Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Vanessa Bonatti

Caracterização genético-morfológica de populações de *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) no nordeste brasileiro.

Ribeirão Preto – SP

2012

Vanessa Bonatti

Caracterização genético-morfológica de populações de *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) no nordeste brasileiro.

Dissertação apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Genética
Orientador: Tiago Maurício Francoy

Ribeirão Preto – SP
2012

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.

Bonatti, Vanessa
Caracterização genético-morfológica de populações de *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) no nordeste brasileiro. Ribeirão Preto, 2012.
96 p. : il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.
Orientador: Francoy, Tiago Maurício.

1. Abelhas sem ferrão. 2. *Melipona subnitida*. 3. Conservação. 4. Morfometria geométrica. 5. DNA mitocondrial.

Vanessa Bonatti

Caracterização genético-morfológica de populações de *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) no nordeste brasileiro.

Dissertação apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Genética

Aprovada em _____,_____,_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Aos meus pais, Isaias Roberto Bonatti e Maria Cristina Martinez Bonatti, meus maiores exemplos na vida e minha fonte eterna de inspiração...

... Dedico.

Agradecimentos

❤ Ao Prof. Dr. Tiago Maurício Francoy, meu orientador, pela amizade, paciência, dedicação e confiança depositada na realização desse trabalho;

❤ À Profª. Drª. Zilá Luz Paulino Simões e à Profª Drª Márcia Bitondi, meus agradecimentos especiais pela atenção e por abrirem as portas de seu laboratório e me recepcionarem com tanto carinho;

❤ Ao Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares pela amizade, atenção e pelo excelente trabalho na coordenação do Departamento de Genética;

❤ A todo o pessoal do Bloco A do departamento de Genética da USP de Ribeirão Preto pela amizade, ensinamentos e momentos de descontração;

❤ Às meninas da sala Aline, Ana, Camis, Flávia, Lili, Michele e Tathy, pela parceria, pelos momentos de conversas, brincadeiras e risadas que tornaram meus dias mais alegres, em especial a Lívia "parça máster" e Clau por estar presente em quase todos os momentos da minha vida;

❤ À querida amiga Marcela Ap. F. B. Laure, pelas caminhas, risadas e conselhos;

❤ A todos os técnicos e funcionários do Bloco A do Departamento de genética, em especial a Dona Shyrlei por ser nossa "Mãezona";

❤ A todo o pessoal do Apilab por todos os momentos de risada e guloseimas, em especial a Daí e Cly pela amizade e ajuda nos experimentos;

❤ Ao Rodrigo pela paciência e disposição em ensinar e ajudar com a parte de molecular;

❤ Ao Prof. Dr. Fernando de Faria Franco pela disposição em solucionar dúvidas dos programas estatísticos;

❤ Ao pessoal do Laboratório de Genética e Evolução de Abelhas (LGEA) do Departamento de Biologia-USP pela ajuda nos experimentos, em especial à Profª. Drª. Maria Cristina Arias por permitir uma parte de meus experimentos em seu laboratório e ao Flávio Oliveira Francisco pela disposição em ajudar;

❤ A todo o pessoal que de uma forma ou de outra contribuíram para o término desse trabalho através de conversas e conselhos, Amanda, Claudia, Dora, Francis, Gislaine, Juliana, Tais e Vera;

❤ Ao casal mineirinho, Bernardo e Camilla, companheiros de todas as horas, por todos os finais de semana de piscina, almoço e cervejinhas;

❤ Às minhas eternas amigas, Ananza, Amanda, Carol, Fabi, Laís, Nara e Mirela, que embora a distantes estiveram sempre presentes e me apoiaram nos bons e maus momentos, com vocês eu descobri que a amizade verdadeira realmente é para sempre;

❤ À Isa, pessoa muito especial com quem tive o prazer de compartilhar mais alguns desses sete anos de amizade e convívio;

❤ Aos meus queridos amigos de Mogi e Alfenas, pessoas com as quais aprendi muito e que fazem muita falta no meu dia a dia;

❤ Ao Omar, pelo amor, cuidado e compreensão, além do incentivo e ajuda em todos os momentos, tudo seria mais difícil sem essa pessoa imensamente especial ao meu lado;

❤ À minha pequena e ao mesmo tempo tão grande família que me apoiou e me deu suporte para chegar até aqui, em especial à minha avó, que com seu carinho e orações, sempre me incentivou a seguir;

❤ Aos meus pais, que com tanto amor, confiança e esforços permitiram que mais esse sonho fosse realizado;

❤ A Deus, que me guiou nessa longa caminhada e à Maria, minha querida mãezinha, que se mostrou tão presente em todos os momentos;

❤ A todos os pesquisadores e meliponicultores que contribuíram com o envio das amostras;

❤ Ao Departamento de Genética da FMRP/USP pela disponibilização de seus recursos;

❤ Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado e a Capes pelo apoio financeiro.

A todos vocês, meu muito obrigada!

Paciência

Composição: Lenine e Dudu Falcão

"Mesmo quando tudo pede um pouco mais de calma
Até quando o corpo pede um pouco mais de alma
A vida não pára!
Enquanto o tempo acelera e pede pressa
Eu me recuso faço hora vou na valsa
A vida é tão rara!
Enquanto todo mundo espera a cura pro mal
E a loucura finge que isso tudo é normal
Eu finjo ter paciência
O mundo vai girando cada vez mais veloz
A gente espera do mundo e o mundo espera de nós
Um pouco mais de paciência!
Será que é tempo que lhe falta para perceber?
Será que temos esse tempo para perder?
E quem quer saber?
A vida é tão rara!
Tão rara!
Mesmo quando tudo pede um pouco mais de calma
Mesmo quando o corpo pede um pouco mais de alma
Eu sei...
A vida não pára!
A vida não pára!
Será que é tempo que lhe falta para perceber?
Será que temos esse tempo para perder?
E quem quer saber?
A vida é tão rara...
Tão rara!
Mesmo quando tudo pede um pouco mais de calma
Até quando o corpo pede um pouco mais de alma
Eu sei...
A vida não pára!
A vida não pára!"

RESUMO

VANESSA, B. **Caracterização genético-morfológica de populações de *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) no nordeste brasileiro.** 2012. Dissertação - Faculdade de Medicina, Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, Riberão Preto.

A abelha *Melipona subnitida*, popularmente conhecida como jandaíra, é uma espécie endêmica do nordeste brasileiro, que possui distribuição em uma ampla gama de ambientes bastante diversificados pertencentes, principalmente ao bioma Caatinga. Estas abelhas apresentam grande importância para as populações locais por serem uma das espécies mais viáveis para criação, uma vez que se adaptam melhor às condições adversas do meio e são bastante promissoras quando multiplicadas, apresentando grande potencialidade para produção de mel e pólen, além de sua importância ecológica como polinizador. No entanto, essas abelhas encontram-se atualmente ameaçadas devido, em grande parte, à destruição de seu habitat e de seus ninhos naturais para coleta do mel. Apesar de sua relevância, estudos populacionais de espécies de meliponíneos ainda são muito escassos, assim como a urgência em se compreender a estrutura e a dinâmica de suas populações para o monitoramento e conservação de espécies. Neste contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade de *M. subnitida* em diferentes localidades do nordeste brasileiro através da morfometria geométrica das asas anteriores e sequenciamento de um fragmento do gene mitocondrial *COI*. Foram coletadas operárias de 95 colônias de Areia Branca – RN, Barreirinhas – MA, Parnaíba – PI, Fortaleza – CE, Jandaíra – RN e Mossoró – RN. Para análise do padrão de venação da asa foram utilizadas aproximadamente 10 operárias por colônia, sendo marcados 11 marcos anatômicos em cada asa. Os resultados demonstraram estruturação dos grupos com separação estatisticamente significativa ($\alpha<0,0001$) exceto entre Areia Branca e Jandaíra. O teste de validação cruzada identificou corretamente 88,89% dos indivíduos dentro de suas respectivas áreas. As análises moleculares identificaram 11 haplótipos e presença de alto número de haplótipos exclusivos. A diversidade nucleotídica (π) de 0,00543e uma diversidade haplotípica (Hd) de 0,79. Tanto as distâncias morfológicas, como os resultados moleculares indicam que a variabilidade entre as populações amostradas está relacionada tanto ao ambiente em que as amostras foram coletadas como com a distância geográfica entre tais localidades, indicando a existência de ecótipos localmente adaptados.

Palavras-chave: Abelhas sem ferrão, *Melipona subnitida*, conservação, morfometria geométrica, DNA mitocondrial.

ABSTRACT

VANESSA, B**. Genetic-morphological variability of *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) in populatinos in northeastern Brazil.** 2012. Dissertação - Faculdade de Medicina, Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, Riberão Preto.

The *Melipona subnitida* bee, popularly known as jandaíra, is an endemic species to northeastern Brazil, with a wide geographical distribution. These bees are extremely important for local people, since they are adapted to the adverse environmental conditions, are very promising when multiplied, and present good potential for honey and pollen production, allied to their ecological importance as pollinators. However, these bees are currently largely threatened due to the destruction of their habitat and their natural nests for honey collection. Despite its relevance, population studies of stingless bee species are still very scarce, as well as the urgency in understanding the structure and dynamics of their populations for monitoring and species conservation. In this context, this study aimed to evaluate the variability of *M. subinitida* in different localities in northeastern Brazil through geometric morphometrics of the forewing and sequencing of *COI* mitochondrial gene fragment. We collected workers from 95 colonies from Areia Branca – RN, Barreirinhas – MA, Parnaíba – PI, Fortaleza – CE, Jandaíra – RN and Mossoró – RN. To analyze the pattern of wing venation, we used approximately 10 workers per colony, and 11 landmarks were plotted on each wing. The results showed groups structures with separation statistically significant ($\alpha<0,0001$) except between Areia Branca and Jandaíra. The cross-validation test correctly identified 88,89% of individuals within their respective areas. Molecular analysis identified 11 haplotypes and presence of high number of exclusive haplotypes among the populations. The nucleotide diversity (π) of 0,00543 and haplotype diversity (Hd) of 0,79. Both morphological distances and molecular results indicated that variability among the sampled populations is related both to the environment in which samples were collected as to the geographical distance between these locations, indicating the existence of locally adapted ecotypes.

Keywords: Stingless bees, *Melipona subnitida,* conservation, geometric morphometrics, mitochondrial DNA.

