UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Genética

Ivan de Castro

Caracterização populacional da abelha *Tetragona elongata* (Apidae, Meliponini)
e de seu fungo simbionte *Zygosaccharomyces sp.*

Ribeirão Preto - SP
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Genética

Caracterização populacional da abelha *Tetragona elongata* (Apidae, Meliponini)
e de seu fungo simbiote *Zygosaccharomyces sp.*

Ribeirão Preto - SP
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Castro, Ivan de

Caracterização populacional da abelha *Tetragona elongata* (Apidae, Meliponini) e de seu fungo simbiote *Zygosaccharomyces sp.*

Ribeirão Preto, 2019.

62 p : il.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética

Orientador: Soares, Ademilson Espencer Egea.

1. *Tetragona elongata*. 2. Morfometria geométrica. 3. DNA mitocondrial. 4. *Zygosaccharomyces*. 5. Simbiose.

Ivan de Castro

Caracterização populacional da abelha *Tetragona elongata* (Apidae, Meliponini) e de seu fungo simbiote *Zygosaccharomyces sp.*

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Genética

Orientador: Soares, Ademilson Espencer Egea

Aprovada em _____, _____, _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

A todos meus familiares e amigos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho...

...Dedico.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares, pela orientação e apoio para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Às Prof. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi e Prof. Dra. Zilá Luz Paulino Simões, pela permissão no uso do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas durante a realização de parte dos experimentos moleculares das abelhas.

Ao Prof. Dr. Tiago Maurício Franco, pela cessão de *primers*.

Ao auxílio essencial das Dra. Claudineia Pereira da Costa, Dra. Geusa Simone de Freitas e Me. Luana Bataglia, durante o experimento e análise molecular.

À Prof. Dra. Mônica Tallarico Pupo, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP Ribeirão Preto, pela recepção e colaboração no processo de isolamento e sequenciamento do fungo, bem como à ajuda de suas alunas, Dra. Camila Raquel Paludo e Me. Gabriela Toninato de Paula, e da técnica do seu laboratório Dra. Weilan Gomes da Paixão Melo.

Ao Prof. Dr. Weyder Cristiano Santana, da Universidade Federal de Viçosa, e aos meliponicultores Gerson Pinheiro e Estanislau Missio, pela cessão de algumas amostras.

À todos os amigos e funcionários do Bloco A do Departamento de Genética, pelo apoio e companheirismo.

À minha família e todos os amigos que me acompanharam durante esse período.

À Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina e ao Programa de Pós-Graduação em Genética, pela oportunidade concedida.

À agência governamental Fundação CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa.

Obrigado!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vista frontal (A) e lateral (B) de operária de *Tetragona elongata*; C e D. Entrada de um ninho em cavidade natural no oco de árvore; E. Vista superior dos discos de cria expostos de colmeia criada em caixa racional; F. O mesmo ninho com invólucro de cerume que recobre e protege os discos de cria; G. Operárias manipulando resina no interior da colmeia racional. H. Macho nos arredores de uma colmeia mostrando dimorfismo característico da espécie, com asas escuras.

Figura 2. Potes com alimento armazenado dentro de caixas para criação racional de *Tetragona elongata*: a) mel e b) pólen.

Figura 3. Vista superior das células de cria de *Tetragona elongata* desoperculadas, evidenciando a presença do pseudomicélio encontrado nas bordas internas de cada alvéolo, acima do alimento larval.

Figura 4: Mapa hipsométrico com a distribuição dos locais amostrados para este estudo. Pontos verdes indicam a origem das amostras de *Tetragona elongata* e pontos azuis o local de coleta das linhagens de *Zygosaccharomyces* isoladas dos ninhos dessas abelhas. FONTE: anexo I.

Figura 5: Mapa de vegetação com a distribuição dos locais amostrados para este estudo. Pontos pretos indicam a origem das amostras de *Tetragona elongata* e pontos azuis o local de coleta das linhagens de *Zygosaccharomyces* isoladas dos ninhos dessas abelhas. FONTE: anexo I.

Figura 6: Foto de asa anterior esquerda de operária de *Tetragona elongata*, fotografada em lupa com aumento de 20 vezes. Marcação indicando os 11 marcos anatômicos escolhidos para gerar os dados de morfometria geométrica.

Figura 7. Modelo do compartimento da caixa desenvolvido para abrigar os discos de cria e facilitar o acesso ao material durante o mapeamento do crescimento do fungo. A) Vista superior indicando o local onde foi posicionada a cria (região quadriculada); B, C e D) Vista

lateral com indicação da abertura lateral. Medidas estão em centímetros. Modelo tridimensional desenhado no programa SketchUp.

Figura 8. Caixa de observação com abertura lateral, contendo um ninho de *Tetragona elongata*. A) e B) Vista lateral da caixa, cuja tampa, que é presa por presilhas de pressão, quando é removida dá acesso à área de cria do ninho; B) e C) Vista lateral da área de cria sem a camada de invólucro, evidenciando a separação dos discos de cria novos (abaixo) e mais velhos (acima).

Figura 9. Pinça cruzada de aço inoxidável adaptada para coleta de células de cria na lateral dos discos.

Figura 10: Representação dos resíduos de Procrustes dos 11 marcos anatômicos marcados nas junções das nervuras das asas de forrageiras de *Tetragona elongata*. Pontos pretos representam os resíduos de Procrustes e pontos azuis representam a média de cada marco.

Figura 11: Porcentagem da variação encontrada nas 18 medidas de deformações relativas dos Componentes Principais, obtidas pela escolha de 11 marcos anatômicos nas junções das nervuras das asas de *Tetragona elongata*.

Figura 12: Representação gráfica da disposição relativa das populações de abelhas da espécie *Tetragona elongata*, obtida a partir da análise dos Componentes Principais dos 11 marcos anatômicos pontuados nas junções das nervuras das asas. PC1 (19,7%), PC2 (17,9%).

Figura 13: Porcentagem da variação encontrada nas 18 medidas de deformações relativas dos Componentes Principais (ANOVA), obtidas pela escolha de 11 marcos anatômicos nas junções das nervuras das asas de *Tetragona elongata*.

Figura 14: Representação gráfica da disposição relativa das populações de abelhas da espécie *Tetragona elongata* (elipses indicam a média), obtida a partir da Análise das Variáveis Canônicas dos 11 marcos anatômicos pontuados nas junções das nervuras das asas. CV1 (25,3%), CV2 (20,5%).

Figura 15: Representação gráfica da disposição relativa das populações de abelhas da espécie *Tetragona elongata* (elipses indicam a média), obtida a partir da Análise das Variáveis

Canônicas dos 11 marcos anatômicos pontuados nas junções das nervuras das asas. Ênfase ao Estado Mato Grosso. CV1 (25,3%), CV2 (20,5%).

Figura 16: Representação gráfica da disposição relativa das populações de abelhas da espécie *Tetragona elongata* (elipses indicam a média), obtida a partir da Análise das Variáveis Canônicas dos 11 marcos anatômicos pontuados nas junções das nervuras das asas. Ênfase ao Estado Paraná. CV1 (25,3%), CV4 (9,8%).

Figura 17: Representação gráfica da disposição relativa das populações de abelhas da espécie *Tetragona elongata* (elipses indicam a média), obtida a partir da Análise das Variáveis Canônicas dos 11 marcos anatômicos pontuados nas junções das nervuras das asas. Ênfase ao Estado São Paulo. CV1 (25,3%), CV4 (9,8%).

Figura 18: Representação gráfica da disposição relativa das populações de abelhas da espécie *Tetragona elongata* (elipses indicam a média), obtida a partir da Análise das Variáveis Canônicas dos 11 marcos anatômicos pontuados nas junções das nervuras das asas. Ênfase ao Estado Minas Gerais. CV1 (25,3%), CV4 (9,8%).

Figura 19: Representação gráfica da disposição relativa das populações de abelhas da espécie *Tetragona elongata* (elipses indicam a média), obtida a partir da Análise das Variáveis Canônicas dos 11 marcos anatômicos pontuados nas junções das nervuras das asas. Ênfase ao Estado Espírito Santo. CV1 (25,3%), CV4 (9,8%).

Figura 20: Discriminação par a par dos grupos de *Tetragona elongata* estudados pela análise de Função Discriminante mostrando a identificação dos Estados Espírito Santo e Paraná.

Figura 21: Discriminação par a par dos grupos de *Tetragona elongata* estudados pela análise de Função Discriminante mostrando a identificação dos Estados Mato Grosso e São Paulo.

Figura 22: Discriminação par a par dos grupos de *Tetragona elongata* estudados pela análise de Função Discriminante mostrando a identificação dos Estados Minas Gerais e Paraná.

Figura 23: Discriminação par a par dos grupos de *Tetragona elongata* estudados pela análise de Função Discriminante mostrando a identificação dos Estados Paraná e São Paulo.

Figura 24: Discriminação par a par dos grupos de *Tetragona elongata* estudados pela análise de Função Discriminante mostrando a identificação dos Estados Minas Gerais e Mato Grosso.

Figura 25: Rede de haplótipos para o gene CitB da Espécie *Tetragona elongata*. O tamanho das esferas representa o número de indivíduos e as linhas entre as esferas representam os sítios polimórficos com um passo mutacional cada.

Figura 26: Dendrograma de proximidade genética entre os haplótipos encontrados nas amostras de *Tetragona elongata* e outras espécies da tribo Meliponini usadas como grupo externo. As análises foram feitas segundo a metodologia de *Neighbor Joining* a partir da distância de HKY.

Figura 27: Culturas de leveduras *Zygosaccharomyces sp.* isoladas dos ninhos de *Tetragona elongata* e replicadas em meio de cultivo sólido nas placas de Petri. © Fotos por Gabriela Toninato de Paula.

Figura 28. Macrofotografias dos estágios de desenvolvimento da levedura *Zygosaccharomyces sp.* cultivada em meio sólido visualizada pela lupa. A) Início do crescimento com aspecto gelatinoso. B), C) e D) Estágio de produção das pseudohifas e formação do pseudomicélio.

Figura 29. Microfotografias confocais da levedura *Zygosaccharomyces sp.*, extraída e isolada dos ninhos de *Tetragona elongata*, marcadas com corante Vermelho do Nilo, evidenciando a presença das organelas com acúmulo de lipídeos.

Figura 30: Dendrograma de proximidade genética entre os haplótipos encontrados nas amostras de *Zygosaccharomyces* associado à *Tetragona elongata* e de outras espécies do mesmo gênero. As análises foram feitas segundo a metodologia de *Neighbor Joining* a partir da distância de HKY+G.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localidades e número amostral de cada região dos indivíduos de *Tetragona elongata* estudados.

Tabela 2: Distâncias quadradas de Mahalanobis (metade inferior da tabela) e distâncias de Procrustes (metade superior da tabela) entre as amostras de *Tetragona elongata* comparadas por Estados, obtidas através das Análises de Variáveis Canônicas. Todos os valores encontrados para distâncias quadradas de Mahalanobis e distâncias de Procrustes foram significantes.

Tabela 3: Distâncias quadradas de Mahalanobis (metade inferior da tabela) e distâncias de Procrustes (metade superior da tabela) entre as amostras de *Tetragona elongata* comparadas por Estados, obtidas através das Análises de Função Discriminante. Todos os valores encontrados para distâncias quadradas de Mahalanobis e distâncias de Procrustes foram significantes.

Tabela 4: Haplótipos e seus respectivos sítios variáveis. Números verticais correspondem à posição em pares de base dos sítios polimórficos dentro do fragmento do gene *CitB* de *Tetragona elongata*.

Tabela 5: Estimativa da divergência relativa entre as sequências, baseada no modelo Maximum Composite Likelihood (metade inferior da tabela) e número de passos mutacionais (metade superior da tabela), calculada entre os pares de haplótipos encontrados nas populações de *Tetragona elongata*.

