, en consecuencia, la amplificación del fragmento (Callen *et al.*, 1993). Alternativamente, la detección de alelos nulos en este *locus* en concreto podría deberse a un error analítico dado el reducido número de muestras analizadas. En cualquier caso, la eficacia obtenida en la amplificación indica que las secuencias de estos *loci* de microsatélites están conservadas en las especies del género *Melipona*, ya que junto con *M. colimana*, son seis las especies (*M. bicolor* en Peters *et al.*, 1998; *M. beecheii* en Quezada-Euán *et al.*, 2007; *M. yucatanica* en May-Itzá *et al.*, 2010; *M. rufiventris* y *M. mondury* en Lopes *et al.*, 2010) en las que la amplificación de estos mismos *loci* y el genotipado de los individuos es posible. Se puede concluir por tanto que, si bien se pueden usar cebadores no

**Tabla III.** Riqueza alélica por *locus* para los dos tipos de colonias de *M. colimana* obtenida tras la rarefacción. (Allelic richness per locus for the two types of *M. colimana* colonies after rarefaction).

| Locus     | Zona        |            |
|-----------|-------------|------------|
|           | deforestada | conservada |
| T4-171    | 4           | 4          |
| T7-5      | 1           | 1          |
| Mbi201AAG | 3           | 3          |
| Mbi254AAG | 1           | 1          |
| Mbi259AAG | 2           | 2          |
| Mbi278AAG | 1           | 1          |
| Mbi28AAG  | 4           | 3          |
| Media     | 2,293       | 2,070      |

específicos en estudios de especies filogenéticamente próximas, los resultados deben ser cuidadosamente analizados, para evitar la inclusión de aquellos *loci* que puedan mostrar alelos nulos en los paneles usados para determinar la diversidad genética.

La pérdida de diversidad genética en meliponinos como consecuencia de la degradación de sus hábitats ha sido demostrada en estudios anteriores. Lopes *et al.* (2010) observaron un descenso de la heterocigosidad en *M. rufiventris* y *M. mondury* a causa del reducido número de colonias encontradas como consecuencia de la destrucción y fragmentación de sus ecosistemas naturales. Otros estudios revelaron que la fragmentación de los hábitats afecta en mayor medida a los individuos especialistas que a los generalistas (Kitahara y Fujii, 1994), como es el caso de las abejas sin aguijón (Zayed *et al.*, 2005). En el caso de *M. colimana*, al no ser una especie explotada para la producción, sus poblaciones están sujetas a los efectos de la deforestación y de

la destrucción de su hábitat. Aún así, en este estudio no se observaron diferencias significativas en la riqueza alélica por *locus* tras el análisis de rarefacción (**tabla III**) entre las colmenas situadas en la zona deforestada y la conservada, ya que en el momento del muestreo, la zona deforestada apenas llevaba dos años siendo talada (Macías, 2008). El hecho de que la degradación de los hábitats de *M. colimana* sea tan reciente podría explicar los valores similares en ambas zonas, ya que el tiempo transcurrido no es suficiente para que se aprecie el efecto sobre la pérdida de diversidad genética.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Fundación BBVA, el Fondo de Cooperación Internacional en Ciencia y Tecnología Unión Europea - México (FONCICYT) (proyecto MUTUAL 94.293) y SEP-CONACYT (proyecto 103341). Agradecemos la ayuda de O. Sánchez en el laboratorio y de I. Muñoz en el análisis de los datos.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Ayala, R. 1999. Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera: Apidae: *Meliponini*). *Folia Entomol Mex*, 106: 1-123.
- Borges, A.A.; Campos, L.A.O.; Salomão, T.M.F. and Tavares, M.G. 2010. Genetic variability in five populations of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae) from Minas Gerais state, Brazil. *Genet Mol Biol*, 33, 4: 781-784.
- Callen, D.F.; Thompson, A.D.; Shen, Y.; Phillips, H.A.; Richards, R.I.; Mulley, J.C. and Sutherland, G.R. 1993. Incidence and origins of *null* alleles in (AC)n microsatellite markers. *Am J Hum Genet*, 52: 922-927.
- Camargo, J.M.F. and Pedro, S.R.M. 2008. Meliponini Lepelletier, 1836. Moure, J. S.; Urban, D. and Melo, G.A.R. (Orgs). Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. <http://www.moure.cria.org.br/catalogue> (10/07/2011).
- Chapuis, M.P. and Estoup, A. 2006. Microsatellite *null* alleles and estimation of population differentiation. *Mol Biol Evol*, 24: 1-11.
- De la Rúa, P.; Galián, J.; Serrano, J. and Moritz, R.F.A. 2001. Molecular characterization and population structure of the honeybees from the Balearic Islands. *Apidologie*, 32: 417-427.
- González-Acereto, J.A. 2008. Cría y manejo de abejas nativas sin aguijón en México. Impresiones Planeta. México. 177 pp.
- Imperatriz-Fonseca, V.L. and Engels, W. 1990. Caste development, reproductive strategies and control of fertility in honeybees and stingless bees. In: Engels, W. (Ed.). Social insects: an evolutionary approach to castes and reproduction. Springer Verlag. Berlin. pp. 166-230.
- Kakutani, T.; Inoue, T.; Tezuka, T. and Maeta, Y. 1993. Pollination of strawberry by the stingless bee, *Trigona minangkabau*, and the honey bee, *Apis mellifera*: an experimental study of fertilization efficiency. *Res Popul Ecol*, 35: 95-111.



## ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES EN MELIPONINOS MESOAMERICANOS

- Kalinowski, S.T. 2005. HP-Rare: A computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity. *Mol Ecol Notes*, 5: 187-189.
- Kerr, W.E.; Carvalho, G.A.; Silva, A.C. and Assis, M.G.P. 2001. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parcerias Estratégicas*, 12: 20-41.
- Kitahara, M. and Fujii, K. 1994. Biodiversity and community structure of temperate butterfly species within a gradient of human disturbance - an analysis based on the concept of generalist vs specialist strategies. *Res Popul Ecol*, 36: 187-199.
- Leberg, P.L. 2002. Estimating allelic richness: effects of sample size and bottlenecks. *Mol Ecol*, 11: 2445-2449.
- Lopes, D.M.; Campos, L.A.; Salomão, T.M. and Tavares, M.G. 2010. Comparative study on the use of specific and heterologous microsatellite primers in the stingless bees *Melipona rufiventris* and *M. mondury* (Hymenoptera, Apidae). *Genet Mol Biol*, 33: 390-393.
- Macías, J.O.M. 2008. Costos ambientales en zonas de coyuntura agrícola. La horticultura en Sayula (México). *Agroalimentaria*, 26: 103-118.
- May-Itzá, W.de J.; Quezada-Euán, J.J.G.; Medina Medina, L.A.; Enríquez, E. and De la Rúa, P. 2010. Morphometric and genetic differentiation in isolated populations of the endangered Mesoamerican stingless bee *Melipona yucatanica* (Hymenoptera: Apoidea) suggest the existence of a two species complex. *Conserv Genet*, 11: 2079-2084.
- Michener, C.D. 2007. The bees of the world. 2<sup>nd</sup> ed. The Johns Hopkins University Press. Baltimore. USA. 953 pp.
- Paxton, R.J.; Weisâchuh, N. and Quezada-Euán, J.J.G. 1999. Characterisation of dinucleotide microsatellite loci for stingless bees. *Mol Ecol*, 8: 685-702.
- Peakall, R. and Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes*, 6: 288-295.
- Peters, J.M.; Queller, D.C.; Imperatriz-Fonseca, V.L. and Strassmann, J.E. 1998. Microsatellite loci for stingless bees. *Mol Ecol*, 7: 784-787.
- Quezada Euán, J.J.G. 2005. Biología y uso de las abejas sin aguijón de la península de Yucatán, México (Hymenoptera, *Meliponini*). Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. México. 112 pp.
- Quezada-Euán, J.J.G.; Paxton, R.J.; Palmer, K.A.; May-Itzá, W. de J.; Tay, W.T. and Oldroyd, B.P. 2007. Morphological and molecular characters reveal differentiation in a Neotropical social bee, *Melipona beecheii* (Apidae, *Meliponini*). *Apidologie*, 38: 247-258.
- Quezada-Euán, J.J.G.; May-Itzá, W. de J.; Rincón, M.; De la Rúa, P. and Paxton, R.J. 2012. Genetic and phenotypic differentiation in endemic *Scaptotrigona hellweperi* (Apidae: *Meliponini*): implications for the conservation of stingless bee populations in contrasting environments. *Insect Cons Div*, 5: 433-443.
- Roubik, D.W. 1989. Ecology and natural history of tropical bees. Cambridge University Press. Cambridge. 528 pp.
- Roubik, D.W. 2006. Stingless bee nesting biology. *Apidologie*, 37: 124-143.
- Van Oosterhout, C.; Hutchinson, W.F.; Wills D.P.M. and Shipley, P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes*, 4: 535-538.
- Viana, M.V.C.; Miranda, E.A.; de Francisco, A.K.; Carvalho, C.A.L. and Waldschmidt, A.M. 2011. Transferability of microsatellite primers developed for stingless bees to four other species of the genus *Melipona*. *Genet Mol Res*, 10: 3942-3947.
- Wilms, W.; Imperatriz-Fonseca, V.L. and Engels, W. 1996. Resource partitioning between highly eusocial bees and possible impact of the introduced Africanized honey bee on native stingless bees in the Brazilian Atlantic Rainforest. *Stud Neotrop Fauna E*, 31: 137-151.
- Yáñez-Ordóñez, O.; Trujano Ortega, A. y Llorente Bousquets, J. 2008. Patrones de distribución de las especies de la tribu *Meliponini* (Hymenoptera: Apoidea: Apidae) en México. *INCI*, 33: 41-45.
- Zayed, A.; Packer, L.; Gixti, J.C.; Ruz, L.; Owen, R.E. and Toro, H. 2005. Increased genetic differentiation in a specialist versus a generalist bee: implications for conservation. *Conserv Genet*, 6: 1017-1026.