SUMÁRIO

1. Introdução 15

2. Objetivos 31

2.1. Objetivo geral 31

2.2. Objetivo específico 31

3. Material e Métodos 33

3.1. Material biológico 33

3.2. Características da área amostrada 35

3.3. Análises morfométricas 36

3.4. Análise molecular 39

4. Resultados e Discussão 45

4.1. Morfometria geométrica 45

4.2. Resultados moleculares 62

5. Considerações finais 81

Referências Bibliográficas 85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotos de *Melipona subnitida*. A) Entrada característia do ninho. B) Discos de favos de cria. C) Operária. D) Rainha fisogástrica cercada por operárias.....23

Figura 2. Mapa do genoma mitocondrial de *A. mellifera*. A posição dos primers utilizados para amplificação do gene *Citocromo Oxidase I* estão representados pelas setas que indicam seu sentido de elongação. 26

Figura 3. Padronização e alinhamento das asas de *Drosophila sp* a partir dos marcos anatômicos (Klingenberg, 2002). 28

Figura 4. Mapa geográfico do nordeste brasileiro. A) Identificação das localidades amostradas, os números entre parênteses informam a quantidade de ninhos coletados. B) Tabela com a distância reta entre os pares de cidades em quilômetros (km).....34

Figura 5. Mapa da classificação climática de Köppen para o Brasil (www.guianet.com.br/brasil/mapaclima.htm). 36

Figura 6. Asa anterior direita de *M. subnitida* com os 11 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras utilizados na análise morfométrica.....37

Figura 7. Ciclos de reação para gene mitocondrial amplificação dos *COI.*.....40

Figura 8. Resíduos de Procrustes dos 11 marcos anatômicos marcados nas junções das nervuras das asas de operárias. Pontos pretos representam os resíduos de Procrustes e pontos azuis representam a média. 45

Figura 9. Representação gráfica da porcentagem da variância das 18 medidas de deformações relativas dos Componentes Principais.....46

Figura 10. Representação gráfica da Análise de Componente Principal das populações de abelhas das cidades de Areia Branca – RN, Barreirinhas – MA, Parnaíba – PI, Fortaleza – CE, Jandaíra – RN e Mossoró – RN, obtida a partir das análises dos 11 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas.....47

Figura 11. Modificação da forma média em direção a forma correspondente em CV1. A) Mudança de forma com a deformação de grade (*Thin-plate spline*). Cada linha começa na forma consenso, representado pelo ponto, o comprimento e a direção da reta indicam o movimento da forma inicial para a correspondente modificação. B) Modificação da forma mostrada a partir do esboço da estrutura biológica. Forma média em azul claro, forma correspondente a variação no primeiro eixo de variáveis canônicas em azul escuro. Os marcos anatômicos estão representados pelos pontos numerados. 49

Figura 12. Modificação da forma média em direção a forma correspondente em CV2. A) Mudança de forma com a deformação de grade (*Thin-plate spline).* Cada linha começa na forma

consenso, representado pelo ponto, o comprimento e a direção da reta indicam o movimento da forma inicial para a correspondente modificação. B) Modificação da forma mostrada a partir do esboço da estrutura biológica. Forma média em azul claro, forma correspondente a variação no segundo eixo de variáveis canônicas em azul escuro. Os marcos anatômicos estão representados pelos pontos numerados. 50

Figura 13. Dendograma de proximidade morfológica pelo método de *Neighbor Joining* entre as populações de *M. subnitida*. r = coeficiente de correlação cofenética. 52

Figura 14. Representação gráfica da disposição relativa das populações de abelhas das cidades de Areia Branca – RN, Barreirinhas – MA, Parnaíba – PI, Fortaleza – CE, Jandaíra – RN e Mossoró – RN, obtida a partir das análises de variáveis canônicas dos 11 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas.....54

Figura 15. Representação gráfica da análise de variáveis canônicas comparando as populações de *M. subnitida* de Areia Branca – RN, Barreirinhas – MA, Parnaíba – PI, Fortaleza – CE, Jandaíra – RN e Mossoró – RN com amostras de *M. fasciculata, M. fuliginosa, M. rufiventris, M. scutelaris* e *M. seminigra pernigra.* 56

Figura 16. Dendograma de proximidade morfológica pelo método de *Neighbor Joining* entre as populações de *Melipona subnitida* (Areia Branca – RN, Barreirinhas – MA, Parnaíba – PI, Fortaleza – CE, Jandaíra – RN e Mossoró – RN) e as espécies utilizadas como grupo externo (*M. fasciculata, M. fuliginosa, M. rufiventris, M. scutelaris* e *M. seminigra pernigra)*. r = coeficiente de correlação cofenética. 57

Figura 17. Discriminação par a par dos grupos estudados pela Análise de Função Discriminante e pela Validação Cruzada dos dados. 61

Figura 18. Alinhamento entre sequência nucleotídicas de *M. subnitida* e *M. bicolor* (NCBI). As diferenças estão destacadas em cinza e pela ausência de traço. 63

Figura 19. Representação esquemática da frequência de distribuição por localidade dos haplótipos nas populações de *M. subnitida* amostradas.....66

Figura 20. Rede de haplótipos para o gene *COI* da espécie *M. subnitida*. O tamanho das esferas representa o número de indivíduos e os pontos entre as esferas representam os sítios polimórficos. 67

Figura 21. Dendograma de proximidade genética pelo método de *Neighbor Joining* entre as populações de *M. subnitida* e as espécies utilizadas como grupo externo. Número entre parênteses = número de indivíduo; r = coeficiente de correlação cofenética. 69

Figura 22. Alinhamento par a par comparando sequências de aminoácidos de *M. subnitida* com *M. mandacaia, M. quadrifasciata* e *M. bicolor*. Em destaque aminoácidos que diferem entre as sequências. Asterisco = mesma identidade; dois pontos = substituições conservadas; um ponto = substituições semiconservativas; espaço = substituições não conservadas.....71

Figura 23. Dendograma de proximidade genética entre as populações de *M. subnitida* e as outras espécies de *Melipona* utilizadas neste trabalho. As análises foram realizadas segundo a metodologia de *Neighbor Joining* a partir da distância de K2P. r = coeficiente de correlação cofenética. 74

Figura 24. Representação gráfica das diferenças par a par das sequências (*Mismatch Distribution*) do gene mitocondrial *COI.* A) Gráfico para uma única população de *M. subnitida.* B) Gráfico sem a população de Jandaíra. 77

Figura 25. Identificação do mesmo padrão entre as técnicas. A) Mapa identificando as localidades amostradas. B) Rede de haplótipos. C) Gráfico de dispersão das análises morfométrica a partir do CVA rotacionado.....83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais unidades de vegetação e tipos de comunidades das Caatingas modificada por Prado (2003) a partir de Andrade-Lima (1981).....19

Tabela 2. Contribuição relativa de cada marco anatômico.....46

Tabela 3. Variação dos cinco eixos das Variáveis Canônicas.....48

Tabela 4. Distâncias quadradas de Mahalanobis (metade inferior da tabela) e distâncias de Procrustes (metade superior da tabela) entre as populações estudadas obtidas através das Análises de variáveis Canônicas. 51

Tabela 5. Distâncias quadradas de Mahalanobis obtidas através das Análises de Variáveis Canônicas comparando as populações de *M. subnitida* com grupo externos. M.fasc = *M. fasciculata*, M.ful = *M. fuliginosa*, M.ruf =*M. rufiventris*, M.scut = *M. scutelaris*, M.sem = *M. Seminigra.* 53

Tabela 6. Distâncias quadradas de Mahalanobis (metade inferior da tabela) e significâncias estatísticas (metade superior da tabela) entre as populações estudadas obtidas através das Análises de Função Discriminante.....58

Tabela 7. Diversidade genética das populações de *M. subnitida* para os haplótipos do gene mitocondrial *COI.* (N) número de indivíduos; (S) número de sítios polimórficos; (h) número de haplótipos; (Hd) diversidade haplotípica; (π) diversidade nucleotídica; (k) número médio de diferenças. 64

Tabela 8. Haplótipos e seus respectivos sítios variáveis. Números verticais correspondem à posição em pb dos sítios polimórficos dentro do fragmento do gene *COI*.....65

Tabela 9. Frequência de distribuição (%) dos haplótipos nas populações de *M. subnitida* amostradas. 65

Tabela 10. Percentual de divergência nucleotídica, baseada no modelo K2P (metade inferior da tabela) e número de passos mutacionais (metade superior da tabela), calculada entre os pares de haplótipos e entre esses e as espécies utilizadas como grupo externo. Mq = *M. quadrifasciata,* Mm = *M. mandacaia*, Mb = *M. bicolor*. 72

Tabela 11. Valores de *Fst* calculados (metade inferior da tabela) e significâncias estatísticas (metade superior da tabela) entre os pares das populações de *M. subnitida* estudadas.....75

Tabela 12. Análise hierárquica de Variância Molecular (AMOVA) baseada nas sequências nucleotídicas de *COI* em *M. subnitida.* 76

Tabela 13. Teste de neutralidade e *Mismatch distribution*, aplicados às sequências nucleotídicas de *COI.* A) Todas as populações pertencentes a um único grupo. B) Grupo formado por todas as populações exceto Jandaíra. θ1 = tamanho populacional antes da expansão; θ2 = tamanho populacional após a expansão; τ = tempo deste o evento de expansão populacional em unidades de tempo evolutivo; SSD = teste do desvio da soma dos quadrados (*Sum of squared deviation*). 77

Introdução

1. Introdução

Abelhas são um dos mais importantes e especializados grupos de insetos polinizadores (Danforth, Sipes *et al.*, 2006) e realizam indispensável serviço nos ecossistemas terrestres (Buchmann e Nabhan, 1996; Klein, Vaissiere *et al.*, 2007), sendo responsáveis pela manutenção de ecossistemas e também por aumentar a produção de muitas plantações comerciais (Klein, Vaissiere *et al.*, 2007). Assim, quando polinizadores selvagens não se encontram em quantidade suficiente para polinizar grandes campos de agricultura intensiva ou simplesmente não visitam as monoculturas, o uso de abelhas domesticadas é uma solução econômica e conveniente para os fazendeiros (Klein, Vaissiere *et al.*, 2007).

De acordo com Aizen e Harder (2009), com o grande crescimento no consumo mundial de alimentos houve um aumento da necessidade de polinizadores que estejam comercialmente disponíveis para utilização. Entretanto, ao mesmo tempo, vem ocorrendo uma grande redução na diversidade desses polinizadores selvagens que frequentam os campos agrícolas, incluindo as abelhas nativas, devido à destruição dos habitats naturais pela expansão das áreas destinadas às plantações (Kearns, Inouye *et al.*, 1998; Biesmeijer, Roberts *et al.*, 2006).

Comparando-se ainda, as taxas de crescimento do número de colônias de *Apis mellifera* com a demanda de polinizadores em ecossistemas agrícolas nos últimos anos, uma grande discrepância pode ser observada, principalmente pelo fato de a maioria das colônias ser destinada à produção de mel e não à polinização (Aizen e Harder, 2009). A situação se agrava ainda mais com o recente desaparecimento das abelhas nos Estados Unidos e Europa que tem alarmado os produtores, ambientalistas e pesquisadores. O sumiço repentino recebeu o nome de *Colony Collapse Disorder* (Desordem do Colapso das Colônias) e é caracterizado pelo abandono inexplicável das colmeias por parte das operárias, deixando para trás alimentos, cria e até mesmo a rainha. Por conta da ausência de vestígios, como abelhas mortas nas colônias ou em suas proximidades, as causas dessa enorme perda de enxames ainda permanecem desconhecidas (Cox-Foster, Conlan *et al.*, 2007). Desta forma, hoje em dia, apesar de muitas plantações ainda contarem com os serviços de *A. mellifera*, a importância das abelhas nativas está sendo cada vêz mais reconhecida (Stout e Morales, 2009).

Por garantir a reprodução sexual de muitas plantações e da maioria das plantas selvagens, o desaparecimento desses indispensáveis polinizadores pode levar a uma subsequente perda de outras espécies, que direta ou indiretamente conta com eles (Biesmeijer, Roberts *et al.*, 2006), e seus impactos podem ainda se alastrar através das comunidades humanas (Allen-Wardell, Bernhardt *et al.*, 1998). No entanto, as consequências do declínio de abelhas, assim como outros polinizadores, ainda são muito pouco documentadas nos agroecossitemas e principalmente nas áreas selvagens (Allen-Wardell, Bernhardt *et al.*, 1998).