Tabela 6: Sítios da subunidade 26S do gene ribossomal das linhagens de *Zygosaccharomyces sp.* isoladas da população amostrada de *Tetragona elongata*, que não variaram, comparados com sua variação nas linhagens de *Zygosaccharomyces* do grupo externo. A numeração das colunas identifica a posição em ordem crescente nos pares de bases da sequência onde ocorreram as mutações.

Tabela 7: Estimativa da divergência relativa entre as sequências, baseada no modelo HKY + G, calculada entre os pares de haplótipos encontrados nas populações de *Zygosaccharomyces* isolados de *Tetragona elongata* e das espécies do grupo externo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Meliponicultura	3
1.2. Simbiose na colmeia.....	5
1.3. O modelo biológico.....	7
1.4. Acessando a variabilidade populacional	8
1.4.1. Morfometria geométrica de asas	8
1.4.2. DNA Mitocondrial	9
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Material biológico	12
3.2. Morfometria geométrica de asas	15
3.3. Extração do DNA das abelhas.....	16
3.4. Amplificação do DNA	17
3.5. Análise molecular da abelha	17
3.6. Análises do fungo.....	18
3.6.1. Mapeamento do crescimento do fungo nos discos de cria	18
3.6.2. Isolamento, extração, amplificação e sequenciamento do DNA	20
3.7. Análise molecular do fungo	20
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Morfometria	22
4.2. Análise molecular das abelhas	31
4.3. Cultivo e isolamento do fungo	34
4.4. Análise molecular do fungo	36
5. DISCUSSÃO.....	39
6. CONCLUSÃO	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

RESUMO

Castro, I. **Caracterização populacional da abelha *Tetragona elongata* (Apidae, Meliponini) e de seu fungo simbionte *Zygosaccharomyces sp.*** 2019. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Departamento de Genética, USP, Ribeirão Preto.

As abelhas sem ferrão compõem um grupo importante de polinizadores nativos e participam da manutenção de ecossistemas, com grande potencial para serem usadas na agricultura, em recuperação de áreas degradadas e educação ambiental, além do fornecimento de produtos para consumo humano. Neste trabalho, buscamos elucidar a relação simbiótica observada entre a espécie de levedura *Zygosaccharomyces sp.* e a abelha *Tetragona elongata*, da tribo Meliponini, cuja presença na dieta das larvas se mostra essencial para seu desenvolvimento. Para isso, a estruturação populacional da abelha foi verificada por meio da análise de marcador mitocondrial, através do gene *CitB*, juntamente com análises morfométricas de asas. Para a caracterização populacional do fungo foi utilizado como marcador molecular a subunidade 26S de seu gene ribossomal. Dada a extensão do território amostrado para a abelha, as análises mostraram uma estruturação sutil com a identificação de alguns haplótipos exclusivos em poucas localidades, o que pode ser explicado pelo comércio de colmeias entre os criadores. Entretanto, os dados de morfometria permitiram a correta identificação de indivíduos de alguns grupos quando comparados entre regiões distantes através da Análise de Variação Canônica e Função Discriminante. O marcador utilizado para traçar o perfil da estrutura populacional do fungo apresentou uma nítida separação genética de outras linhagens do mesmo gênero, servindo como identificador para a espécie, porém, não se mostrou eficaz em discriminar subpopulações, apresentando um grau elevado de conservação e sem variações, mesmo em linhagens separadas por longas distâncias. Esse resultado corrobora e suporta a hipótese de que tais micro-organismos estejam em constante dependência das abelhas e que acompanham sua dispersão pelo território, dada sua importância alimentar que garante o sucesso no desenvolvimento da cria. Como desdobramento deste estudo, o isolamento do fungo também garante que as técnicas utilizadas para obtenção artificial de rainhas de *Tetragona elongata* sejam aprimoradas.

Palavras-chave: *Tetragona elongata*; Morfometria geométrica; DNA mitocondrial; *Zygosaccharomyces*; Simbiose.

ABSTRACT

Castro, I. **Population characterization of the bee *Tetragona elongata* (Apidae, Meliponini) and its symbiotic fungus *Zygosaccharomyces* sp.** 2019. Thesis (Doctorate) - Medicine Faculty, Genetics Department, USP, Ribeirão Preto.

The stingless bees represent an important group of native pollinators and participate in ecosystems maintenance, with great potential for use in agriculture, recovery of degraded areas and environmental education, as well as the supply of products for human consumption. In this work, we seek to elucidate the symbiotic relationship observed between the yeast *Zygosaccharomyces* sp. and the bee *Tetragona elongata*, from the Meliponini tribe, whose presence in the larvae diet is essential for its development. For this, the population structure of the bee was verified through the mitochondrial marker analysis, through the CitB gene, along with morphometric analyzes of the wings. For the population characterization of the fungus the 26S subunit of its ribosomal gene was used as molecular marker. Given the extension of the territory sampled for the bee, the analyzes showed a subtle structure with the identification of some unique haplotypes in a few localities, which can be explained by the trade of hives among beekeepers. However, morphometric data allowed the correct identification of individuals from some groups when compared between distant regions through Canonical Variation Analysis and Discriminant Function. The marker used to trace the population structure of the fungus showed a clear genetic separation of other lineages of the same genus, serving as an identifier for the species, but it was not effective in discriminating subpopulations, presenting a high degree of conservation and without variations, even in strains separated by long distances. This result corroborates the hypothesis that these microorganisms are in constant dependence on the bees and that they accompany their dispersion throughout the territory, given their importance as larval food that guarantees success in the development of the brood. As a result of this study, this fungus isolation also ensures that the techniques used to obtain *Tetragona elongata* artificial queens are improved.

Keywords: *Tetragona elongata*; Geometric morphometrics; Mitochondrial DNA; *Zygosaccharomyces*; Symbiosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Meliponicultura

A criação racional de abelhas sem ferrão, denominada meliponicultura, nos fornece diversos produtos da colmeia bem como a possibilidade de sua aplicação no manejo agrícola sustentável, através da polinização de culturas (Nogueira-Neto, 1997; Malagodi-Braga, 2002; Slaa *e cols.*, 2006; Imperatriz-Fonseca *e cols.*, 2007). Entretanto, o serviço de polinização, que é essencial para manutenção de ecossistemas terrestres, está ameaçado devido à diminuição dos polinizadores observada em escala global (Cortopassi-Laurino *e cols.*, 2006; Vamosi *e cols.*, 2006).

Dessa forma, a manutenção de colônias de meliponíneos busca, além da preservação das espécies nativas, propiciar conhecimento e material biológico para as pesquisas e seus desdobramentos. Nesse sentido, os trabalhos recentes relacionados à obtenção de ninhos em larga escala deram um passo importante com avanços na criação de rainhas em laboratório (Baptistella, 2009; Menezes, 2010; Prato, 2011; Castro, 2012).

O alvo deste estudo é a espécie *Tetragona elongata* (Lepeletier e Serville, 1828), cuja nomenclatura anterior (*Tetragona. clavipes*) foi atualizada após uma revisão recente (Pedro, 2014). Ela pertence ao grupo dos meliponíneos trigoniformes e encontra-se distribuída principalmente nos estados da região sudeste (SILVEIRA *e cols.*, 2002).

A predominância das espécies do gênero *Tetragona* ocorre em regiões desde o México até o sudeste do Brasil, compreendendo dezesseis espécies concentradas na maior parte da área amazônica (MICHENER, 2007). De acordo com o Catálogo de Abelhas Moure (CAMARGO e PEDRO, 2008), além de *Tetragona elongata* mais oito espécies estão descritas em território brasileiro: *T. clavipes* (Fabricius, 1804); *T. dorsalis* (Smith, 1854); *T. essequiensis* (Schwarz, 1940); *T. goettei* (Fries, 1900); *T. handlirschii* (Fries, 1900); *T. kaieurensis* (Schwarz, 1938); *T. truncata* (Moure, 1971); *T. zieglerei* (Fries, 1900) e *T. quadrangula* (Lepeletier, 1836).

As operárias de *Tetragona elongata* possuem entre 6 e 8 mm de comprimento, cor dourada e abdômen com listras pretas (Figura 1A, 1B). São muito defensivas, mordendo e depositando resina em quem se aproxima do ninho, que é construído nas cavidades dos troncos, podendo também ocupar paredes, muros e chaminés de alvenaria nas áreas urbanizadas. A entrada da colônia, cuja aparência também é usada para sua identificação, é

construída com resinas vegetais que enrijecem com o passar do tempo e formam um túnel com abertura achatada (Figura 1C, 1D).

Figura 1. Vista frontal (A) e lateral (B) de operária de *Tetragona elongata*; C e D. Entrada de um ninho em cavidade natural no oco de árvore; E. Vista superior dos discos de cria expostos de colmeia criada em caixa racional; F. O mesmo ninho com invólucro de cerume que recobre e protege os discos de cria; G. Operárias manipulando resina no interior da colmeia racional. H. Macho nos arredores de uma colmeia mostrando dimorfismo característico da espécie, com asas

Assim como em outras espécies do seu grupo, os discos de cria são construídos em formato helicoidal (Figura 1E), isolados e protegidos pelo invólucro de cerume (Figura 1F). O alimento (pólen e mel) é estocado separadamente em potes de cerume com cerca de três a quatro centímetros de altura cada (Figura 2), posicionados ao redor do invólucro.

Figura 2. Potes com alimento armazenado dentro de caixas para criação racional de *Tetragona elongata*: a) mel e b) pólen.

Por formar colônias populosas, é uma espécie que coleta e armazena uma grande quantidade de néctar, pólen e resinas vegetais (própolis, Figura 1G), apresentando assim um potencial relevante para o fornecimento desses produtos em escala comercial (Duarte, 2012), além da cera e sua atividade de polinização.

A diferenciação entre os indivíduos machos e fêmeas pode ser feita a olho nu quando estes são adultos. Os machos têm o corpo e as asas escurecidos e posicionam-se imóveis ao redor dos ninhos quando formam as agregações, um comportamento comum de meliponíneos na época de enxameação (Figura 1H).

As operárias possuem coloração mais clara, com corbículas bem desenvolvidas e a extremidade distal das asas esbranquiçadas (Figuras 1B, 1E e 1G). As rainhas têm a mesma coloração das operárias, porém com cabeça e olhos menores e ausência de corbículas.

1.2. Simbiose na colmeia

Durante a criação artificial das larvas de determinadas espécies de abelhas sem ferrão, observou-se uma interação até então desconhecida: a presença natural de fungos no alvéolo de cria, cujas hifas fazem parte da dieta das larvas. Desde então, a ocorrência dessa interação foi relatada em detalhes para duas espécies de abelhas: *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Menezes,

2010; Paludo, 2017; Paludo e cols., 2018) e *Tetragona elongata* (Figura 3; Castro, 2012). As análises preliminares sugeriram que se trata de fungos diferentes, indicando uma possível especificidade dessas linhagens com as abelhas respectivas, e sua importância na dieta das larvas foi confirmada em experimentações com *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Menezes, 2013).

Figura 3. Vista superior das células de cria de *Tetragona elongata* desoperculadas, evidenciando a presença do pseudomicélio encontrado nas bordas internas de cada alvéolo, acima do alimento larval.

Todavia, durante a criação em laboratório das larvas de *Tetragona elongata*, não foi possível cultivar simultaneamente o tipo específico de fungo que é observado associado naturalmente a essa espécie de abelha, o que também havia impedido o seu isolamento e identificação. Assim, embora muitas rainhas produzidas nesta etapa se desenvolveram sem ingeri-lo em grande quantidade, houve uma taxa de mortalidade elevada em vários estágios do desenvolvimento (Castro, 2012).

Posteriormente, em experimentos realizados com os fungos encontrados nos ninhos de *Scaptotrigona* aff. *depilis*, foi confirmado que o material que as larvas das abelhas ingerem são, na realidade, um pseudomicélio formado por pseudohifas, produzidas por um tipo específico de levedura pertencente ao gênero *Zygosaccharomyces* em determinada fase do seu desenvolvimento (Paludo, 2017). Foi mostrado que, além da ingestão do alimento larval presente na célula de cria, a ingestão concomitante do fungo proporciona o desenvolvimento adequado das larvas, uma vez que essa levedura possui adipossomos em grande quantidade, que acumulam lipídios e esteroides e são essenciais para o processo da transição entre estágios larvais, até a formação da pupa (Paludo e cols., 2018).