A diminuição de polinizadores vem sendo notada em muitas partes do mundo e está relacionada principalmente à expansão das atividades humanas (Brown e Paxton, 2009). A degradação e destruição de habitats parece ser o principal fator do declínio da biodiversidade (Foley, Defries *et al.*, 2005), ao passo que a fragmentação de ecossistemas, causa direta dessa degradação, é responsável por isolar espécies de seus recursos essenciais, como flores e locais de nidificação (Kremen, Williams *et al.*, 2002). Além disso, pode causar o isolamento genético das populações, que reduz a variabilidade e limita o potencial adaptativo das mesmas (Zayed e Packer, 2005). Drásticos impactos também podem ser observados pela introdução de espécies exóticas que interagem de alguma forma com a população de abelhas local, como plantas que não podem ser exploradas eficientemente como um recurso alimentício, animais que competem por recursos bióticos e abióticos ou outras abelhas pela transmissão de patógenos e acasalamentos interespecíficos (Stout e Morales, 2009).

O aquecimento global é outro fator preocupante (Parmesan, Ryrholm *et al.*, 1999), à medida que deverá provocar mudanças na distribuição espacial dos ecossistemas e também na biodiversidade existente nos mesmos, não só pelas mudanças na temperatura e condições meteorológicas, mas também pela perda de áreas costeiras com o aumento do nível do mar (Brown e Paxton, 2009). Além disso, a apifauna ainda vem sofrendo com uso inapropriado de pesticidas e outros químicos usados na agricultura convencional (Kearns, Inouye *et al.*, 1998). Outra preocupação é a de que, por razões genéticas, as abelhas em geral são mais susceptíveis à extinção que outros grupos por sua determinação do sexo envolver um único loco, tornando elas particularmente sensíveis aos efeitos de populações pequenas pela produção de machos diplóides estéreis (Zayed, 2009).

Melipona Illiger 1806 (Hymenoptera: Apidae) é um gênero de abelhas sem ferrão que ocorre exclusivamente em regiões neotropicais (Michener, 2000). Devido ao seu grande potencial de polinização, essas abelhas são consideradas agentes vitais para a conservação da fauna e flora sul americana (Fernandes-Salomão, Muro-Abad *et al.*, 2002). Apesar dos negativos efeitos causados pela redução da diversidade genética sobre a viabilidade das populações de abelhas, hoje sabemos que é possível a criação de abelhas sem ferrão mesmo com número reduzido de colônias. Populações geneticamente empobrecidas iniciadas com pequeno número de colônias podem ter sucesso reprodutivo e serem mantidas por muitas gerações em condições de manejo intenso e altas taxas de reprodução, desde que essas colônias estejam em ótimas condições fisiológicas, ambientais e alimentares (Nogueira-Neto, 1997). Apesar de ser possível estabelecer uma população a partir de um número reduzido e esta possuir consequências menos graves do que se suspeitava anteriormente para a meliponicultura – criação racional de abelhas sem ferrão, essa prática pode requerer maiores gastos do que a compra esporádica de novos ninhos para manter a variabilidade suficiente de alelos sexuais, já que as abelhas que sofreram gargalo populacional podem apresentar baixa produtividade, sendo necessário o uso de várias práticas de intervenções para manterem as colônias vivas (Alves, Imperatriz-Fonseca *et al.*, 2010).

Um dos maiores problemas enfrentados hoje, em diversos estudos com abelhas selvagens, é a falta de dados consistentes sobre a distribuição e abundância de espécies (Brown e Paxton, 2009), desconhecimento de grande parte de sua fauna (Eardley, Gikungu *et al.*, 2009), além do impedimento taxonômico (Silveira, Pinheiro-Machado *et al.*, 2006). Infelizmente, o estado atual da taxonomia desses polinizadores limita seriamente a capacidade de avaliar e monitorar seu declínio e, consequentemente, o desenvolvimento de estratégias de conservação e manejo sustentável. Essa deficiência ocorre porque os taxonomistas de abelhas, que são poucos, se dedicam normalmente a trabalhos mais complexos do que a simples identificação de espécies e as poucas chaves disponíveis para classificação são de extrema complexidade para pesquisadores não sistematas (Silveira, Pinheiro-Machado *et al.*, 2006).

A região Neotropical, com uma fauna de abelhas extremamente rica (Moure, Urban *et al.*, 2007), enfrenta sérios problemas na conservação de suas espécies nativas. Estima-se que apenas um terço de toda sua diversidade seja conhecido devido à existência de uma série de

deficiências, como o fato de as informações sobre riqueza, diversidade, distribuição e impactos de atividades humanas estarem espalhadas em teses e dissertações não publicadas, carência de informações precisas sobre os nomes válidos, sinônimos, homônimos, *nomina nuda,* além da existência de regiões com coletas deficientes ou inexistentes (Freitas, Imperatriz-Fonseca *et al.*, 2009).

Apesar do número de pesquisas com abelhas ter aumentado desde a década de 60, elas se restringem principalmente as regiões Sul e Sudeste, havendo grande defasagem de estudos para a maioria dos biomas brasileiros (Zanella, 2000). Um dos ecossistemas mais negligenciados é a Caatinga, e isso se deve provavelmente a falsos mitos criados sobre sua biodiversidade, de que é formada por uma vegetação homogênea e pobre em espécies e endemismo, sendo assim de baixa prioridade para conservação (Castelletti, Santos *et al.*, 2003). No entanto, estudos recentes mostraram que isto está longe de ser verdade, demonstrando a importância da Caatinga para a conservação da biodiversidade brasileira (Mma, 2002; Leal, Tabarelli *et al.*, 2003), uma vez que abriga um importante patrimônio biológico que presta serviços essenciais à espécie humana (Tabarelli e Silva, 2003).

O nome “Caatinga” é de origem Tupi-Guarani e significa “floresta branca”, referindo-se ao aspecto da vegetação na estação seca, quando as folhas caem (Prado, 2003). É o único bioma com distribuição totalmente restrita ao Brasil, sua cobertura vegetal ocupa uma área de 800.000 km^2, aproximadamente 10% de todo o território brasileiro, ocorre quase que exclusivamente na região Nordeste, cobrindo a maior parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e a parte nordeste de Minas Gerais, no vale do Jequitinhonha. É limitada a leste e a oeste pelas florestas Atlântica e Amazônica, respectivamente, e ao sul pelo Cerrado (Leal, Da Silva *et al.*, 2005), sendo a quarta maior formação vegetacional do Brasil, após Amazônia, o Cerrado, e a Mata Atlântica (Machado e Lopes, 2003).

Esse ecossistema possui características específicas, o que o torna único no mundo. O solo é sílico argiloso, seco, raso quase sem húmus, pedregoso, contendo regular teor de cálcio e potássio (Fernandes e Medeiros, 2009). Possui um clima semi-árido e árido, caracterizado por baixa pluviosidade, distribuída irregularmente no espaço e no tempo, onde é comum a ocorrência de anos secos e secas severas (Andrade-Lima, 1981). Sua vegetação xerófita é do

tipo floresta decidual, formada essencialmente por árvores e arbustos espinhosos em associação com plantas suculentas, cactos e bromélias (Kuhlmann, 1977), compreendendo um domínio fitogeográfico bem definido (a província das Caatingas) (Prado, 2003), que se apresenta de modo bastante diversificado devido às variações de altitude, qualidade do solo e precipitações pluviométricas. São reconhecidas seis unidades, cada uma com um ou vários tipos, totalizando 12 tipologias diferentes (Andrade-Lima, 1981). O conceito de Caatingas de Andrade-Lima não foi basicamente mudado até o presente, sendo adicionada apenas mais um tipo de vegetação (Prado, 2003) (Tabela 1). Tais unidades e tipos não foram mapeados, em função de passarem de um para outro de modo gradual, mas muitos deles tiveram sua área de ocorrência descrita, com maior ou menor precisão (Sampaio e Rodal, 2000).

Tabela 1. Principais unidades de vegetação e tipos de comunidades das Caatingas modificada por Prado (2003) a partir de Andrade-Lima (1981).

Unidade	Tipo de vegetação	Fisionomia e localidade
I - 1	*Tabebuia-Anadenanthera-Myracrodruon-Cavanillesia-Schinopsis*	Floresta de caatinga alta; Norte de Minas Gerais e Centro-sul da Bahia
II -2	*Myracrodruon-Schinopsis-Caesalpinia*	Floresta de caatinga média; maior parte do centro da província
II - 3	*Caesalpinia-Spondias-Commiphora-Aspidosperma*	Floresta de caatinga média; área mais seca que a anterior
II - 4	*Mimosa-Syagrus-Spondias-Cereus*	Floresta de caatinga baixa; Centro-nore da Bahia
III - 5	*Pilosocereus-Poeppigia-Dalbergia-Piptadenia*	Floresta de caatinga baixa; solos arenosos da série do Cipó
II - 6	*Cnidoscolus-Commiphora-Caesalpinia*	Caatinga arbórea aberta; Sudoeste do Ceará e áreas secas médias com solos soltos e ácidos
IV - 7	*Caesalpinia-Aspidosperma-Jatropha*	Caatinga Arbustiva; áreas mais secas do vale do rio São Francisco
IV - 8	*Caesalpinia-Aspidosperma*	Caatinga arbustiva aberta; Cariris Velhos, Paraíba
IV - 9	*Mimosa-Caesalpinia-Aristida*	Caatinga arbustiva aberta (seridó); Rio Grande do Norte e Paraíba
IV - 10	*Aspidosperma-Pilosocereus*	Caatinga arbustiva aberta; Cabaceiras, Paraíba
V - 11	*Calliandra-Pilosocereus*	Caatinga arbustiva aberta; pequenas áreas restritas e espalhadas com solos ricos em cascalhos
VI - 12	*Copernicia-Geoffroea-Licania*	Floresta de caatinga de galeria; vales dos rios do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte
II – 13*	*Auxemma-Mimosa-Luetzelburgia-Thiloa*	Floresta de caatinga média; oeste do Rio Grande do Norte e Ceará central

* novo tipo de vegetação proposto por Prado.

A preservação da Caatinga é extremamente importante ao passo que apresenta inúmeras espécies endêmicas, como é o caso de muitos meliponíneos nativos do Nordeste brasileiro (Martins, 2002). No entanto, sua relevância não se limita à sua elevada biodiversidade e inúmeros endemismos, é também um ecossistema considerado estratégico no contexto das grandes mudanças globais à medida que sua conservação é de grande valor para manutenção dos padrões regionais e globais do clima, da disponibilidade de água potável e de solos agricultáveis (Tabarelli e Silva, 2003), além disso como uma região árida altamente imprevisível e cercada de biomas tropicais mésicos, a Caatinga é uma anomalia climática e funciona como um importante laboratório para estudos de uma fauna e flora que se adaptaram a um regime de chuvas altamente variável e estressante (Leal, Da Silva *et al.*, 2005).

Apesar de toda a sua importância, ainda é a região brasileira menos protegida, com as poucas unidades de conservação cobrindo menos de 2% do seu território (Leal, Tabarelli *et al.*, 2003) e é a região natural brasileira mais alterada pelas atividades humanas (Mma, 2002). Atualmente o bioma tem passado por um extenso processo de alteração e deterioração ambiental provocado pelo uso insustentável dos seus recursos naturais, o que está levando à rápida perda de espécies (muitas vezes únicas), à eliminação de processos ecológicos chaves e à formação de extensos núcleos de desertificação em vários setores da região (Leal, Tabarelli *et al.*, 2003). Fato ainda mais preocupante é que isso esta acontecendo antes mesmo de ser adquirido um bom conhecimento da estrutura das comunidades locais e da diversidade faunística e florística (Martins, 2002).

A abelha *Melipona subnitida,* popularmente conhecida como jandaíra (Figura 1-C), é uma espécie característica dessa região (Zanella, 2000), sua ocorrência se dá nas regiões de baixas altitudes (Marinho, Freitas *et al.*, 2002) dos Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (Camargo e Pedro, 2007). Segundo o censo (2005) sobre a meliponicultura no Brasil, a abelha jandaíra é uma das principais espécies de abelhas sem ferrão criadas na região do Nordeste (Lopes, Silva *et al.*, 2007), possuindo alto valor comercial para a população local pela produção de um mel de excelente qualidade organoléptica (Bruening, 1990), muito apreciado pelas populações nativas, pelo seu sabor diferenciado (meio ácido e de textura fina), além dos efeitos terapêuticos que lhe são atribuídos (Lopes, Silva *et al.*, 2007). O saburá, que é o pólen fermentado e estocado pelas

abelhas, também é muito procurado devido ao seu valor energético (Marinho, Freitas *et al.*, 2002), além de ser fonte potencial de antioxidantes naturais (Silva, Camara *et al.*, 2006). Outros produtos que também são comercializados são a cera, vendida em forma de bolas nas feiras para defumação e impermeabilização (Cortopassi-Laurino e Imperatriz-Fonseca, 2001), e os próprios ninhos que são vendidos nos troncos de árvores ou em caixas racionais, chamados de cortiço (Cámara, Sousa *et al.*, 2004).

A jandaíra é uma abelha dócil, de fácil manejo e multiplicação (Menezes, 2006), sendo também uma das espécies mais viáveis para fins lucrativos por se adaptar melhor às condições adversas do meio e ser mais promissora quando multiplicada (Marinho, Freitas *et al.*, 2002). No entanto, sua principal importância está ligada a conservação ambiental e produção de frutos (Bruening, 1990). Por ser responsável por aproximadamente 50% da polinização da flora silvestre da caatinga (Ferraz, Feijo *et al.*, 2008), é peça chave na preservação da flora do semi-árido, já que algumas plantas só conseguem se reproduzir com a intervenção desse inseto, em razão da co-evolução sofrida ao longo de milhões de anos (Menezes, 2006).

Assim como outras abelhas da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae), que também são conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão, a *M. subnitida* é uma espécie eusocial (Figura 1-D), isto é, vive em colônias constituídas por uma rainha, que é responsável pela postura de ovos e coesão da colônia pela liberação de feromônios; por dezenas de machos, cuja função é a fecundação da rainha e centenas de operárias, as quais desempenham funções de construção e manutenção da colônia, coleta e processamento do alimento, cuidados com a cria e defesa (Nogueira-Neto, 1994). O mecanismo de determinação do sexo nestas abelhas é haplodiplóide, ou seja, ovos não fertilizados (haplóides) dão origem a zangões e ovos fertilizados (diplóides) a fêmeas. Nessas abelhas, há evidências de que existam fatores genético-alimentares envolvidos no processo de determinação de castas (rainhas e operárias) (Kerr e Nielsen, 1966; Jarau, Veen *et al.*, 2010), estas são morfologicamente diferenciadas e participam de uma estrutura social caracterizada pela divisão de trabalho e sobreposição de gerações (Martins, Cortopassi-Laurino *et al.*, 2004).

O ciclo de desenvolvimento da espécie é de seis dias para o ovo, 12 dias para a larva, 24 dias para a pupa, totalizando 42 dias, o dobro do ciclo de *A. mellifera* (Bruening, 1990), sendo a média de vida da operária e zangão em torno de 90 dias, enquanto a rainha vive entre 4 a 5

anos (Menezes, 2006). Nas primeiras horas do nascimento as operárias realizam a limpeza corporal e da célula de cria; nos dias seguintes começam a trabalhar com cera e cerume, sendo que parte delas se desloca para a construção e aprovisionamento dos alvéolos, participando do processo de postura; a partir do 14° dia cuidam da limpeza interna e após o 25° realizam serviços de guardas, receptoras de néctar, desidratadoras de néctar, controle de temperatura da colônia e finalmente saem ao campo para forragear, completando assim seu ciclo de vida (Menezes, 2006). As rainhas virgens nascem em grande número e geralmente são mortas pelas operárias logo após seu nascimento, no entanto, às vezes desenvolvem seu poder de atração dentro da colônia e distendem seu abdome, sendo então cercadas por operárias com as quais interagem e posteriormente realizam seu vôo nupcial. Depois de ser fecundada, retorna à colônia e desenvolve seu abdome, a rainha torna-se fisogástrica e perde sua capacidade de voar (www.ib.usp.br/jandaira). Assim, suas colônias consistem em agregações perenes, não abandonando seus ninhos nem mesmo nos períodos de maior escassez de recursos (Neves e Viana, 2002). Recentemente, foram documentados casos de parasitismo social em *M. scutellaris,* em que rainhas virgens deixaram sua colônia de origem e se infiltraram e assumiram ninhos órfãos localizados nas proximidades (Wenseleers, Alves *et al.*, 2010). Há especulações de que tal fenômeno ocorra em todas as espécies do gênero *Melipona*, no entanto nenhuma evidência ainda foi encontrada em jandaíra.

As células de cria são circulares e agrupadas formando os discos de favos que possuem disposição horizontal (Figura 1-B). Como não existem células reais, tanto as operárias, quanto os zangões e as rainhas emergem de células semelhantes (Barreto e Teixeira, 2006), as quais são construídas a partir de cerume, uma mistura de cera e resina vegetal e todo alimento que será consumido pela larva é colocado nela antes da postura do ovo (Cámara, Sousa *et al.*, 2004). Depois da ovoposição da rainha, a célula é fechada pelas operárias e não são reutilizadas após o nascimento da abelha (Bruening, 1990). Os favos de cria são envoltos por uma camada de cerume que auxilia na termorregulação do ninho. O mel e o pólen são guardados em potes de formato ovóide dispostos em círculos concêntricos ao redor da cria, estando os potes de pólen mais próximo desta (Bruening, 1990). A entrada do ninho é construída em barro com uma estrutura característica formada por estrias que se alargam para fora e um orifício com capacidade para passagem de apenas uma abelha carregada de mel e pólen (Figura 1-A).

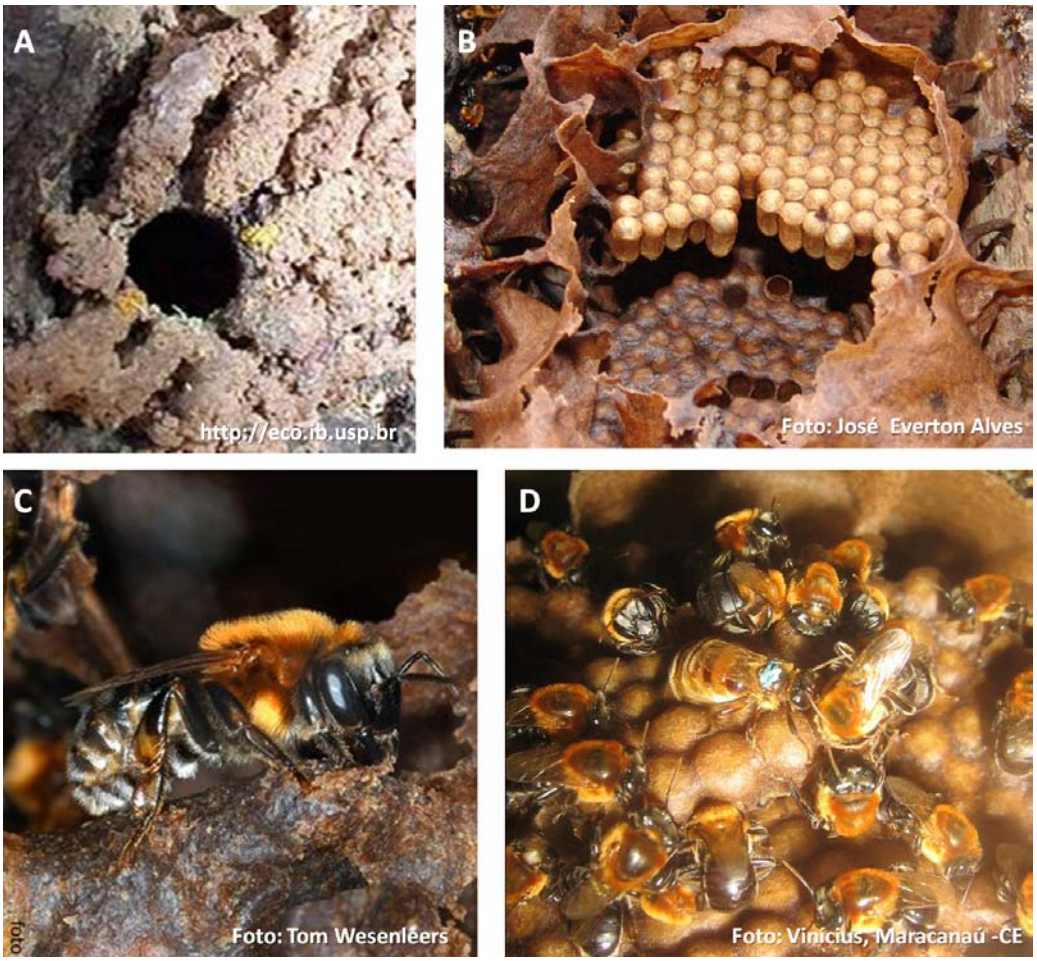


Figura 1. Fotos de *Melipona subnitida*. **A)** Entrada característia do ninho. **B)** Discos de favos de cria. **C)** Operária. **D)** Rainha fisogástrica cercada por operárias.

Quanto ao hábito de nidificação, *M. subnitida* constrói seus ninhos em troncos ocos de árvores vivas, preferindo principalmente a espécie Imburana (*Commiphora leptophloeos)* e depois a Catingueira *(Caesalpinia pyramidalis)* (Martins, Cortopassi-Laurino *et al.*, 2004). Análise da composição do pólen dessas abelhas também revelou preferência por algumas plantas específicas o que sugerem um comportamento restrito de forrageamento mesmo em uma ambiente com uma rica diversidade como o semi-árido nordestino (Silva, Camara *et al.*, 2006). Além disso, a dispersão dos meliponíneos é dificultada pelo fato da colônia filha depender de alimentos e materiais de construção da colônia mãe até o seu estabelecimento completo (Nogueira-Neto, 1954). Tais características unidas ao fato de suas colônias não abandonarem seus ninhos nem mesmo nos períodos de maior escassez de recursos (Neves e

Viana, 2002) tornam essa espécie extremamente sensível ao desmatamento e restringe ainda mais sua dispersão.