1.3. O modelo biológico

Os meliponíneos possuem comportamento eussocial, ou seja, constituem colônias ocupadas por uma rainha, que é a responsável pela postura de ovos e coesão da colônia através da liberação de feromônios; pelos machos, com função predominante de reprodução, e centenas ou milhares de operárias, que realizam todos os trabalhos relativos à construção e manutenção da colônia, incluindo a coleta e processamento do alimento, cuidados com a cria e defesa do ninho. As fêmeas são morfologicamente diferenciadas em castas e apresentam uma divisão de trabalho com sobreposição de gerações (Nogueira-Neto, 1997).

O mecanismo de determinação do sexo, assim como para todos os insetos da ordem Hymenoptera, é haplodiplóide, chamado de sistema complementar de determinação do sexo (*cds*), e é determinado por um único *locus* gênico com muitos alelos. Por isso, ovos não fertilizados (haplóides), que apresentam uma cópia do *cds* dão origem a zangões, enquanto ovos fertilizados (diplóides) que apresentam duas cópias diferentes de alelos de *cds* originam as fêmeas (Whiting, 1943).

Nessas abelhas, com exceção do gênero *Melipona*, a rainha emerge de uma célula diferenciada construída pelas operárias, chamada de célula real, em que a larva se alimenta de uma quantidade maior de comida, que consiste no alimento larval. Após sua fecundação, realizada por um único macho durante o voo nupcial, a rainha volta para a colônia em formação e desenvolve seu abdome, tornando-se fisogástrica e perdendo assim a sua capacidade de voar (Nogueira-Neto, 1997).

Suas colônias consistem em ninhos perenes e não são abandonados mesmo nos períodos com maior escassez de recursos (Neves e Viana, 2002). Outro aspecto característico é que a formação de um ninho novo, processo denominado de enxameação, ocorre dentro de uma distância curta do ninho matriz, justamente pelo fato da colônia filha depender da colônia mãe para a obtenção dos materiais de construção e alimento, até que esteja estabelecida e independente (Nogueira-Neto, 1997).

Pelo padrão observado na distribuição dos haplótipos mitocondriais e o modo de dispersão no espaço geográfico, é aceito que as fêmeas das abelhas sem ferrão são as responsáveis pela ocupação das áreas novas e que o processo é realizado a partir de um número baixo de fêmeas, caracterizando um efeito fundador (Miranda, 2016). Enquanto que os machos são os responsáveis pelo fluxo gênico e dispersão da variabilidade, diminuindo as chances para o endocruzamento (Miranda, 2016; Paxton, 2000). Além disso, o papel dos machos em promover a panmixia é essencial para manutenção perene da população, uma vez

que as abelhas são particularmente sensíveis aos efeitos da endogamia com a possível produção de machos diplóides estéreis, pelo fato do sistema de determinação sexual envolver um único *locus* (Zayed, 2009).

1.4. Acessando a variabilidade populacional

1.4.1. Morfometria geométrica de asas

Uma abordagem muito utilizada na diferenciação dos indivíduos baseia-se na aferição geométrica das asas, considerada uma técnica rápida e de custo baixo, já implementada com sucesso na identificação e caracterização da diversidade de abelhas sem ferrão em diversos estudos, cuja análise tornou-se uma característica informativa importante para estudos interespecíficos e também de populações (Francoy e cols, 2008; Francoy e Imperatriz-Fonseca, 2010; Araújo, 2010; Silva-Neto e cols, 2016), podendo ser útil ainda na diferenciação entre espécies crípticas (Murray, 2007) e entre castas (Castro, 2012).

Seus primeiros usos começaram na década de 1990 (Bookstein, 1991) para detectar pequenas variações morfológicas que eram imperceptíveis nas análises tradicionais (Villemant, Simbolotti e cols, 2007), por quantificar a variação e visualizar claramente as alterações na forma, reconstruindo os dados em um formato gráfico (Bookstein, 1991).

Nesse método, através de fotos das asas das abelhas, são identificados alguns marcos anatômicos de regiões homólogas entre as amostras (Rohlf e Marcus, 1993; Moraes, 2003), geralmente os pontos de cruzamento ou contato das veias da asa anterior. Dessa forma, cria-se um mapa com coordenadas cartesianas dos pontos relativos a cada marco anatômico das asas dos indivíduos amostrados, o que permite a comparação de mudanças sutis no padrão de venação.

A partir da sobreposição das imagens, são feitos o redimensionamento e a rotação dos pontos com base nos centroides das figuras, para que todas se alinhem e tenham o mesmo tamanho. Essa etapa evidencia apenas a variação proporcional da forma e anula a influência ambiental que afeta o desenvolvimento dos organismos. A seguir, as posições de cada ponto homólogo são testadas em busca da menor distância entre eles para se chegar a um ponto consenso (Rohlf, 1999), e a diferença entre as distâncias de cada ponto homólogo amostrado e o ponto homólogo de consenso gera os chamados resíduos de Procrustes (Rodrigues e Santos, 2003), que são agrupados pela análise estatística (Rohlf e Slice, 1990).

1.4.2. DNA Mitochondrial

O DNA mitocondrial (mtDNA) é um marcador molecular que possui características favoráveis para a compreensão da história evolutiva de populações (Moritz; Dowling; Brown, 1987). Em vários estudos de genética de populações observou-se os padrões marcantes na configuração espacial das linhagens de mtDNA, evidenciando que sua genealogia é relacionada à geografia do local (Avise, 2009), e tem se mostrado muito útil em diversos trabalhos sobre estruturas populacionais, estudos da diversidade genética e filogeográficos das abelhas (Arias e cols., 2006; Batalha-Filho e cols., 2010; Francisco; Arias, 2009; Miranda e cols., 2016).

Dentre as características que podemos citar para esse grande potencial do mtDNA em tais estudos está o fato dessa molécula ser fácil de isolar e possuir uma estrutura genética muito simples e compacta, não possuindo sequências repetitivas, elementos transponíveis, pseudogenes ou íntrons; também apresenta uma taxa alta de evolução em relação ao genoma nuclear e seus genes são bastante conservados nos animais (Avise e cols., 1987). Além disso, devido à sua herança não ser recombinante e ter predominância materna, normalmente suas mutações refletem a variação genética (haplótipos) observada em populações que coexistem dentro da mesma espécie. Assim, a história da linhagem materna retém as alterações sofridas na sequência nucleotídica dos indivíduos, tornando importante a abordagem do seu estudo como marcador (Avise, 2009).

O genoma mitocondrial possui atualmente entre 16 a 20 quilobases (Kb) nos animais (AVISE e cols., 1987), e nos meliponíneos seu tamanho total é aproximado a 18.500 pares de bases (pb) (Francisco; Silvestre; Arias, 2001). Possui 37 genes, dos quais dois codificam as subunidades ribossômicas (12S e 16S); 22 codificam os RNA transportadores (RNAt); 3 codificam as subunidades da enzima citocromo oxidase (COI, II e III); 1 codifica o citocromo B; 2 codificam as subunidades da enzima ATPase (subunidades 6 e 8); e 7 codificam as subunidades da enzima NADH desidrogenase.

Dentre seus genes responsáveis pela codificação de proteínas, o Citocromo Oxidase I (COI) é muito conservado em relação à evolução dos seus aminoácidos e assim apresenta taxa menor de evolução (SIMONS e cols., 1994). Sua expressão forma uma proteína essencial para a cadeia respiratória, sendo, portanto, muito conservado nos organismos que dependem da fosforilação oxidativa. Apesar disso, o COI possui alterações nucleotídicas que permitem a diferenciação entre as espécies (Waugh, 2007), sendo também considerado importante na identificação de espécies através do código de barras de DNA ou *DNA barcode* (Hebert e cols., 2003).

Devido ao modo de dispersão das abelhas indígenas e seu comportamento de reprodução, que depende muito da história das rainhas, esse marcador se mostra muito adequado (Miranda e cols., 2016).

Estudos biogeográficos também concluíram que a análise cruzada de dados moleculares de espécies de alguns insetos que dependem de fungos simbioss para desenvolvimento de suas larvas (como certos besouros) e de tais micro-organismos relacionados, possibilita uma investigação sobre a estrutura genética de populações das espécies envolvidas, pois é esperada uma variação com padrões compartilhados de distribuição espacial nos dois grupos (James *e cols.*, 2011).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é aprofundar a investigação da relação entre a abelha *Tetragona elongata* e o fungo *Zygosaccharomyces sp.* presente na sua dieta durante o estágio larval, buscando confirmar essa interação mutualística e verificar a hipótese de que compartilham semelhanças no padrão de dispersão.

Assim, temos como objetivos específicos:

- Testar a hipótese de que as populações de *Tetragona elongata*, bem como do fungo *Zygosaccharomyces sp.* a ela associado, estejam estruturadas em linhagens evolutivas, conforme sua área de ocorrência;
- A partir do isolamento do fungo, extrair seu DNA, amplificar e sequenciar a região do gene ribossomal 26S para usá-la nas análises, compilando esses dados para sua identificação e catalogação.
- Contribuir para o aprimoramento da técnica de obtenção artificial das rainhas de *Tetragona elongata* a partir do isolamento e manejo adequado da levedura, que se mostra essencial para sua dieta.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

As amostras das abelhas *Tetragona elongata* analisadas foram provenientes da região Sul, Sudeste e Centro Oeste (Tabela 1; Figura 4 e Figura 5).

Localidade	N
Ribeirão Preto	8
Franca SP	4
Santa Cruz da Esperança SP	1
Luiz Antônio SP	6
Uberlândia MG	1
Várzea da Palma MG	2
Caratinga MG	1
Conceição de Aparecida MG	2
Boa Esperança MG	1
Londrina PR	1
Sapopema PR	1
Antonina PR	1
Ivaí PR	1
Chapada dos Guimarães MT	1
Cuiabá MT	1
Aracruz ES	1
Total	33

Tabela 1. Localidades e número amostral de cada região dos indivíduos de *Tetragona elongata* estudados.

Figura 4: Mapa hipsométrico com a distribuição dos locais amostrados para este estudo. Pontos verdes indicam a origem das amostras de *Tetragona elongata* e pontos azuis o local de coleta das linhagens de *Zygosaccharomyces* isoladas dos ninhos dessas abelhas. FONTE: anexo I.

Figura 5: Mapa de vegetação com a distribuição dos locais amostrados para este estudo. Pontos pretos indicam a origem das amostras de *Tetragona elongata* e pontos azuis o local de coleta das linhagens de *Zygosaccharomyces* isoladas dos ninhos dessas abelhas. FONTE: anexo I.

3.2. Morfometria geométrica de asas

Para esta análise, marcos anatômicos são posicionados usando como referência as junções das veias da asa através do programa computacional tpsDIG2 (versão 2.16) (Figura 6). Após as marcações em todas as fotos, o programa gera uma matriz de dados com as respectivas coordenadas cartesianas referentes a cada marco anatômico de todas as asas e, a partir desses dados, gera-se um banco de entrada (arquivo .tps), usado pelo programa MorphoJ (versão 1.04a). Esses programas são de acesso livre, disponíveis no endereço eletrônico <http://life.bio.sunysb.edu/morph/index.html>.

As asas são retiradas das abelhas com auxílio de pinça e mantidas em álcool 70% para retirada de resíduos, em seguida montadas em lâmina de microscopia ótica e fotografadas com uso de lupa no aumento de vinte vezes. Foram analisadas as asas anteriores esquerdas de 10 operárias de cada colmeia.

Com a matriz de covariância, gerada pelo MorphoJ, é feita a análise entre os componentes principais (PCA) que apresentarem variação da forma, baseando-se na diferença da configuração da posição relativa entre os marcos anatômicos homólogos, então reconstruídos pelo programa.

Figura 6: Foto de asa anterior esquerda de operária de *Tetragona elongata*, fotografada em lupa com aumento de 20 vezes. Marcação indicando os 11 marcos anatômicos escolhidos para gerar os dados de morfometria geométrica.

Os resultados podem ser visualizados em três tipos de gráficos: com a dispersão dos valores do componente principal (*PC scores*); na mudança de forma do componente principal (*PC shape changes*) e da porcentagem da variância total para cada componente principal (*Eigenvalues*).

3.3. Extração do DNA das abelhas

A extração de DNA das abelhas seguiu o seguinte protocolo:

- 1 – Em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml foram colocados 80 µL de EDTA (c=0,5 M; pH=8,0) e 300 µL de solução de lise de núcleo (Promega). Em seguida resfriado no gelo;
- 2 – A abelha foi macerada;
- 3 – Adicionados 15 µL de Proteinase K (20 ng/mL) à solução em seguida agitada;
- 4 – Banho maria a 65° C durante duas horas;
- 5 – Acrescentados 1,5 µL de RNase à solução, misturando a amostra invertendo o tubo 2-5 vezes. Incubada a 37° C por 30 minutos. Após essa etapa a amostra foi deixada à temperatura ambiente por 5 minutos.
- 6 – Colocados 150 µL de solução de precipitação de proteína (Promega). Misturada no agitador durante 20 segundos e mantida no gelo por 10 minutos.
- 7 – Centrifugação durante 6 minutos a 13000-16000 xg. As proteínas precipitam, sendo formado um *pellet* branco.
- 8 – Sobrenadante contendo o DNA foi transferido para novos tubos e adicionados 400 µL de isopropanol, e colocado no gelo.
- 9 – A solução foi misturada gentilmente invertendo-se o tubo.
- 10 – Centrifugação da amostra durante 2 minutos a 13000-16000xg. O DNA formou um *pellet* translúcido. Em seguida o sobrenadante foi retirado cuidadosamente, vertendo o tubo após verificar se o pellet estava preso à parede do tubo.
- 11 – Adicionados 400 µL de etanol 70% (temperatura ambiente); Tubo invertido gentilmente algumas vezes para lavar o DNA.
- 12 - Amostra centrifugada durante 2 minutos a 13000-16000xg.
- 13 – Sobrenadante retirado cuidadosamente e os tubos levados à placa aquecedora (40° C) durante 30 minutos para evaporar o álcool.

14 – De 60 µL a 100 µL de H₂O mili-Q autoclavada adicionados ao tubo com o DNA e amostras incubadas a 4° C.

3.4. Amplificação do DNA

O gene *Citocromo B* (*CitB*), abordado nas análises da variabilidade do DNA mitocondrial utilizado nesse estudo, foi previamente caracterizado por Simon e cols., (1994). As Reações da Polimerase em Cadeia – PCR – foram preparadas com a adição de 2,5 µl do DNA total extraído, 2,5 µl (10 µM) de cada *primer*, 25 µl *Promega* Master Mix 2x em um volume total de 50 µl em água ultrapura livre de nucleases. As condições dessas reações foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C, por três minutos, seguida por 35 ciclos, com três etapas – desnaturação do DNA molde a 94°C por um minuto, anelamento dos *primers* a 49°C por um minuto e extensão a 72°C por dois minutos – seguidos por uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Posteriormente, o fragmento amplificado foi visualizado em gel de agarose 1% em tampão 1x TBE (0,45M Tris Base; 0,45M Ácido Bórico; 0,5M EDTA, pH 8,0), corado com UniSafe Dye 20.000x (Uniscience). Os fragmentos amplificados foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (*Promega*), seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, foram submetidos ao sequenciamento no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – *Campus* UNESP Jaboticabal (CREBIO).

3.5. Análise molecular da abelha

As sequências *forward* (5'-3') e o complemento de *reverse* (3'-5') foram alinhadas e editadas usando o programa Geneious 8.0.5 (Kearse e cols., 2012) através da opção *MUSCLE alignment*, com o número máximo de interações sendo igual a 8. O fragmento de DNA consenso foi comparado à sequências preditas de genoma mitocondrial de *CitB* de outras espécies da tribo Meliponini no banco de dados NCBI, através da ferramenta online BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). *Tetragona dorsalis* (número de acesso AF002725.1), *Tetragonisca angustula* (número de acesso KF223946.1) e *Trigona hypogea* (número de acesso AF181617.1) foram as espécies escolhidas para serem alinhadas contra as sequências de *Tetragona elongata* e utilizadas como grupo externo nas análises.

Os haplótipos foram separados de acordo com seus respectivos grupos através do programa DnaSP 6.12.03 (Librado e Rozas, 2009), o qual também foi utilizado para

determinar o número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π) e o número médio de diferenças nucleotídicas (k).

Com o auxílio do programa NETWORK 5.0.1.1 (Polzin, 2003), a rede de haplótipos foi construída, utilizando-se o algoritmo *Median Joining*, o qual identifica os haplótipos mais proximamente relacionados. Com o auxílio do programa MEGA 10.0.5 (Tamura e cols., 2011), foi calculada a matriz de distância (d) entre os indivíduos e os haplótipos, através do modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), o qual apresentou a menor pontuação BIC (*Bayesian Information Criterion*).

3.6. Análises do fungo

O isolamento, cultivo e identificação do fungo foram realizados no Laboratório de Química de Micro-organismos (LQMo) da Prof. Mônica Tallarico Pupo, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto USP, e foi baseado na metodologia de Sharma e Singh, 2005 e Kurtzman e Robnett, 1998.

3.6.1. Mapeamento do crescimento do fungo nos discos de cria

Para acompanhar as etapas de crescimento do fungo desde o seu surgimento dentro das células de cria, foi construída uma caixa para criação racional adaptada para essa finalidade (Figura 7 e Figura 8).

Isso permitiu uma observação mais acurada da dinâmica de crescimento do fungo desde seu estágio inicial dentro dos alvéolos (células de cria), o que possibilitou classificar as etapas do surgimento do pseudomicélio, que em determinado momento é totalmente consumido pelas larvas, não sendo mais visualizado na fase pré-pupa da larva.

Uma pinça cruzada de aço inoxidável (Figura 9) foi adaptada para facilitar a coleta de células de cria junto aos discos que contêm o pseudomicélio já formado, com o fungo em grande quantidade na periferia dos discos. O procedimento consiste em aquecer a ponta da pinça (que tem formato de bico de pato) usando um mini maçarico. Em seguida, é feita a inserção da ponta da pinça aberta entre os espaços superior e inferior do disco alvo da coleta. Ao ser fechada, o aço aquecido derrete a cera do disco e rompe as células, que são então retiradas para o exterior do ninho.

Figura 7. Modelo do compartimento da caixa desenvolvido para abrigar os discos de cria e facilitar o acesso ao material durante o mapeamento do crescimento do fungo. A) Vista superior indicando o local onde foi posicionada a cria (região quadriculada); B, C e D) Vista lateral com indicação da abertura lateral. Medidas estão em centímetros. Modelo tridimensional desenhado no programa SketchUp.

Figura 8. Caixa de observação com abertura lateral, contendo um ninho de *Tetragona elongata*. A) e B) Vista lateral da caixa, cuja tampa, que é presa por presilhas de pressão, quando é removida dá acesso à área de cria do ninho; B) e C) Vista lateral da área de cria sem a camada de invólucro, evidenciando a separação dos discos de cria novos (abaixo) e mais velhos (acima).

Figura 9. Pinça cruzada de aço inoxidável adaptada para coleta de células de cria na lateral dos discos.

O pseudomicélio do fungo foi analisado através de microscopia ótica confocal, com uso de corante fluorescente Vermelho do Nilo para investigar seu conteúdo. Essa etapa foi conduzida no Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC), que está situado no Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

3.6.2. Isolamento, extração, amplificação e sequenciamento do DNA

Cada amostra de disco de cria contendo o fungo em estágio avançado de crescimento, com o pseudomicélio visível a olho nu, foi transferida para uma placa de Petri isolada com filme de PVC para conservar a umidade e transportada dentro de caixa térmica até o laboratório. Numa capela de exaustão de gases, o pseudomicélio foi coletado do interior dos alvéolos com auxílio de espátula esterilizada, em seguida foi inoculado no meio de cultivo e mantido dentro de estufa incubadora D.B.O. a 30° C.

O meio de cultivo que se mostrou adequado para o desenvolvimento das leveduras é composto por água, agar, glicose e extrato de levedura.

3.7. Análise molecular do fungo

Após o sequenciamento da região 26S do gene ribossomal das amostras isoladas, as sequências *forward* (5'-3') e *reverse* (3'-5') foram alinhadas e editadas usando o programa Geneious 8.0.5 (Kearse e cols., 2012) através da opção *MUSCLE alignment*, com o número máximo de interações sendo igual a 8. O fragmento de DNA foi comparado às sequências preditas para a porção 26S de outras espécies no banco de dados NCBI, através da ferramenta

online BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). *Zygosaccharomyces gambellarensis* (número de acesso JN874489.1), *Zygosaccharomyces machadoi* (número de acesso AF432228.1), *Zygosaccharomyces rouxii* (número de acesso KY653136) e *Zygosaccharomyces sp.* cepa SDLF30G1 (número de acesso KY766952.1) foram as espécies escolhidas para serem alinhadas contra as sequências estudadas das linhagens de *Zygosaccharomyces sp.* isoladas de *Tetragona elongata* e utilizadas como grupo externo nas análises.

Os haplótipos foram separados de acordo com seus respectivos grupos através do programa DnaSP 6.12.03 (Librado e Rozas, 2009), o qual também foi utilizado para determinar o número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π) e o número médio de diferenças nucleotídicas (k).

Com o auxílio do programa NETWORK 5.0.1.1 (Polzin, 2003), a rede de haplótipos foi construída, utilizando-se o algoritmo *Median Joining*, o qual identifica os haplótipos mais proximamente relacionados. Com o auxílio do programa MEGA 10.0.5 (Tamura e cols., 2011), foi calculada a matriz de distância (d) entre os indivíduos e os haplótipos, através do modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) + G, o qual apresentou a menor pontuação BIC (*Bayesian Information Criterion*).

4. RESULTADOS

4.1. Morfometria

Um total de 295 amostras das asas dianteiras esquerdas de forrageiras de *Tetragona elongata* foram identificadas conforme cada localidade de origem, totalizando 17 grupos: Antonina PR, Aracruz ES, Boa Esperança MG, Campus USP RP, Caratinga MG, Chapada dos Guimarães MT, Conceição de Aparecida MG, Cuiabá MT, Franca SP, Ivaí PR, Londrina PR, Luis Antônio SP, Ribeirão Preto SP (*ninhos externos ao Campus*), Sapopema PR, Santa Cruz da Esperança SP, Uberlândia MG e Várzea da Palma MG.

A partir da posição consenso de cada um dos 11 marcos anatômicos marcados nas nervuras das asas, foram obtidos os resíduos de Procrustes (Figura 10), nos quais foram observados que a maioria dos pontos variou de forma isotrópica, ou seja, distribuídos circularmente em torno da média e aparentemente sem tendência de variação, o que pode se relacionar pela variação casual dos marcos anatômicos ou às pequenas variações durante a marcação dos pontos; entretanto, alguns desses marcos (6, 8 e 9) aparentemente variaram de forma alométrica, mostrando uma tendência na variação que pode indicar a seleção de uma característica.

Figura 10: Representação dos resíduos de Procrustes dos 11 marcos anatômicos marcados nas junções das nervuras das asas de forrageiras de *Tetragona elongata*. Pontos pretos representam os resíduos de Procrustes e pontos azuis representam a média de cada marco.

Através da Análise de Componente Principal (PCA), que se baseia nos resíduos de Procrustes das coordenadas Cartesianas alinhadas dos 11 marcos anatômicos, foram geradas 18 medidas de deformações relativas ($k = 2n-4$, sendo “k” o número total de deformações relativas e “n” igual ao número de marcos anatômicos). Dentre tais medidas, destacam-se o PC1 (19,7), PC2 (17,9), PC3 (14,3) e PC4 (13,3) como principais eixos de maior variação dentro da amostra (Figura 11).