No Brasil, outra preocupação é a ação predatória e extrativista dos “meleiros”, pessoas que exploram o comércio do mel de abelhas indígenas, preferindo colhê-lo de ninhos silvestres ao invés de manter essas abelhas em cativeiro devido sua baixa produtividade (Cruz, Freitas *et al.*, 2004) e dessa maneira, destroem não só os ninhos como também as árvores que os abrigam. Por todos esses fatores, a espécie jandaíra que antes era encontrada em toda a região Nordeste, apresenta-se hoje em risco de extinção, já que o extrativismo predatório e o desmatamento têm diminuído consideravelmente o número de colônias silvestres em seu habitat natural (Gonçalves, 1973).

Com a rápida perda da biodiversidade de abelhas sendo uma preocupação global, conhecer e entender a estrutura e a dinâmica de populações, bem como o fluxo gênico que ocorre entre os grupos tem se tornado de grande urgência para o monitoramento e conservação de espécies. Neste contexto, é muito importante o uso de novas metodologias que nos permitam acessar tal variabilidade de outras maneiras que não seja a taxonomia tradicional (Wilson, 2003). Assim, a aplicação de ferramentas moleculares no campo da conservação tem proporcionado informações valiosíssimas sobre os parâmetros fundamentais da população e características relevantes para o manejo da vida selvagem, podendo ser usadas na identificação rápida de espécies, para resolver problemas e conflitos taxonômicos e para identificar populações em declínio (Zayed, 2009).

Desde o final do século passado, o DNA mitocondrial (DNAmt) passou a ser uma promissora alternativa e tem sido empregado nos mais variados tipos de estudos (Avise, Arnold *et al.*, 1987; Moritz, Dowling *et al.*, 1987), se mostrando muito útil em trabalhos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas, aspectos evolutivos e diversidade genética intra e interespecíficas de abelhas (Brito e Arias, 2005; Arias, Brito *et al.*, 2006; Murray, Fitzpatrick *et al.*, 2007; Batalha-Filho, 2008; Francisco, Nunes-Silva *et al.*, 2008; Francisco e Arias, 2009; Assis, 2010; Gonçalves, 2010).

O enorme potencial dessa molécula em tais estudos se deve ao fato dela apresentar características extremamente peculiares e únicas, tais como alta taxa de evolução em relação ao genoma nuclear, não sofrer recombinação, ser circular e pequena, possuir uma estrutura

genética simples com ausência de sequências repetitivas, pseudogenes e íntrons, além de seu conteúdo gênico se apresentar bastante conservado em animais (Moritz, Dowling *et al.*, 1987). Por possuir uma herança materna e sem recombinação, suas mutações normalmente representam a variedade genética (haplótipos) observadas nas populações, que devido ao acelerado ritmo de evolução do DNAmt podem coexistir dentro de uma mesma espécie. Dessa forma, os indivíduos retêm a história matrilínea em suas sequência nucleotídicas, fazendo dessa molécula um importante marcador para o uso científico (Avise, 2009).

O genoma mitocondrial possui de 16 a 20 quilobase (Kb) nos animais (Avise, Arnold *et al.*, 1987), em meliponíneos o tamanho total foi estimado em 18.500 pares de bases (pb) (Francisco, Silvestre *et al.*, 2001). É composto por apenas 37 genes apresentando dois genes para as subunidades ribossômicas (12S e 16S); 22 para os RNA transportadores (RNAt); três para as subunidades da enzima citocromo oxidase (COI, II e III); um para o citocromo B; dois para as subunidades da enzima ATPase (subunidades 6 e 8); e sete para as subunidades da enzima NADH desidrogenase (Figura 2). Nos invertebrados esta molécula também possui uma região de “controle”, não codificadora, rica em adenina e timina, responsável pela origem de replicação e transcrição da molécula do DNAmt (Moritz, Dowling *et al.*, 1987).

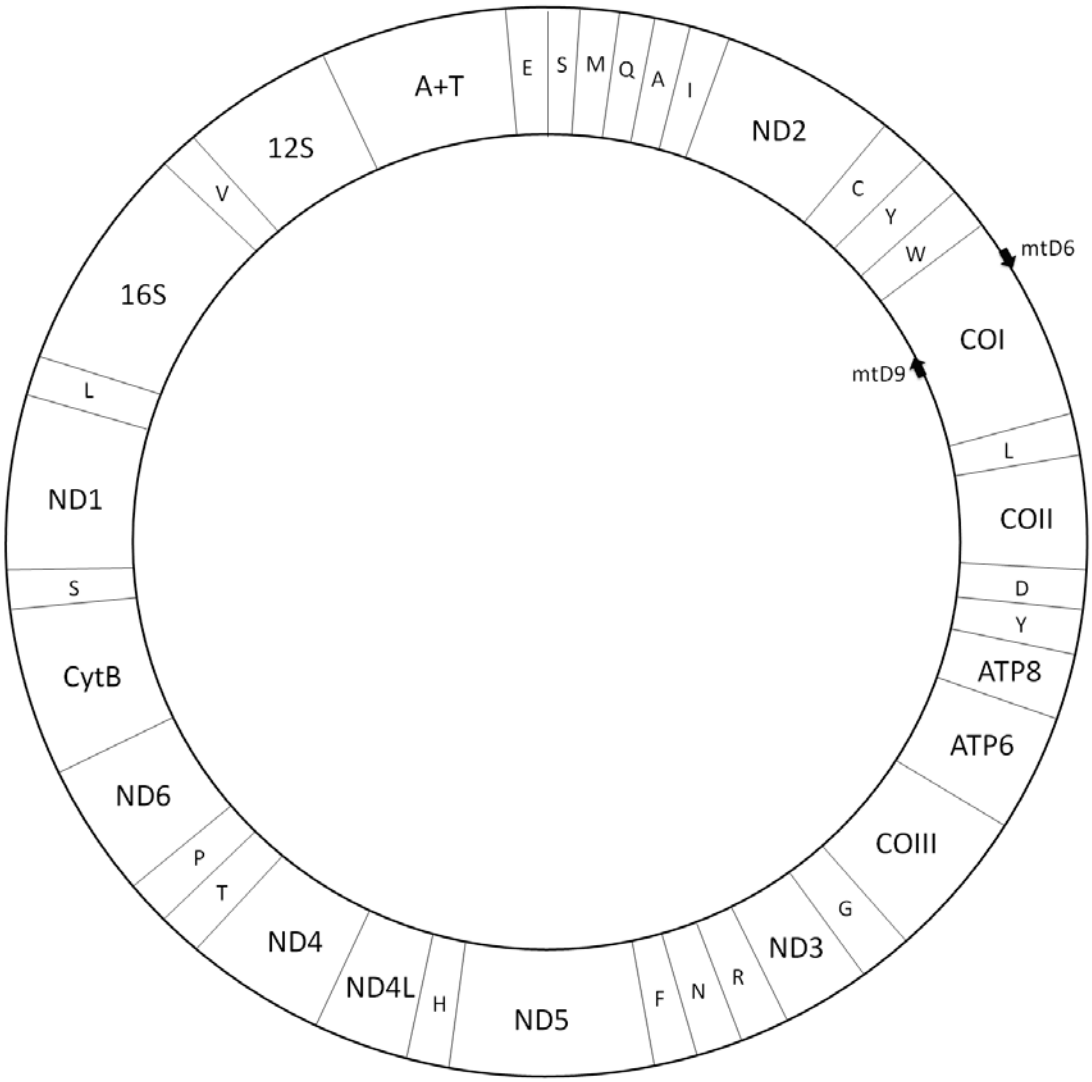


Figura 2. Mapa do genoma mitocondrial de *A. mellifera*. A posição dos primers utilizados para amplificação do gene *Citocromo Oxidase I* estão representados pelas setas que indicam seu sentido de elongação.

Entre as explicações para o DNAmt evoluir de forma mais rápida que o DNA nuclear (DNAn), podemos citar o fato de o interior da mitocôndria ser um ambiente corrosivo rico em compostos de oxigênio aliado a falta de um mecanismo de reparo bastante eficiente, além de suas sequências acumularem mais substituições nucleotídicas já que não codificam proteínas diretamente envolvidas em sua replicação, transcrição e tradução e por não possuir histonas para a estocagem de seu material genético (Avise, 2009). No entanto, dentro da molécula há regiões mais ou menos variáveis, o que nos possibilita a escolha da região mais adequada para o objetivo do nosso estudo (Arias, Brito *et al.*, 2006).

Os 13 genes mitocondriais codificadores de proteínas são as melhores escolhas para trabalhos de filogenia por não possuir inserções/deleções (*indels*) que prejudicam o alinhamento de sequências e também não há o risco de ocorrer uma mudança em sua pauta de leitura (Hebert, Ratnasingham *et al.*, 2003a). Dentre os genes mitocondriais codificadores de proteínas, o *Citocromo Oxidase I* (*COI*) possui a menor taxa de evolução, sendo muito conservado em relação à evolução dos aminoácidos (Simon, Frati *et al.*, 1994). Codifica a subunidade I do citocromo C, uma proteína transmembrana que possui função de receptor terminal de elétrons da cadeia respiratória, catalisando a redução do oxigênio em água e o bombeamento de prótons através das cristas das membranas. Tal proteína é composta por várias subunidades de origem nuclear e apenas três subunidades sintetizadas na própria mitocôndria, conhecidas como subunidades I, II e III. A subunidade I Citocromo C oxidase (COI), é a subunidade catalítica da enzima e encontra-se predominantemente submersa na membrana das cristas mitocondriais. Por ser um componete fundamental da cadeia respiratória é altamente conservado entre espécies que utilizam a fosforilação oxidativa em seu metabolismo. No entanto, mostra variação suficiente para diferenciação entre as espécies a nível nucleotídico (Waugh, 2007), sendo considerado um dos genes relevantes para identificação de espécies pelo chamado código de barras de DNA (Hebert, Ratnasingham *et al.*, 2003a).

A proposta do sequenciamento de uma curta região de aproximadamente 650 pares de bases do início do gene *COI* proporcionou uma nova abordagem do uso da variabilidade de haplótipos e tem mostrado alta divergência entre espécies relacionadas para a maioria dos grupos de animais (Waugh, 2007). A aplicação do código de barras de DNA já provou ser uma poderosa ferramenta para reduzir incertezas taxonômicas (Murray, Fitzpatrick *et al.*, 2007) existindo inclusive uma campanha global para sua utilização em abelhas (www.bee-bol.org).

Outro método também importante na avaliação da biodiversidade de abelhas é o uso Morfometria Geométrica, que se caracteriza por ser uma técnica rápida e de baixo custo na identificação e avaliação da diversidade em populações de abelhas sem ferrão (Francoy e Imperatriz-Fonseca, 2010). Surgiu na década de 90 (Bookstein, 1991) sendo muito útil para detectar pequenas variações morfológicas, imperceptíveis pela morfometria tradicional (Villemant, Simbolotti *et al.*, 2007), pois além de permitir a análise e quantificação da variação,

também possibilita a visualização mais clara das regiões de mudanças na forma e reconstitui de forma gráfica essas diferenças (Bookstein, 1991). Tal metodologia é baseada no uso de marcos anatômicos homólogos (Rohlf e Marcus, 1993), que através de coordenadas cartesianas fornecem as posições relativas de cada ponto (medida de deformação relativa), e deste modo permitem a reconstrução da forma estudada (Rohlf e Marcus, 1993; Moraes, 2003) e a identificação das variações de forma nos diferentes exemplares em estudo (Rohlf, 1998).