Figura 11: Porcentagem da variação encontrada nas 18 medidas de deformações relativas dos Componentes Principais, obtidas pela escolha de 11 marcos anatômicos nas junções das nervuras das asas de *Tetragona elongata*.

Através do gráfico de dispersão, com os eixos que mais contribuíram para variação nas Análises de Componente Principal (Figura 12) e Componente Principal ANOVA (Figura 13), é possível observar uma grande sobreposição dos grupos, evidenciado pela elipse que mostra uma média da variação, com exceção de alguns indivíduos oriundos de Conceição de Aparecida MG e também de ninhos do Campus da USP RP, que se distanciaram em relação aos demais, com a maior variação no eixo horizontal (PC1), à medida que temos uma maior dispersão ao longo do eixo horizontal, com os indivíduos oriundos de C. de Aparecida MG (verde) localizando-se à esquerda no gráfico, enquanto os indivíduos do Campus USP (amarelo), localizam-se ao lado direito no gráfico.

Figura 12: Representação gráfica da disposição relativa das populações de abelhas da espécie *Tetragona elongata*, obtida a partir da análise dos Componentes Principais dos 11 marcos anatômicos pontuados nas junções das nervuras das asas. PC1 (19,7%), PC2 (17,9%).

Enquanto a Análise de Componente Principal indica uma distribuição dos dados no morfoespaço, desconsiderando sua origem, a Análise de Variáveis Canônicas (CVA) tende a agrupar os indivíduos de um mesmo conjunto dando ênfase nas diferenças e similaridades entre as amostras com base no classificador utilizado, nesse caso, a origem das amostras. Para CVA, a partir da matriz de covariância para as 17 localidades, foram encontradas algumas configurações nítidas que evidenciam a separação das populações, relativas a uma estimativa compartilhada e pressupondo a mesma matriz de covariância (Figura 14).

Figura 13: Porcentagem da variação encontrada nas 18 medidas de deformações relativas dos Componentes Principais (ANOVA), obtidas pela escolha de 11 marcos anatômicos nas junções das nervuras das asas de *Tetragona elongata*.

Figura 14: Representação gráfica da disposição relativa das populações de abelhas da espécie *Tetragona elongata* (elipses indicam a média), obtida a partir da Análise das Variáveis Canônicas dos 11 marcos anatômicos pontuados nas junções das nervuras das asas. CV1 (25,3%), CV2 (20,5%).

Assim, buscando facilitar o entendimento dessa separação pela análise de CVA, os grupos foram dispostos na representação gráfica conforme seus Estados de origem (São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Espírito Santo e Mato Grosso), explorando combinações entre as variações de CV1 x CV2 (Figura 15) e CV1 x CV4 (Figura 16, Figura 17, Figura 18 e Figura 19), o que tornou mais evidente os agrupamentos.

Figura 15: Representação gráfica da disposição relativa das populações de abelhas da espécie *Tetragona elongata* (elipses indicam a média), obtida a partir da Análise das Variáveis Canônicas dos 11 marcos anatômicos pontuados nas junções das nervuras das asas. Ênfase ao Estado Mato Grosso. CV1 (25,3%), CV2 (20,5%).

Figura 16: Representação gráfica da disposição relativa das populações de abelhas da espécie *Tetragona elongata* (elipses indicam a média), obtida a partir da Análise das Variáveis Canônicas dos 11 marcos anatômicos pontuados nas junções das nervuras das asas. Ênfase ao Estado Paraná. CV1 (25,3%), CV4 (9,8%).

Figura 17: Representação gráfica da disposição relativa das populações de abelhas da espécie *Tetragona elongata* (elipses indicam a média), obtida a partir da Análise das Variáveis Canônicas dos 11 marcos anatômicos pontuados nas junções das nervuras das asas. Ênfase ao Estado São Paulo. CV1 (25,3%), CV4 (9,8%).

Figura 18: Representação gráfica da disposição relativa das populações de abelhas da espécie *Tetragona elongata* (elipses indicam a média), obtida a partir da Análise das Variáveis Canônicas dos 11 marcos anatômicos pontuados nas junções das nervuras das asas. Ênfase ao Estado Minas Gerais. CV1 (25,3%), CV4 (9,8%).

Figura 19: Representação gráfica da disposição relativa das populações de abelhas da espécie *Tetragona elongata* (elipses indicam a média), obtida a partir da Análise das Variáveis Canônicas dos 11 marcos anatômicos pontuados nas junções das nervuras das asas. Ênfase ao Estado Espírito Santo. CV1 (25,3%), CV4 (9,8%).

Quando observamos o gráfico de dispersão referente ao eixo canônico horizontal CV1, verificamos que foi o mais informativo para separação de alguns grupos, destacando os Estados do Mato Grosso, Paraná e Espírito Santo.

As distâncias de Procrustes variaram com magnitude menor (Tabela 2) assim como nas distâncias quadradas de Mahalanobis.

	São Paulo	Minas Gerais	Mato Grosso	Paraná	Espírito Santo
São Paulo		0,0081	0,0178	0,0131	0,0202
Minas Gerais	2,127		0,0166	0,0114	0,0157
Mato Grosso	5,2061	4,9287		0,0217	0,0219
Paraná	3,4402	3,11	5,8266		0,0215
Espírito Santo	5,4905	4,7186	6,5252	5,2286	

Tabela 2: Distâncias quadradas de Mahalanobis (metade inferior da tabela) e distâncias de Procrustes (metade superior da tabela) entre as amostras de *Tetragona elongata* comparadas por Estados, obtidas através das Análises de Variáveis Canônicas. Todos os valores encontrados para distâncias quadradas de Mahalanobis e distâncias de Procrustes foram significantes.

Já as Análises de Função Discriminante (DFA) classificaram corretamente a maioria dos indivíduos, com destaque para dois grupos principais, Mato Grosso e Espírito Santo (Tabela 3). Ao compararmos os valores obtidos para as distâncias de Mahalanobis e as distâncias de Procrustes geradas pela DFA, com os valores gerados pela CVA para as mesmas distâncias, observamos pequena variação entre eles. No entanto, apesar de existir essa variação, em ambas análises (DFA e CVA) preservou-se a mesma proporção na variação de ambos grupos, com exceção dos já citados Estados (MT e ES), com valores maiores em DFA (Tabela 3).

	São Paulo	Minas Gerais	Mato Grosso	Paraná	Espírito Santo
São Paulo		0,00814611	0,01775335	0,01309531	0,02015359
Minas Gerais	2,3039		0,01662529	0,01141688	0,01574205
Mato Grosso	5,5045	6,245		0,02170639	0,02194162
Paraná	3,5326	4,4875	7,5689		0,02150283
Espírito Santo	6,4663	5,5996	17,3799	11,9106	

Tabela 3: Distâncias quadradas de Mahalanobis (metade inferior da tabela) e distâncias de Procrustes (metade superior da tabela) entre as amostras de *Tetragona elongata* comparadas por Estados, obtidas através das Análises de Função Discriminante. Todos os valores encontrados para distâncias quadradas de Mahalanobis e distâncias de Procrustes foram significantes.

:

A seguir são mostrados os gráficos de discriminação par a par das amostras agrupadas por Estados pela Análise da Função Discriminante.

Figura 20: Discriminação par a par dos grupos de *Tetragona elongata* estudados pela análise de Função Discriminante mostrando a identificação dos Estados Espírito Santo e Paraná.

Figura 21: Discriminação par a par dos grupos de *Tetragona elongata* estudados pela análise de Função Discriminante mostrando a identificação dos Estados Mato Grosso e São Paulo.

Figura 22: Discriminação par a par dos grupos de *Tetragona elongata* estudados pela análise de Função Discriminante mostrando a identificação dos Estados Minas Gerais e Paraná.

Figura 23: Discriminação par a par dos grupos de *Tetragona elongata* estudados pela análise de Função Discriminante mostrando a identificação dos Estados Paraná e São Paulo.

Figura 24: Discriminação par a par dos grupos de *Tetragona elongata* estudados pela análise de Função Discriminante mostrando a identificação dos Estados Minas Gerais e Mato Grosso.

4.2. Análise molecular das abelhas

Foram analisadas 33 sequências para *Tetragona elongata* de uma região do gene *Cit B*, compreendida entre os *primers* mtD26 (F) e mtD28 (R) (Simon e cols., 1994). Depois da edição, obtivemos fragmentos de 486 pares de bases, onde sete haplótipos foram detectados (Tabela 4). A composição nucleotídica foi de A+T= 77,57%, C+G= 17,90%, evidenciando grande riqueza de bases A e T, como esperado para o genoma mitocondrial de insetos (Crozier e Crozier, 1993; Simon e cols., 1994).

Em relação à diversidade genética, os valores encontrados para a diversidade haplotípica interpopulacional (Hd: 0,4891) e para a diversidade nucleotídica ($\pi = 0,01$) foram relativamente baixos.

Os 7 haplótipos encontrados correspondem a 10 sítios variáveis. H1 foi o haplótipo mais frequente entre as populações, estando presente em 25 das amostras. Contudo, os outros são exclusivos: H2 em Chapada dos Guimarães MT, H3 em Cuiabá MT, H4 em Franca SP, H5 em duas amostras de Luís Antônio SP, H6 em Sapopema PR e Várzea da Palma MG e H7 em outra amostra de Várzea da Palma MG.

As inter-relações haplotípicas estão mais claramente representadas na rede de haplótipos gerada a partir de todas as sequências encontradas para *CitB* (Figura 25).

Haplótipos	61	65	148	271	410	415
H1	A	C	T	T	T	A
H2	.	.	C	C	A	.
H3	.	.	C	.	C	.
H4	.	T	.	.	.	.
H5	.	.	.	.	.	T
H6	T	T	.	.	.	.
H7	.	.	C	.	.	.

Tabela 4: Haplótipos e seus respectivos sítios variáveis. Números verticais correspondem à posição em pares de base dos sítios polimórficos dentro do fragmento do gene *CitB* de *Tetragona elongata*.

Figura 25: Rede de haplótipos para o gene *CitB* da Espécie *Tetragona elongata*. O tamanho das esferas representa o número de indivíduos e as linhas entre as esferas representam os sítios polimórficos com um passo mutacional cada.

A distância (d) foi calculada usando o modelo HKY entre as sequências dos 7 haplótipos de *Tetragona elongata* e as sequências para o gene *CitB* das espécies utilizadas como grupo externo (Tabela 5). A partir dos valores de d foi construído um dendrograma (Figura 26), onde podemos observar o agrupamento de todos os haplótipos de *Tetragona elongata*, separado das outras espécies.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7
H1		3	2	1	1	2	1
H2	0.02459		1	4	4	5	2
H3	0.01381	0.01778		3	3	4	1
H4	0.00787	0.02959	0.02310		2	1	2
H5	0.00331	0.02981	0.01728	0.01243		3	2
H6	0.00912	0.02997	0.02468	0.00436	0.01247		3
H7	0.01205	0.01401	0.00736	0.01364	0.01606	0.01610	

Tabela 5: Estimativa da divergência relativa entre as sequências, baseada no modelo *Maximum Composite Likelihood* (metade inferior da tabela) e número de passos mutacionais (metade superior da tabela), calculada entre os pares de haplótipos encontrados nas populações de *Tetragona elongata*.

Figura 26: Dendrograma de proximidade genética entre os haplótipos encontrados nas amostras de *Tetragona elongata* e outras espécies da tribo Meliponini usadas como grupo externo. As análises foram feitas segundo a metodologia de *Neighbor Joining* a partir da distância de HKY.

4.3. Cultivo e isolamento do fungo

Obtivemos êxito no isolamento de seis linhagens de *Zygosaccharomyces* com crescimento inicial em meio de cultivo sólido (Figura 27). No laboratório, o fungo cresceu primeiramente na forma tradicional das leveduras e apresentou uma textura gelatinosa (Figura 28 A) ainda sem as chamadas pseudohifas, que apareceram mais tarde (Figura 28 B, C e D).

Figura 27: Culturas de leveduras *Zygosaccharomyces* sp. isoladas dos ninhos de *Tetragona elongata* e replicadas em meio de cultivo sólido nas placas de Petri. © Fotos por Gabriela Toninato de Paula.

Figura 28. Macrofotografias dos estágios de desenvolvimento da levedura *Zygosaccharomyces* sp. cultivada em meio sólido visualizada pela lupa. A) Início do crescimento com aspecto gelatinoso. B), C) e D) Estágio de produção das pseudohifas e formação do pseudomicélio.

Através do uso de corante vermelho do Nilo, capaz de mostrar estruturas lipídicas, foi confirmado o acúmulo de gordura no interior das células do fungo nos dois estágios de desenvolvimento, com e sem pseudohifas (Figura 29).

Figura 29. Microfotografias confocais da levedura *Zygosaccharomyces* sp., extraída e isolada dos ninhos de *Tetragona elongata*, marcadas com corante vermelho do Nilo, evidenciando a presença das organelas com acúmulo de lipídeos.

4.4. Análise molecular do fungo

Foram analisadas 6 sequências para a região 26S do gene ribossomal de *Zygosaccharomyces sp.* Depois da edição, obtivemos fragmentos de 503 pares de bases e a composição nucleotídica foi de A+T= 62,1%, C+G= 37,90%. Em todo o alinhamento das sequências obtidas através da amplificação da porção 26S do gene ribossomal não foram encontradas variações na sequência das bases entre as linhagens de *Zygosaccharomyces sp.*, isolados de *Tetragona elongata*, e por isso confirmamos a ausência de haplótipos nessa amostragem populacional.

Em relação à diversidade genética das linhagens amostradas de *Zygosaccharomyces sp.* juntamente com a análise do grupo externo, os valores encontrados para a diversidade haplotípica interpopulacional (Hd) foi 0,08, e quando comparada apenas à linhagem isolada de *S. aff depilis*, Hd=0,03.

A estimativa da divergência relativa entre elas e o grupo externo são mostradas na tabela 5 e no dendrograma (Figura 25).

Os sítios da subunidade 26S do gene ribossomal das linhagens de *Zygosaccharomyces sp.* isoladas da população amostrada de *Tetragona elongata*, comparados com sua variação nas linhagens de *Zygosaccharomyces* do grupo externo são mostrados na tabela 6.

																					1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
	1	2	2	2	3	3	3	5	5	6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	9	2	2	2	2	3	3	3	3	3	4	4	5	5	5	5	5	5	2	2
	7	1	3	9	1	3	5	0	8	4	7	8	0	1	3	4	5	6	7	8	4	3	7	8	9	0	1	6	7	9	4	6	1	2	3	9	4	5	
Z. sp (Tetragona elongata)	A	T	A	T	A	A	T	T	A	T	G	T	G	A	T	T	T	T	A	C	A	A	T	A	A	A	T	C	A	T	G	A	T	A	G	T	T		
Z. sp (S. depilis)	.	.	.	.	G	.	.	A	.	G	A	C	.	G	C	.	C	C	G	T	.	G	.	G	G	.	G	C	.	G	.	.	.	.	G	A	.	.	
Z. rouxii	G	C	T	C	G	G	C	G	G	G	A	C	.	G	C	C	.	.	G	.	C	G	C	G	.	G	G	C	.	G	.	.	.	C	G	.	C	A	
Z. gambellarensis	G	C	T	.	G	G	C	G	G	G	A	.	A	G	.	C	.	.	.	.	C	G	.	G	.	G	G	C	T	.	.	A	G	C	.	.	C	A	
Z. machadoi	G	C	T	C	G	G	C	G	G	G	A	C	A	G	.	C	.	.	.	.	C	G	.	G	.	G	G	C	T	G	A	A	G	C	G	.	C	A	
	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	5	5	5	6	6	6	6	6	7	8	9	0	0	0	0	1	1	2	2	2	2	3	3	4	5	5	6	6	6	6	7	7	7	8	8	8	8	8	8
	4	5	6	1	5	6	8	9	9	3	5	6	7	8	9	1	6	0	2	3	5	3	4	9	7	8	0	4	5	7	0	2	3	0	2	4	5	7	
Z. sp (Tetragona elongata)	T	A	T	T	A	A	A	A	A	T	A	A	A	C	A	T	A	A	T	T	A	A	G	G	T	A	T	G	A	T	T	T	C	A	T	G	T	A	
Z. sp (S. depilis)	C	G	C	.	G	G	G	G	G	C	G	G	G	T	.	C	.	.	.	.	.	G	.	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	G	.	A	C	G	
Z. rouxii	C	G	C	C	G	G	G	G	G	C	G	G	G	.	G	C	T	T	.	C	G	G	.	.	.	G	.	.	C	C	G	G	G	G	C	.	C	G	
Z. gambellarensis	.	.	C	.	G	G	G	.	G	C	G	G	G	.	G	C	T	T	C	.	G	G	A	T	.	G	.	.	C	C	G	G	G	G	C	.	C	G	
Z. machadoi	.	G	C	.	G	G	G	.	G	C	G	G	G	.	G	C	T	.	.	C	G	G	.	T	.	G	.	.	C	C	G	G	G	G	C	.	C	G	

Tabela 6: Sítios da subunidade 26S do gene ribossomal das linhagens de *Zygosaccharomyces sp.* isoladas da população amostrada de *Tetragona elongata*, que não variaram, comparados com sua variação nas linhagens de *Zygosaccharomyces* do grupo externo. A numeração das colunas identifica a posição em ordem crescente nos pares de bases da sequência onde ocorreram as mutações.

A distância (d) foi calculada usando o modelo HKY+G entre as sequências do único haplótipo encontrado em *Zygosaccharomyces sp.* isolado de *Tetragona elongata* e as sequências para a subunidade 26S do gene ribossomal das espécies utilizadas como grupo externo (Tabela 7). A partir dos valores de d foi construído um dendrograma (Figura 30), onde podemos observar o agrupamento do haplótipo do fungo isolado de *Tetragona elongata* separado das outras espécies do mesmo gênero.

	<i>Z. sp.</i> Viçosa	<i>Z. sp.</i> Luís Antônio	<i>Z. sp.</i> Indaiatuba	<i>Z. sp.</i> Ribeirão Preto	<i>Z.</i> <i>rouxii</i>	<i>Z.</i> <i>gambellarensis</i>	<i>Z.</i> <i>machadoi</i>
<i>Z. sp. Viçosa</i>							
<i>Z. sp. Luís Antônio</i>	0,0000						
<i>Z. sp. Indaiatuba</i>	0,0000	0,0000					
<i>Z. sp. Ribeirão Preto</i>	0,0000	0,0000	0,0000				
<i>Z. sp (S.aff. depilis)</i>	0,0997	0,0997	0,0997	0,0997			
<i>Z. rouxii</i>	0,1551	0,1551	0,1547	0,1551	0,0920		
<i>Z. gambellarensis</i>	0,1369	0,1369	0,1365	0,1369	0,1156	0,0507	
<i>Z. machadoi</i>	0,1492	0,1492	0,1488	0,1492	0,1044	0,0370	0,0210

Tabela 7: Estimativa da divergência relativa entre as sequências, baseada no modelo HKY + G, calculada entre os pares de haplótipos encontrados nas populações de *Zygosaccharomyces* isolados de *Tetragona elongata* e das espécies do grupo externo.

Figura 30: Dendrograma de proximidade genética entre os haplótipos encontrados nas amostras de *Zygosaccharomyces* associado à *Tetragona elongata* e de outras espécies do mesmo gênero. As análises foram feitas segundo a metodologia de *Neighbor Joining* a partir da distância de HKY+G.

5. DISCUSSÃO

As investigações feitas pelos estudos recentes da relação de mutualismo desenvolvida pelas abelhas e outros insetos sociais com diversos micro-organismos, que se instalam em partes variadas da colônia ou no próprio corpo do inseto, tem sido foco de interesse ecológico e principalmente para estudos farmacológicos de aplicação na área médica. Isso devido ao fato de que tais organismos desenvolveram, ao longo de milhões de anos, essa inter-relação que os protege contra ataques de outros micro-organismos patogênicos no ambiente em que vivem.

Pode-se destacar, por exemplo, a cifomicina, um composto extraído de certa actinobactéria do gênero *Streptomyces* relacionada à formiga *Cyphomyrmex sp.*, cujo efeito contra alguns fungos patógenos de humanos teve alto desempenho em testes *in vitro* e *in vivo* (Chevrette e cols., 2019).

As formigas cortadeiras da tribo Attini são outro exemplo já bem explorado que demonstra a quais níveis se estabelecem essas interações de dependência dos insetos com certos micro-organismos, uma vez que elas cultivam ativamente o próprio fungo, seu único alimento, por isso também sendo chamadas de formigas agricultoras.

Nas abelhas indígenas, ou meliponíneos, também ocorre uma interação mutualística com certos fungos do gênero *Zygosaccharomyces* que foi recentemente elucidada, porém, ainda não compreendida totalmente. Dentro do ninho, as abelhas estocam uma grande quantidade de alimento como mel e pólen, produtos altamente energéticos e que propiciam a proliferação de vários micro-organismos. Inclusive, em parte, as abelhas dependem da ação desses inquilinos para que o alimento trazido das flores e armazenado passe por um processo de fermentação e maturação, uma pré-digestão, com adição de outras substâncias provocada pela ação da microbiota, como alteração de pH, e assim fique pronto para o consumo. Nesse processo, são metabolizados e adicionados compostos resultantes da ação principalmente de leveduras fermentadoras (Menezes e cols., 2013).

Em estudo direcionado ao entendimento desse mecanismo feito por Paludo e cols. (2018), foi constatada não apenas a presença de *Zygosaccharomyces* no interior das células de cria da abelha *Scaptotrigona aff. depilis*, como a existência de mais dois fungos, *Monascus ruber* e *Candida sp.* Nesses testes realizados, um deles usando a técnica do co-cultivo (cultura em conjunto dos micro-organismos previamente isolados), foi mostrado que, entre os três

fungos ali presentes, também ocorrem interações antagônicas, quando a presença ou aumento de um deles aparentemente afeta o desenvolvimento dos demais pela produção de compostos voláteis, entre eles álcool isoamílico e etanol.

Ainda no mesmo estudo, ficou comprovado que a substituição em laboratório do fungo na dieta das abelhas por ergosterol, um esteroide, garante o desenvolvimento normal das larvas, que finalizam seu desenvolvimento adequadamente por completo e chegam ao estágio adulto (Paludo, 2017; Paludo e cols., 2018).

A relevância dessa interação da levedura *Zygosaccharomyces sp.* com as abelhas foi estabelecida primeiramente durante as pesquisas de criação das larvas em laboratório para obtenção de rainhas de *S. aff depilis*, quando ficou confirmado que as larvas das abelhas se alimentam do pseudomicélio, além do alimento larval depositado pelas operárias (Menezes, 2010), fato também observado posteriormente nos ninhos de *Tetragona elongata* (Castro, 2012). Atualmente outras cepas estão sendo isoladas de outras espécies de abelhas sem ferrão (pesquisas em andamento).

Uma característica ainda não desvendada é o processo da dispersão dos fungos entre as colmeias. A possibilidade mais provável é que as operárias os carreguem involuntariamente quando transportam os materiais do ninho mãe para o ninho filho durante a enxameação natural.

Pela incerteza de como os fungos são dispersos, se são transportados pelas próprias abelhas ou se elas se associam a esse gênero de levedura nos ambientes aos quais ocupa, a continuidade da investigação molecular com maior número amostral de regiões geográficas mais distantes poderá dar indícios mais precisos dessa dinâmica populacional.

Com o uso da subunidade 26S do gene ribossomal encontramos um alto grau de conservação desse gene nas amostras de *Zygosaccharomyces* isoladas de *Tetragona elongata* quando comparadas pelo alinhamento das sequências, considerando a grande distância geográfica entre os ninhos, onde não foi constatada a presença de mais de um haplótipo. Em contraste, a maior distância ou divergência genética ficou evidente em comparação com o mesmo marcador do grupo externo da linhagem isolada de *S. aff depilis* ($d=0,09$). (Tabela 5, Figura 30).