A identificação dessa variação é realizada através do alinhamento ideal das imagens, em que a configuração dos marcos anatômicos de cada espécime é redimensionada para um padrão uniforme de tamanho, sobrepostas com bases em seus centróides e rotacionadas de modo que a somatória das distâncias entre os marcos anatômicos homólogos seja a menor possível (Rohlf, 1999). Para cada marco é gerado um resíduo de Procrustes, diferença entre a sua posição e a posição do marco anatômico homólogo do consenso (Rodrigues e Santos, 2003), correspondentes apenas à variação de forma, independentes do tamanho das estruturas, eliminando-se assim a influência ambiental que afeta o desenvolvimento dos organismos (Figura 3). A matriz dos resíduos de Procrustes é utilizada para realização de procedimentos estatísticos (Rohlf e Slice, 1990).

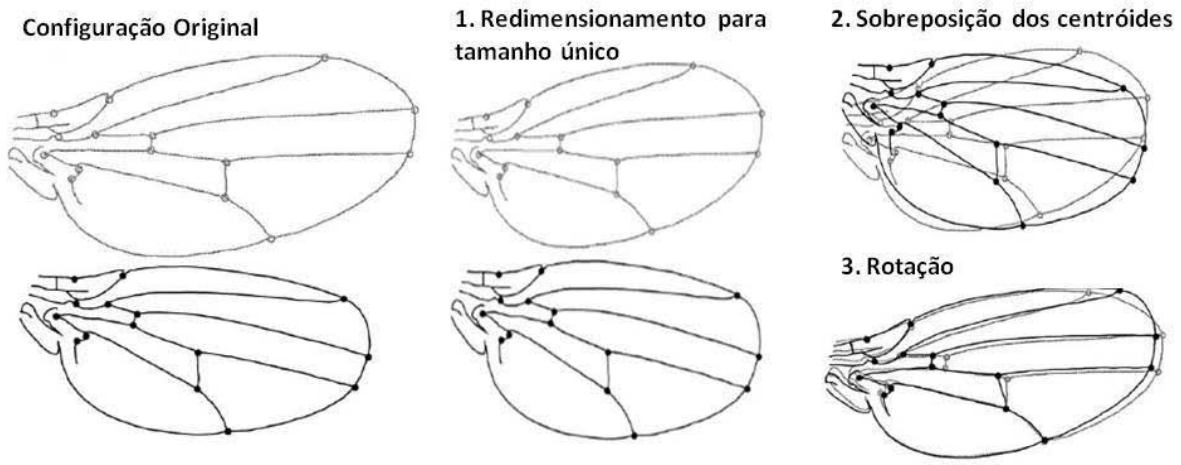


Figura 3. Padronização e alinhamento das asas de *Drosophila sp* a partir dos marcos anatômicos (Klingenberg, 2002).

Trabalhos realizados com tal ferramenta têm sido usados com sucesso na discriminação de espécies de abelhas através das variações dos padrões de venação das asas anteriores para

a identificação tanto de abelhas africanizadas e suas subespécies ancestrais (Francoy, Wittmann *et al.*, 2008), quanto em abelhas sem ferrão para identificação de indivíduos de diferentes populações de *Nannotrigona testaceicornis* (Mendes, Francoy *et al.*, 2007), reconhecimento de espécies crípticas de *Bombus* (Aytekin, Terzo *et al.*, 2007), diferenciação de duas subespécies de *Melipona bicolor* (Francoy *et al*., dados não publicados), ausência de fluxo gênico entre populações de *Plebeia remota* de localidades diferentes (Francisco, Nunes-Silva *et al.*, 2008), além de abrir a possibilidade de rastreamento da origem geográfica das abelhas (Francoy, Grassi *et al.*, 2011) e rotas de colonização e expansão de territórios ocupados pelas espécies (Bischoff, Schröder *et al.*, 2009).

A existência de uma apifauna restrita a área de Caatinga, com grande potencial de polinização, produção de mel e pólen, e relevante papel no desenvolvimento do uso sustentável desse ecossistema (Martins, 2002), somado ao atual quadro de devastação dessa vegetação, nos desperta a necessidade urgente de estudar e conhecer suas particularidades e potencialidades, além de preservar as poucas áreas remanescentes de sua cobertura original (Zanella e Martins, 2003). Tendo como base a importância de uma fauna e flora endêmica adaptada as condições xerófitas da Caatinga, seu conhecimento, apesar de ainda incipiente, será extremamente importante para o manejo de ambientes em processo de desertificação, cada vez mais comuns nas paisagens do planeta (Zanella e Martins, 2003).

Estudos de conservação envolvendo abelhas nativas brasileiras ainda são bastante recentes e se restringem a apenas alguns grupos. Hoje, poucos estudos populacionais têm sido realizados para as espécies de Meliponini, principalmente aplicando uma combinação de dados de polimorfismo de DNAmt e análise morfométrica de asas (Francisco, Nunes-Silva *et al.*, 2008; Gonçalves, 2010). Considerando a grande heterogeneidade ambiental encontrada na Caatinga e a ocorrência de *M. subnitida* nas diferentes tipologias encontradas nesse bioma, a caracterização da variabilidade genética entre os grupos nos esclarecerá se as populações encontram-se isoladas e estão se diferenciando devido às pressões seletivas diferentes do meio ou se a espécie possui grande plasticidade fenotípica para sobreviver às condições tão singulares.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve por objetivo caracterizar e mapear a variabilidade populacional das abelhas *M. subnitida* em algumas localidades dentro de sua área de ocorrência, com o intuito de gerar dados que possam auxiliar na sua conservação, manejo e uso sustentável.

2.2. Objetivo específico

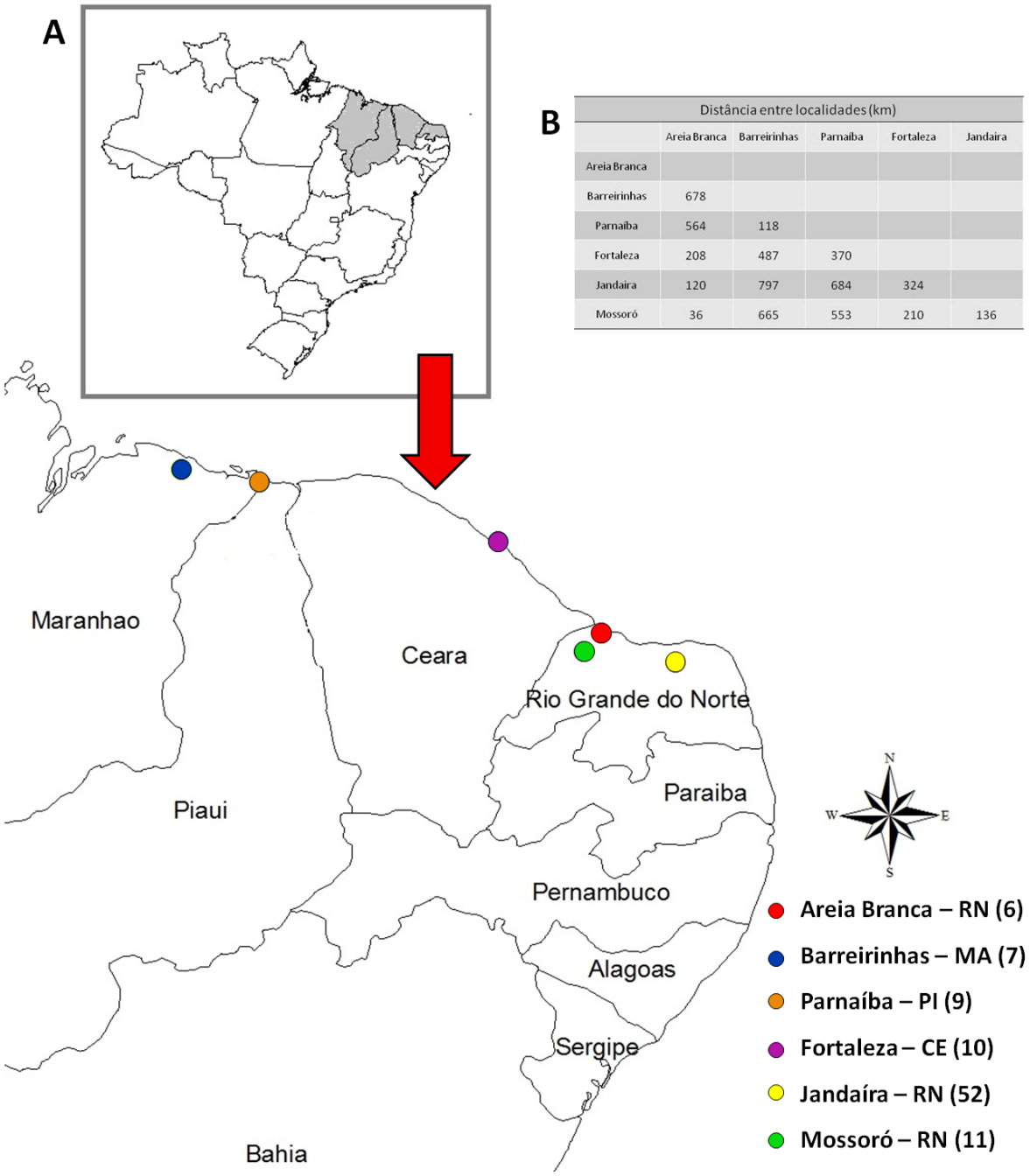
- Caracterizar, através do sequenciamento do gene mitocondrial *COI* e morfometria geométrica das asas anteriores, as populações de *M. subnitida* de maneira a estabelecer uma base de dados voltada para sua identificação e conservação;
- Verificar a possibilidade de rastreamento geográfico das diferentes populações da espécie, bem como sua estrutura, a dinâmica das populações e o fluxo gênico entre elas;
- Determinar os haplótipos mitocondriais e suas relações genéticas;
- Verificar se a grande diversidade de ambientes onde habita esta espécie é compatível com sua variabilidade genética e morfológica ou se esta espécie é geneticamente homogênea;
- Inferir eventos históricos e demográficos envolvidos na determinação do padrão da diversidade atual encontrado na espécie;
- Determinar áreas de maior variabilidade genética e morfológica e consequentemente, prioritárias para conservação dos recursos genéticos desta espécie

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Material biológico

Para este estudo foram coletadas amostras de *M. subnitida* de diferentes localidades dentro da distribuição geográfica desta espécie. Ao total foram coletadas abelhas de 95 colônias, para análises morfométricas foram analisadas operárias de 90 colônias, sendo quatro de Areia Branca – RN, seis de Barreirinhas – MA, nove de Parnaíba – PI, 10 de Fortaleza – CE, 52 de Jandaíra – RN e nove de Mossoró – RN, para as análises moleculares esses números variaram um pouco, foram utilizadas 92 abelhas, sendo seis de Areia Branca, sete de Barreirinhas, nove de Parnaíba, 10 de Fortaleza, 49 de Jandaíra e 11 de Mossoró (Figura 4). Uma vez coletadas, as amostras foram identificadas quanto ao sexo para garantir apenas a análise das fêmeas e acondicionadas em frascos contendo álcool absoluto a -20°C.



Distância entre localidades (km)					
	Areia Branca	Barreirinhas	Parnaiba	Fortaleza	Jandaira
Areia Branca					
Barreirinhas	678				
Parnaiba	564	118			
Fortaleza	208	487	370		
Jandaira	120	797	684	324	
Mossoró	36	665	553	210	136

Figura 4. Mapa geográfico do nordeste brasileiro. **A)** Identificação das localidades amostradas, os números entre parênteses informam a quantidade de ninhos coletados. **B)** Tabela com a distância reta entre os pares de cidades em quilômetros (km).

3.2. Características da área amostrada

Segundo a classificação climática de Köeppen (Köeppen, 1948) (Figura 5), baseada em dados mensais pluviométricos e termométricos, são encontrados dois tipos distintos de clima dentre as localidades amostradas; assim as cidades de Barreirinhas, Parnaíba e Fortaleza são classificadas como Aw, ou seja, possuem clima tropical com estação seca. Esse tipo de clima, também designado como clima de savana é caracterizado por apresentar apenas duas estações, uma estação de seca durante o inverno, na qual a evapotranspiração potencial largamente excede a precipitação, levando em alguns casos, a situações extremas de seca; e uma estação úmida, em que a precipitação é superior à evapotranspiração potencial, permitindo a reposição das reservas hídricas na biomassa, nos solos e nos aquíferos. Nessas regiões, a maior concentração de chuvas ocorre no outono e a temperatura média do mês mais frio é acima de 18 °C.

Já Areia Branca, Jandaíra e Mossoró possuem outro tipo de clima representado pela sigla BSh e denominado como semi-árido quente. Esse tipo de clima é caracterizado por longos períodos de seca e chuvas ocasionais concentradas em poucos meses do ano. A precipitação pluviométrica, que é em média 750 mm/ano, é bastante irregular no espaço e no tempo. As altas temperaturas (cerca de 26° C) exercem forte efeito sobre a evapotranspiração que, por sua vez, determinam o déficit hídrico por ser maior que a precipitação anual. O regime de chuvas rápidas e fortes, aliado a um substrato rico em rochas impedem a penetração de água no subsolo e formação de aquíferos.

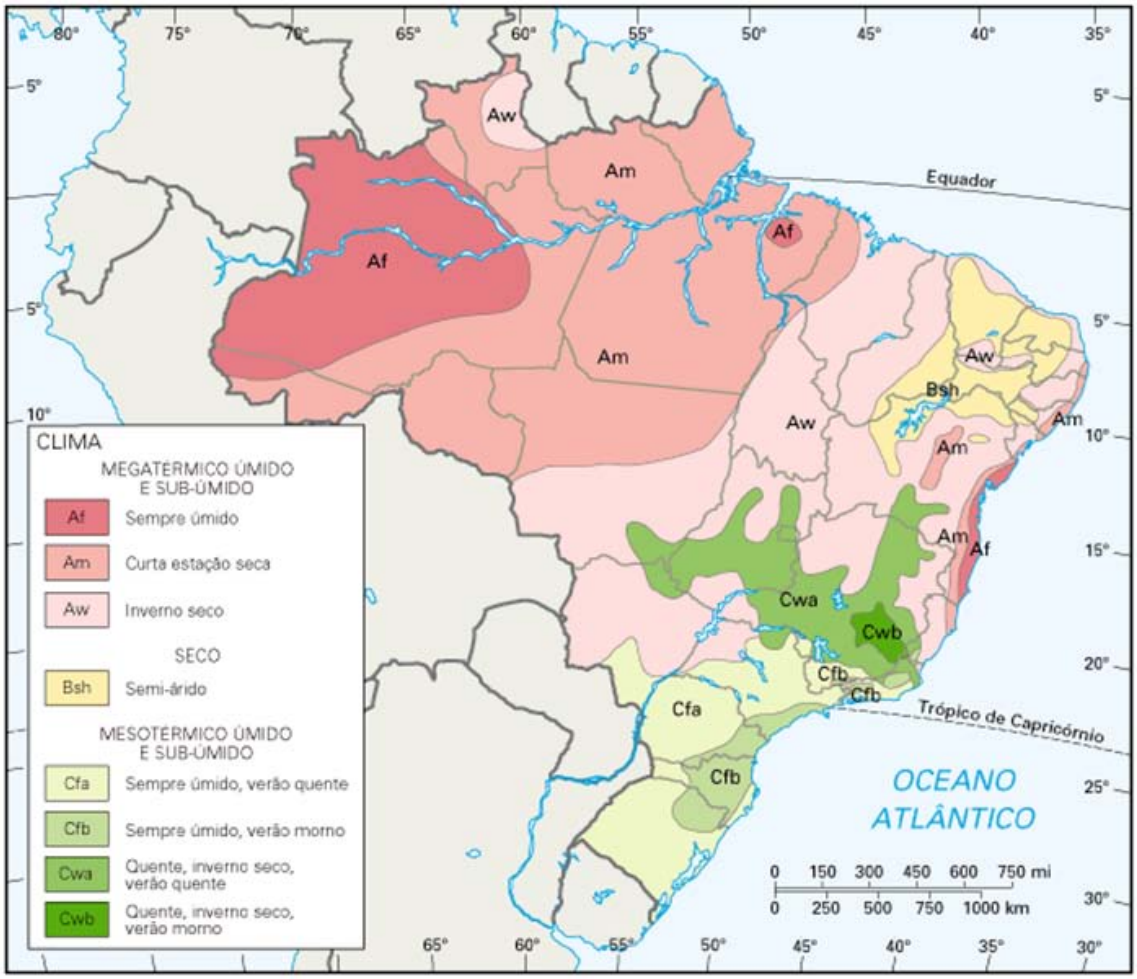


Figura 5. Mapa da classificação climática de Köppen para o Brasil (www.guianet.com.br/brasil/mapaclima.htm).

3.3. Análises morfométricas

Uma amostra de aproximadamente 10 operárias por colônia foi analisada quanto ao padrão de venação das asas anteriores. Para tal finalidade, a asa anterior direita de cada indivíduo foi retirada com o auxílio de pinças, umedecida em álcool 70% e água e posteriormente montada entre lâmina e lamínula com ajuda de um pincel. Estas asas tiveram sua imagem capturada por uma câmera digital acoplada a um estereomicroscópio e foram armazenadas em um computador. Posteriormente, foi criado um arquivo .tps com as imagens das asas usando software tpsUtil versão 1.40 (Rohlf, 2008a) e 11 marcos anatômicos foram manualmente marcados nas junções de nervuras das células de cada asa (Figura 6) utilizando o software tpsDig versão 2.12 (Rohlf, 2008b).

O arquivo .tps serviu como banco de entrada para o software MorphoJ versão 1.03 (Klingenberg, 2011), no qual foram realizadas as análises morfométricas. Todos os softwares utilizados nesse trabalho são de livre acesso e disponíveis na internet (http://life.bio.sunysb.edu/morph/ e http://www.flywings.org.uk/MorphoJ).

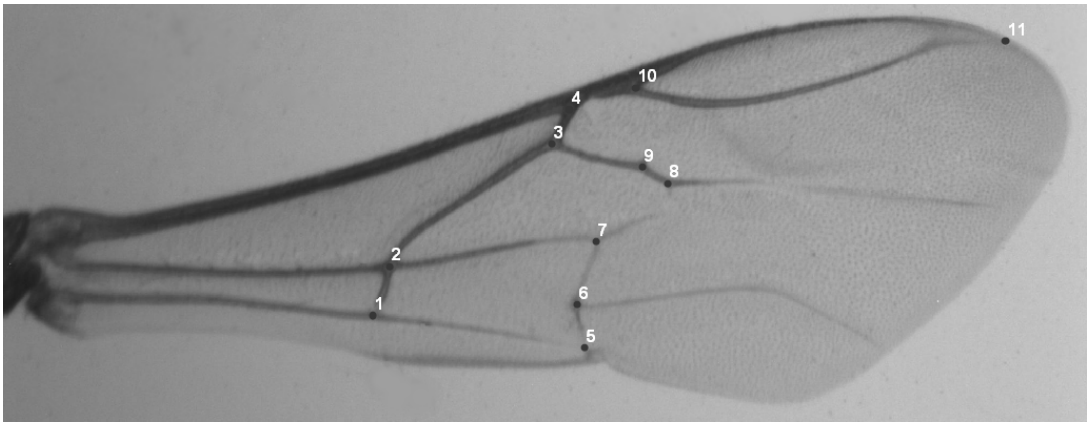


Figura 6. Asa anterior direita de *M. subnitida* com os 11 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras utilizados na análise morfométrica**.**

No MorphoJ, as imagens sofreram o ajuste completo de Procrustes e os dados foram projetados no espaço tangente pela projeção ortogonal (Dryden e Mardia, 1998). Através de um painel com a distribuição acumulativa da forma média da distância de Procrustes de toda a amostra, foi possível verificar a qualidade dos dados e retirar indivíduos atípicos (que não foi o caso) das análises. A partir dos dados da forma, depois da sobreposição de Procrustes, foi gerada uma matriz de covariância. Os dados obtidos foram usados como variáveis para análises multivariadas, tais como Análise de Componente Principal (PCA), Análise de Variáveis Canônicas (CVA) e Análise de Função Discriminante (DFA).

A PCA foi usada apenas como uma análise exploratória para caracterizar a variação da forma. É calculada sobre a variância/co-variância dos caracteres e não a partir da matriz bruta dos dados, não sendo otimizada para encontrar diferença entre os grupos. Por esse motivo não pode ser usada como uma análise classificatória. Os valores de Componente Principal (PC) foram computados como vetores de desvio das observações em relação à média das amostras e multiplicado pelos vetores dos coeficientes de PC (*eigenvectors*). Os resultados foram visualizados em três tipos de gráficos, *PC shape change*: gráfico da mudança de forma,

Eigenvalue: porcentagem da variância total para cada PC e *PC scores*: gráfico de dispersão dos valores de PC.

CVA foi utilizada para encontrar a estrutura característica que melhor distingue os grupos. Os grupos foram separados de acordo com as localidades amostradas e simultaneamente utilizados para calcular os eixos que maximizam a separação das populações em relação a uma estimativa compartilhada de variação.

A DFA foi utilizada para obter a probabilidade de classificação correta usando apenas a matriz de covariância entre os pares de grupos nas análises. Essa análise realiza a validação cruzada (Lachenbruch, 1967) para avaliar a confiabilidade da classificação de seus resultados. O valor resultante desta análise representa a probabilidade de que um indivíduo qualquer retirado ao acaso da amostragem seja corretamente classificado dentro do seu respectivo grupo.

As distâncias quadradas de Mahalanobis entre os centros de distribuição dos grupos foram calculadas e a partir delas foi construído um dendograma de proximidade morfológica pelo método de *Neighbor Joining* através do *software* MEGA versão 5.05 (Tamura, Peterson *et al.*, 2011). Para verificar a representatividade dos dendogramas em relação à matriz de distâncias e também para aumentar a confiabilidade das conclusões frente à interpretação dos mesmos, o índice de correlação cofenética foi calculado com o auxílio do programa TreeFit (Kalinowski, 2009). Tal análise estabelece uma correlação entre a matriz de similaridade ou dissimilaridade com o dendrograma e assim compara e estabelece uma correlação entre as reais distâncias obtidas entre os grupos com as distâncias representadas graficamente, que estão sujeitas ao acúmulo de erro.

A distância geográfica, em linha reta entre as populações em quilômetros, a partir das coordenadas geográficas das cidades foi identificada utilizando a ferramenta Google Earth versão 6.1.0.5001 (Google Inc., 2011). Para verificação de correlações significativas entre as distâncias morfológicas e distâncias geográficas das localidades estudadas foi também realizado um teste de Mantel, com o auxílio do software TFPGA (Miller, 1997).