Esse distanciamento filogenético das linhagens dos fungos entre as espécies de abelhas e a sua variação genética baixa ou inexistente dentro da população de cada espécie nos sugere que exista uma forte especificidade dessas leveduras para cada espécie de abelha, o que

corroborar a relação da simbiose já que, aparentemente, os fungos estão relacionados intimamente com cada espécie de abelha e sua dispersão deve acompanhar o movimento delas pelo território.

Outro marcador molecular específico para fungos também usado nos estudos recentes são sequências de DNA chamadas ITS (sigla em inglês para Espaçador Interno Transcrito). São regiões não funcionais que intercalam as subunidades ribossômicas no seu precursor transcrito e que são descartadas durante a maturação do rRNA. Elas apresentam uma taxa alta de variação, até mesmo intraespecífica, podendo ser utilizadas para identificação de cepas, além de possuírem um número elevado de cópias (Schoch e cols., 2012).

Nos fungos, as regiões ITS também possuem alta especificidade para certos grupos, como nos basidiomicetos (Gardes & Bruns, 1993) e, diante das vantagens que apresentam em relação ao uso do gene mitocondrial CO1 (observadas por diversos autores em trabalhos com fungos), foi proposto para que sejam utilizadas como marcadores universais desses microrganismos (Dentinger e cols., 2011; Schoch e cols., 2012).

Entretanto, não obtivemos êxito nas tentativas feitas neste estudo para amplificação das regiões ITS 1 e ITS 4 para as leveduras do gênero *Zygosaccharomyces* e por isso optamos em realizar as análises usando 26S como marcador, conforme vários estudos também direcionados à identificação e filogenia dos fungos (Kurtzman, 1998; Ren, 2016; Song, 2016; Raja, 2017).

Durante a busca para aumentar a amostragem populacional das leveduras *Zygosaccharomyces* dos ninhos de *Tetragona elongata*, encontramos certa resistência de alguns criadores de abelhas pela necessidade em abrir as colmeias para a coleta do material, que precisa ser feita diretamente nos discos de cria. Isso porque, para alguns criadores, em alguns casos ainda inexperientes, o manejo dessa abelha representa um desafio devido a certas peculiaridades necessárias para que a colmeia fique estabilizada nas caixas racionais logo após uma multiplicação de ninho ou captura de enxame, sendo comum a perda das colmeias pela infestação de pragas, como os forídeos. Ainda que o comércio e a troca de colmeias entre os meliponicultores sejam frequentes, quando estabilizadas, muitos criadores as mantêm protegidas e com receio do seu manejo. Isso foi um fator que limitou a prospecção de mais amostras do fungo.

Como observado no mapa (Figura 5), *Tetragona elongata* está distribuída por diversas fito fisionomias no território amostrado e, apesar da grande distância dos locais analisados, verificou-se que ocorrem sobreposições dos haplótipos encontrados.

Por exemplo, as amostras analisadas dos ninhos provenientes da região de Luis Antônio, SP, são colmeias originalmente trazidas da região de Foz do Iguaçu, no Paraná, e foram instaladas na Reserva Ecológica de Jataí no decorrer de uma pesquisa. Analisando o dendrograma na figura 26, observamos que elas se agruparam junto às outras amostras do Paraná (Londrina e Ivaí), inclusive duas destas amostras apresentaram o haplótipo exclusivo H5.

As Análises de Variação Canônica e da Função Discriminante dos dados morfométricos foram capazes de separar de forma congruente ao dendrograma da divergência genética das amostras do Estado do Mato Grosso e algumas amostras de Minas Gerais com maior destaque.

Com a análise de caracterização genética realizada a partir de *CitB*, um dos marcadores usados frequentemente para a identificação da diversidade de populações de abelhas sem ferrão, aliada aos dados morfométricos, chegamos a informações importantes e complementares sobre a distribuição espacial da variabilidade genética da espécie *Tetragona elongata*.

A baixa variabilidade nucleotídica observada com presença de haplótipos exclusivos encontrados para o marcador *CitB* também mostra um provável indício de que a espécie possa ter sofrido expansão populacional recente, devido ao acúmulo de poucas mutações entre os haplótipos.

Foi identificado índice alto de haplótipos únicos e número baixo de haplótipos compartilhados, que poderia caracterizar uma forte estruturação populacional. Este cenário corrobora o comportamento filopátrico da rainha, mostrando uma peculiaridade dentro de cada região do território com a presença de um ou poucos haplótipos, geralmente exclusivos. Isso porque, como as fêmeas de meliponíneos são as responsáveis pela colonização de áreas novas (MIRANDA, 2016), sua capacidade de dispersão é limitada a distâncias curtas (NOGUEIRA-NETO, 1997), somando-se ao fato de que o DNA mitocondrial possui herança exclusivamente materna, assim, o compartilhamento dos haplótipos mitocondriais entre populações distantes, ocasionado pela transmissão materna, é menos provável e pode ser explicado por algum contato secundário e/ou retenção de alguma variação ancestral.

6. CONCLUSÃO

Apesar da baixa divergência relativa dos grupos dentro da população de *Tetragona elongata*, o uso do gene mitocondrial CitB possibilitou uma caracterização de haplótipos específicos para algumas regiões geográficas e alguns compartilhados dentro da população entre as localidades amostradas, o que pode ser explicado pelo comércio e fluxo de colmeias entre os criadores, sendo necessário avaliar a informação de outros genes para entender a dinâmica da dispersão.

Entretanto, a morfometria geométrica de asas também foi útil para mostrar uma divisão sutil no padrão de venação das asas dentro da população da abelha para algumas dessas regiões, servindo como ferramenta de identificação de uma subpopulação;

A linhagem de *Zygosaccharomyces* isolada dos ninhos de *Tetragona elongata* também acumula vesículas contendo lipídeos (adipossomos) que são consumidos pelas larvas, corroborando a associação simbiótica e a importância desse gênero de levedura associada às abelhas nas quais já foi encontrada;

- O uso da subunidade 26S do gene ribossomal como marcador não revelou a presença de haplótipos distintos nas amostras de *Zygosaccharomyces sp.* coletadas em regiões geográficas distantes entre si, ao mesmo tempo em que sua localização dentro da árvore genética mostra uma separação entre outras linhagens do gênero *Zygosaccharomyces* do grupo externo, o que indica sua especificidade entre as espécies de abelhas onde sua interação já foi observada;

- Todas as linhagens de *Zygosaccharomyces* isoladas diretamente das células de cria dos ninhos de *Tetragona elongata* não apresentaram variação na distância genética, ou seja, ausência de haplótipos de 26S, sugerindo sua ligação estreita e conservada que pode ser explicada pela transmissão entre os ninhos durante a dispersão da abelha no território;

- O cultivo dessa levedura se mostra viável em meio artificial, tanto em cultura sólida como líquida, o que possibilita seu manejo e uso durante a obtenção artificial de rainhas de *Tetragona elongata*;

- A importância da presença dos fungos na dieta da larva, cujos estudos cada vez mais revelam se tratar de uma relação simbiótica, mostra a importância de se debater e aprofundar os estudos sobre a presença de tais micro-organismos simbiotes na colmeia, já que o uso cada vez mais intenso de pesticidas nas lavouras apresenta risco de impacto indireto no

desenvolvimento de várias espécies de abelhas, seja influenciando na viabilidade da criação em apicultura e meliponicultura como nas populações silvestres.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo, E. D. (2010). Aplicações da morfometria geométrica em estudos populacionais e evolutivos de abelhas eussociais. Anais do IX Encontro sobre Abelhas, 2010 Ribeirão Preto - SP, Brasil. p. 230-237.
- Arias, M. C. e cols. (2006) Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. *Apidologie*, v. 37, p. 259–274.
- Avise, J. C. e cols. (1987) Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 18, n. 1, p. 489–522.
- Avise, J. C. (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, v. 36, n. 1, p. 3–15.
- Avise, J. C. (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Baptistella, A. R. T. O. (2009). Produção “*in vitro*” de rainhas e ocorrência natural de machos de *Frieseomelitta varia* (Apidae, Meliponina). Dissertação de Mestrado (Entomologia) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 70 p.
- Batalha-Filho, H. e cols. (2010) Phylogeography and historical demography of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie*, v. 41, n. 5, p. 534–547.
- Beaumont, M. A. (2010). Approximate Bayesian Computation in Evolution and Ecology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 41: 379-406.
- Beheregaray, L. B. (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, v. 17, n. 1, p. 3754–3774.
- Bielejec F, Rambaut A, Suchard MA, Lemey P. (2011). SPREAD: spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. *Bioinformatics*. 27: 2910-2912.
- Bonatti, V. (2017). Filogeografia de *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini), uma abelha sem ferrão do Nordeste Brasileiro. Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Genética. 102 p.
- Bookstein, F. L. (1991) *Morphometric tools for landmark data*. Cambridge - USA: Cambridge University Press. 512 p.

- Bouckaert, R. e cols. (2014) BEAST 2: A software platform for bayesian evolutionary analysis. PLoS Computational Biology, v. 10, n. 4, p. 1–6.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. v. 72. p. 248-254.
- Camargo, J. M. F.; Pedro, S. R. M. (2008). In Moure, J. S.; Urban, D.; Melo, G. A. R. Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region . Versão online disponível em <<http://www.moure.cria.org.br/catalogue?id=12912>>
- Castro, I. (2012). Obtenção artificial de rainhas e estabelecimento de novas colônias de *Tetragona elongata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Entomologia. 99 p.
- Chevrette, M G.; Carlson, C. M.; Ortega, H E.; Thomas, Chris.; Ananiev, G. E.; Barns, K.; Book, A. J.; Cagnazzo, J.; Carlos, C.; Flanigan, W.; Grubbs, K. J.; Horn, H. A.; Hoffmann, F. M.; Klassen, J. L.; Knack, J. J.; Lewin, G. R.; McDonald, B. R.; Muller, L.; Melo, W. G. P.; Pinto-Tomás, A. A.; Schmitz, A.; Wendt-Pienkowski, E.; Wildman, S.; Zhao, M.; Zhang, F.; Bugni, T. S.; Andes, D.R.; Pupo, M. T.; Currie, C. R. 2019. The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. Nature Communications. v. 516, n. 10. 11p.
- Colinvaux, P. A.; Oliveira, P. E.; Bush, M. B. (2000) Amazonian and neotropical plant communities on glacial time-scales: The failure of the aridity and refuge hypotheses. Quaternary Science Reviews, v. 19, p. 141–169.
- Cortopassi-Laurino, M.; Imperatriz-Fonseca, V. L.; Roubik, D. W.; Dollin, A.; Heard, T.; Aguilar, I. B.; Venturieri, G. C.; Eardley, C.; Nogueira-Neto, P. (2006). Global meliponiculture: challenges and opportunities. EDP Sciences. Apidologie n. 37. p. 275-292.
- Crozier, R.H. & Crozier, Y.C. (2003). The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. Genetics. v. 133. n. 1. p. 97-117.
- Darriba, D. e cols. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature methods, v. 9, n. 8, p. 772.
- Drummond, A. J., Rambaut, A., Shapiro, B. & Pybus, O.G. (2005). Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. Molecular Biology and Evolution, v. 22, n.5, p. 1185–1192.

- Duarte, R. S. (2012). Aspectos da biologia destinados à criação de *Tetragona clavipes* (Fabricius, 1804) (Apidae, Meliponini). Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, área Entomologia. 84 p.
- Duarte, R. S. (2017). Produção e atividade antimicrobiana de méis de *Tetragona clavipes*, *Scaptotrigona depilis* e *Tetragonisca angustula* no nordeste do estado de São Paulo. Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências - Área: Entomologia. 73 p.
- Francisco, F. O.; Arias, M. C. (2009) Inferences of evolutionary and ecological events that influenced the population structure of *Plebeia remota*, a stingless bee from Brazil. *Apidologie*, v. 41, n. 2, p. 216–224.
- Francisco, F. O.; Silvestre, D.; Arias, M. C. (2001) Mitochondrial DNA characterization of five species of *Plebeia* (Apidae: Meliponini): RFLP and restriction maps. *Apidologie*, v. 32, n. 4, p. 323–332.
- Francoy, T. M.; Gonçalves, L. S.; Imperatriz-Fonseca V. L. (2008). A Morfometria Geométrica de Asas e a Identificação dos Meliponini. *Anais do VIII Encontro sobre Abelhas, Ribeirão Preto - SP, Brasil*. p. 252-254.
- Francoy, T. M.; Imperatriz-Fonseca, V. L. (2010). A morfometria geométrica de asas e a identificação automática de espécies de abelhas. *Oecologia Australis*. n. 14. p. 317-321. doi:10.4257/oeco.2010.1401.20
- Gardes, M.; Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rust. *Molecular Ecology*. v. 2. p. 113-118.
- Haffer, J. (1969) Speciation in amazonian forest birds. *Science*, v. 165, n. 3889, p. 131–137.
- Hebert, P. D. N. e cols. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 270, n. 1512, p. 313–321.
- Hickerson, M. J. et al. (2010) Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 54, n. 1, p. 291–301.
- Imperatriz-Fonseca, V. L.; Saraiva, A. M.; Gonçalves, L. (2007). A iniciativa brasileira de polinizadores e os avanços para a compreensão do papel dos polinizadores como produtores de serviços ambientais. *Bioscience Journal*. Uberlândia. v. 23. s. 1. p. 100-106.

- James P.M.A., Coltman D.W., Murray B.W., Hamelin R.C., Sperling F.A.H. (2011). Spatial genetic structure of a symbiotic beetle-fungal system: toward multi-taxa integrated landscape genetics. PLoS ONE. v. 6. n. 10. doi:10.1371/journal.pone.0025359
- Kurtzman, C. P.; Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie Van Leeuwenhoek, Amsterdam. v. 73. n. 4. p. 331-371.
- Liu, D.; Coloe, S.; Baird, R.; Pedersen, J. Rapid. (2000). Mini-preparation of fungal DNA for PCR. Journal of Clinical Microbiology. v. 38. n. 1. p. 471.
- Machado, C. A. e cols. (2001) Phylogenetic relationships, historical biogeography and character evolution of fig-pollinating wasps. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 268, n. 1468, p. 685–694.
- Malagodi-Braga, K. S. (2002). Estudo de agentes polinizadores em cultura de morango. Tese apresentada para obtenção de título de Doutor em Ciências, área Ecologia. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Ecologia. São Paulo. 104 p.
- Menezes, C. (2010). A produção de rainhas e a multiplicação de colônias em *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP. 97 p.
- Menezes, C.; Bonetti, A. M.; Amaral, I. M. R.; Kerr, W. E. (2007). Alimentação larval de *Melipona* (Hymenoptera, Apidae): estudo individual das células de cria. Bioscience Journal. Uberlândia. v. 23. s. 1. p. 70-75.
- Menezes, C.; Vollet-Neto, A.; Contrera, F.A.F.L.; Venturieri, G.C.; Imperatriz-Fonseca, V.L. (2013). The role of useful microorganisms to stingless bees and stingless beekeeping. In: Pot-Honey - a legacy of stingless bees. Springer New York. p. 153-171. doi:10.1007/978-1-4614-4960-7_10.
- Michener, C. D. (2007). The bees of the world. Baltimore, The Johns Hopkins University Press. ed. 2. 953 p.
- Miranda, E. A. e cols. (2016) Phylogeography of *Partamona rustica* (Hymenoptera, Apidae), an endemic stingless bee from the neotropical dry forest diagonal. PLoS ONE, v. 11, n. 10, p. 1–19.
- Miranda, E. A. (2016) História natural, biogeografia e a genética de populações de *Partamona rustica*, uma abelha endêmica de florestas secas do Brasil. [Tese] Universidade Federal de São Carlos.

- Moraes, D. A. (2003) A morfometria geométrica e sua "revolução na morfometria": localizando e visualizando mudanças na forma dos organismos. *Bioletim*, v. Ano III, n. 3.
- Moreau, C. S. (2006) Phylogeny of the Ants: Diversification in the Age of Angiosperms. *Science*, v. 312, n. 5770, p. 101–104.
- Moritz, C.; Dowling, T. E.; Brown, W. M. (1987) Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 18, n. 1, p. 269–292.
- Moritz, C. et al. (2000) Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 31, n. 1, p. 533–563.
- Murray, T. E. e cols. (2007) Cryptic species diversity in a widespread bumble bee complex revealed using mitochondrial DNA RFLPs. *Conservation Genetics*, v. 9, n. 3, p. 653–666.
- Neves, E. L.; Viana, B. F. (2002) As abelhas eussociais (Hymenoptera, Apidae) visitantes florais em um ecossistema de dunas continentais no médio Rio São Francisco, Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 46, n. 4, p. 571–578.
- Nogueira-Neto, P. (1997). Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Nogueirapis. 446 p.
- Paludo, C. R.; Menezes, C.; Silva-Junior, E. A., Vollet-Neto, A.; Andrade-Dominguez, A.; Pishchany, G.; Khadempour, L.; Nascimento F. S.; Currie, C. R.; Kolter, R.; Clardy, J.; Pupo, M. T. (2018). Stingless Bee Larvae Require Fungal Steroid to Pupate. *Scientific Reports* 8:1122. DOI:10.1038/s41598-018-19583-9
- Paludo, C. R. (2017). Estudo químico e biológico de micro-organismos associados à abelha sem ferrão *Scaptotrigona depilis*. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo campus Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutor em Ciências.
- Paxton, R. J. (2000) Genetic structure of colonies and a male aggregation in the stingless bee *Scaptotrigona postica*, as revealed by microsatellite analysis. *Insectes Sociaux*, v. 47, n. 1, p. 63–69.
- Pedro, S. R. M. (2014). The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* 61(4). p. 348-354. DOI: 10.13102/sociobiology.v61i4.348-354
- Prato, M. (2011). Ocorrência natural de sexuais, produção *in vitro* de rainhas e multiplicação de colônias em *Tetragonisca augustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Dissertação de Mestrado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. 114 p.

- Raja, H.A.; Miller, A. N.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H. (2017) Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*. v. 80. n. 3. p. 756–770.
- Rambaut, A. e cols. (2014) Tracer. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>>
- Ren, R.; Sun, Y.; Zhao, Y.; Geiser, D. Ma, H.; Zhou, X. (2016). Phylogenetic Resolution of Deep Eukaryotic and Fungal Relationships Using Highly Conserved Low-Copy Nuclear Genes. *Genome Biol Evol*. v. 8. n. 9. p. 2683–2701.
- Rodrigues, L. A.; Santos, V. F. (2003) Morfometria geométrica - aplicações em paleobiologia de Dinossáurios. *Ciências da Terra, UNL, Lisboa - Portugal*. p. 141-145.
- Rohlf, F. J.; Slice, D. (1990) Extensions of the Procrustes Method for the Optimal Superimposition of Landmarks. *Systematic Zoology*, v. 39. n. 1. p.40-59.
- Rohlf, F. J. (1999) Shape statistics: Procrustes superimpositions and tangent spaces. *Journal of Classification*, v. 16, p. 197-223.
- Rohlf, J. F.; Marcus, L. F. (1993) A revolution morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 8, n. 4, p. 129-132.
- Rull, V. (2011) Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 26, n. 10, p. 508–513.
- Rull, V. (2013) Some problems in the study of the origin of neotropical biodiversity using palaeoecological and molecular phylogenetic evidence. *Systematics and Biodiversity*, v. 11, n. 4, p. 415–423.
- Santos, A. L. (2007). Identificação da flora microbiana em colmeias de Meliponina. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética e Bioquímica, área Genética. Universidade Federal de Uberlândia. 46 p.
- Schoch, C.L.; Seifert, K.A.; Huhndorf, S.; Robert, V.; Spouge, J.L.; Levesque, C.A.; Chen, W. Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS*. v. 109. n. 16. p. 6241-6246. doi:10.1073/pnas.1117018109.
- Sharma, A. D.; Singh, J. (2005). A nonenzymatic method to isolate genomic DNA from bacteria and actinomycete. *Analytical biochemistry*. v. 337. n. 2. p. 354-356.
- Silva-Neto, C.M.; Ribeiro, A. C. C.; Prado, M. A. P. F.; Gonçalves, B. B.; Lima, F. G.; Silva, J. P.; Nascimento, A. R. (2016). Nas asas da identificação: uso de morfometria da asa em espécies de *Melipona*. *Em Comunicações, Interciência*. v. 41, n. 9. p. 605-609.
- Silveira, F. A.; Melo, G. A. R.; Almeida, E. A. B. (2002). Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. Fundação Araucária. Belo Horizonte. 253 p.

- Simons, C. e cols. (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 87, p. 651–701.
- Slaa, E. J.; Sánchez-Chaves, L. A.; Malagodi-Braga, K.S.; Hofstede, F. E. (2006). Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *EDP Sciences Apidologie* n. 37. p. 293-315.
- Song, J.; Chen, J.;Min Wang, M., Chen, Y.; Cui, B. K. (2016). Phylogeny and biogeography of the remarkable genus *Bondarzewia* (Basidiomycota, Russulales). *Scientific Reports* v. 6 n. 34568.
- Turchetto-Zolet, A. C. et al. (2013) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, v. 22, n. 5, p. 1193–1213.
- Vamosi, J. C.; e cols. (2006). Pollination decays in biodiversity hotspots. *PNAS* v. 103. n. 4. p. 956–961.
- Villemant, C; Simbolotti, G.; Kenis, M. (2007). Discrimination of *Eubazus* (Hymenoptera, Braconidae) sibling species using geometric morphometrics analysis of wing venation. *Systematic Entomology*. v.32, n.4, p. 625–634.
- Waugh, J. (2007) DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays*, v. 29, n. 2, p. 188–197.
- Werneck, F. P. et al. (2011) Revisiting the historical distribution of Seasonally Dry Tropical Forests: new insights based on paleodistribution modelling and palynological evidence. *Global Ecology and Biogeography*, v. 20, n. 2, p. 272–288.
- Whiting, P. W. (1943) Multiple alleles in sex determination of *Habrobracon*. *Genetics*, v. 28, p. 365–382.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (Innis, MA; Gelfand, DH; Sninsky, JJ; White, TJ). Academic Press, New York. p. 315-322.
- Winston, P.W.; Bates, D.H. (1960). Saturated solutions for the control of humidity in biological research. *Ecology*. v. 41. p. 232-237.
- Zayed, A. (2009) Bee genetics and conservation. *Apidologie*, v. 40, n. 3, p. 237–262.

Anexo I

Fonte dos mapas usados no trabalho:

VEGETAÇÃO: Carta Topográfica IBGE - VEGETAÇÃO DO TERRITÓRIO BRASILEIRO - ESCALA 1:250000 - ACESSO E DOWNLOAD NO DIA 28/04/2019

DESCRIÇÃO: O Mapa de Vegetação do Brasil reconstitui a situação da vegetação no território brasileiro e tem origem nas cartas-imagens de radar produzidas pelo Projeto RADAMBRASIL na escala 1:250.000 e foi obtido do IBGE – 1992.

LINK: http://www.dpi.inpe.br/Ambdata/mapa_sipam.php

HIPSOMETRIA: Mosaico gerado a partir de 136 Modelo Digitais de Terreno disponibilizados pela Base de Dados Topodata em resolução de 30x30m. Acesso e Download no dia 26,27 e 28/04.

DESCRIÇÃO: O projeto Topodata oferece o Modelo Digital de Elevação (MDE) e suas derivações locais básicas em cobertura nacional, ora elaborados a partir dos dados SRTM disponibilizados pelo USGS na rede mundial de computadores.

LINK: <http://www.dsr.inpe.br/topodata/acesso.php>