Depois de finalizada as análises com as seis populações de *M. subnitida* amostradas, análises adicionais foram feitas inserindo cinco espécies do gênero *Melipona* como grupo

externo. São elas *M. fasciculata, M. fuliginosa, M. rufiventris, M. scutelaris* e *M. seminigra pernigra.* Tais análises foram realizadas seguindo a metodologia descrita acima e seus dados nos serviram de parâmetro para inferir conclusões a respeito das distâncias entre as populações.

3.4. Análise molecular

3.4.1. Extração do DNA

O DNA para as análises foi extraído pelo método Chelex (Walsh, Metzger *et al.*, 1991), a partir da perna de uma operária por colônia, preservada em álcool até o momento da extração. A perna de cada indivíduo foi retirada com auxilio de pinças devidamente flambadas, colocadas em tubos eppendorf individuais e levemente macerada em 400 µl de Chelex 10%. Em seguida, a solução foi incubada por 30 minutos a 56°C, depois aquecida por 5 min a 100°C e então centrifugada a 14.000 rpm por 3 min.

3.4.2. Reação da Polimerase em Cadeia

O material genético foi submetido à PCR para amplificação do gene mitocondrial *Citocromo Oxidase subunidade I* (*COI*), utilizando os *primers* mtD6 (5´- GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC - 3´) e mtD9 (5´ - CCCGGTAAAATTAAAATATAAACTTC - 3´) (Simon, Frati *et al.*, 1994) que são considerados universais ("UBC Insect Mitochondrial DNA Primers Kit") por amplificarem fragmentos em uma ampla variedade de organismos.

A reação de PCR foi realizada com 2 µl do sobrenadante da extração com Chelex como DNA molde; 2 µl de tampão de PCR 10X; 2 µl de dNTPs 2mM cada; 0,6 de $MgCl_2$ 50 mM; 0,4 µl de cada *primer* (20 pmoles/µl); 4 µl de Betaina (5M); 0,2 µl de Taq DNA polimerase (5 U/µl); 8,4 µl de H2O nuclease free, totalizando um volume final de 20 µl. A amplificação do lócus *COI* foi feita em um termociclador PCR Mastercycler® pro 950 W – Eppendorf, de acordo com o programa abaixo (Figura 7):

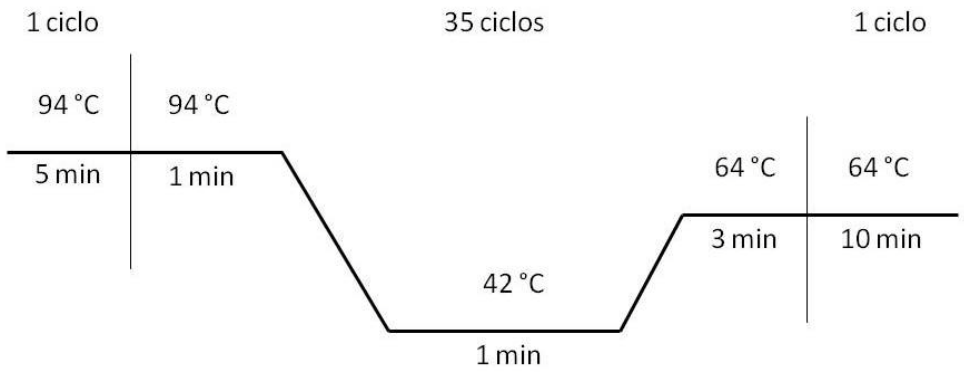


Figura 7. Ciclos de reação para gene mitocondrial amplificação dos *COI*.

Após amplificação, foi verificada a existência do fragmento esperado a partir de 2 µl da reação de PCR submetidos a eletroforese em Gel de Agarose 0,8% corado com GelRed (Uniscience) e visualizado em transiluminador de luz UV. Então, o DNA amplificado restante foi purificado com 0,5 µl de enzima ExoSap-IT®, e posteriormente submetidos ao sequenciamento pela empresa Macrogen Inc.

3.4.3. Análise dos dados

Após o sequenciamento, as sequências foram visualizadas e editadas no software Geneious Pro 5.4.6 (Drummond, Ashton *et al.*, 2011) através da ferramenta "MUSCLE aligment" com o número máximo de interações sendo igual a 8. A partir desse software também foi realizado a tradução das sequências em aminoácidos para verificar a possível presença de *códons* de parada, assim como a pauta de leitura da proteína. O fragmento de DNA consenso isolado foi comparado à sequência do genoma mitocondrial de *COI* da espécie *Melipona bicolor* (número de acesso NCBI GeneBank: NC_004529.1) utilizando o programa de alinhamento BLAST 2 sequence (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi).

O software DnaSP v.5.10 (Librado e Rozas, 2009) foi utilizado para separar os haplótipos em seus respectivos grupos e 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). O software Arlequin versão 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010) foi empregado para estimar as diferenças entre as populações, baseado nas frequências

haplotípicas, realizando o teste exato juntamente com o método da cadeia de Markov. A rede de haplótipos foi construída através do programa NETWORK v. 4.6 (Polzin, 2003), utilizando-se o algoritmo *Median Joining* que identifica os haplótipos mais proximamente relacionados. Também foi construído um cladograma baseado nas distâncias genéticas pelo método de *Neighbor Joining* com auxílio do programa MEGA versão 5.05 (Tamura, Peterson *et al.*, 2011), e seu índice de correlação cofenética foi calculado com o auxílio do programa TreeFit (Kalinowski, 2009).

A sequência protéica foi comparada às sequências preditas no banco de dados NCBI, onde pudemos escolher mais duas espécies proximamente relacionadas para servir de grupo externo (*M. quadrifasciata* e *M. mandacaia*). Posteriormente, estas sequências foram alinhadas contra a sequência de *M. subnitida* através do programa CLUSTALW (http://www.genome.jp/tools/clustalw/).

A matriz de distância-*p* (*d*) entre os haplótipos foi calculada usando o modelo de Kimura-two-parameter (K2P) que é a melhor métrica para calcular distâncias baixas (Nei e Kumar, 2000) e, então, utilizada para construção de um cladograma pelo método de *Neighbor Joining* através do software MEGA versão 5.05 (Tamura, Peterson *et al.*, 2011), e seu índice de correlação cofenética foi calculado com o auxílio do programa TreeFit (Kalinowski, 2009).

Foram feitas análises de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier, Smouse *et al.*, 1992), com o objetivo de estimar a variabilidade entre os grupos de *M. subnitida*. Esta análise realiza estimativas de componentes de variância dentro e entre grupos e fornece valores de Φ, que refletem a correlação da diversidade haplotípica em diferentes níveis hierárquicos (Excoffier, Smouse *et al.*, 1992). O Φst corresponde a covariância entre indivíduos dentro de populações, o Φsc é a covariância entre populações dentro de um grupo e Φct corresponde a covariância entre grupos. Essas análises foram realizadas com o auxílio do programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). Primeiramente analisamos todas as populações amostradas como pertencentes a um único agrupamento populacional. Tendo em vista os resultados, análises de AMOVA adicionais foram realizadas, subdividindo as populações em grupos até encontrarmos o agrupamento mais condizente com os dados.

Testes de Neutralidade baseados nos polimorfismos das sequências foram realizados como indicativos de expansão e contração populacional, já que esses eventos demográficos são indicados por mutações recentes (Fu, 1997). Tais testes foram realizados com o auxílio do programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). O teste D de Tajima baseia-se nas diferenças entre o número de sítios segregantes (S) ou no número de diferenças nucleotídicas (π) entre os pares de sequências, escolhidas aleatoriamente na amostra (Tajima, 1989). A quantidade de variação acumulada pode ser medida pelo parâmetro θ, que em condições de neutralidade seriam aproximadamente as mesmas para S e π e distintas na presença de seleção natural. Assim, a diferença (D) entre as estimativas de θ de S e π serviram como teste para detecção de desvio de neutralidade ($D = 0$, sob neutralidade, e $D \neq 0$, sob seleção). Valores negativos e significativos para o D sugerem seleção purificadora, efeito carona ou expansão populacional; enquanto que os valores positivos são indicativos de seleção estabilizadora ou gargalo populacional recente (Tajima, 1989).

O teste Fs de Fu compara o número observado de alelos com o número de alelos esperados se a população se mantivesse constante. Sendo o valor de Fs dado pela equação "$Fs = \ln (S'/1 - S')$" (Fu, 1997), em que S' é a probabilidade de ter um número de alelos menor ou igual do que em uma amostra aleatória e assumindo que todos os alelos são seletivamente neutros. Em uma amostra com número alto de mutações recentes, o parâmetro θ baseado no valor de π tende a ser menor do que o baseado no número de alelos e assim, S' pode ser um bom indicativo sobre quantidade de mutações recentes na amostra se mostrando mais sensível do que o D de Tajima. Valores negativos e significativos para Fs são indicativos de expansão populacional. Uma vez que Fs tende a ser negativo quando há um excesso de mutações recentes, um valor negativo alto será tomado como evidência contra a neutralidade das mutações (Fu, 1997).

Também foram realizadas análises de *Mismatch distribution*, que avalia o número médio de diferenças par a par entre as sequências de DNA das populações, investigando sua história demográfica. Este teste foi realizado com auxílio do programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010) e seu gráfico visualizado por meio do programa DNAsp v.5.10 (Librado e Rozas, 2009). Tal análise permite discriminar entre populações que sofreram expansão demográfica, a qual é

esperada que a distribuição do número médio de diferenças par a par entre as sequências de DNA seja unimodal, e populações permaneceram estáveis ao longo do tempo, na qual é esperada uma distribuição bi ou multimodal (Rogers e Harpending, 1992). Nessa análise também foi estimado o tempo desde a expansão em unidades de tempo mutacional (τ) e tamanho populacional antes e depois da expansão ($\theta 0$ e $\theta 1$, respectivamente). A validade desses parâmetros foi obtida com o teste SSD (*Sum of Squared Differences*) entre a *Mismatch distribution* simulada e observada.

Para testar os modelos de isolamento por distância, em que é esperada uma correlação positiva entre as distâncias genéticas e distâncias geográficas das populações (Telles e Diniz-Filho, 2005) usamos uma matriz de distância calculada pelo programa MEGA versão 5.05 (Tamura, Peterson *et al.*, 2011), de acordo com o modelo de substituição nucleotídica K2P. Análise estatística, referente ao teste de Mantel, foi realizada com o software TFPGA (Miller, 1997) buscando correlações significativas entre as distâncias genéticas e distâncias geográficas das localidades estudadas.

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Morfometria geométrica

As amostras das asas de operárias de *M. subnitida* foram identificadas segundo seu local de coleta, totalizando seis grupos: Areia Branca – RN, Barreirinhas – MA, Parnaíba – PI, Fortaleza – CE, Jandaíra – RN e Mossoró – RN. A partir da configuração *consensus* dos 11 marcos anatômicos marcados nas nervuras das asas, foram obtidos os resíduos de Procrustes (Figura 8), no qual foi observado que a maioria dos pontos varia de forma isotrópica, sendo distribuídos circularmente em torno da média, enquanto os pontos 8, 9 e 11 variam de forma mais alotrópica que os demais. Os marcos anatômicos que mais variaram em ordem decrescente foram os 9, 8, 4 e 3 (Tabela 2).

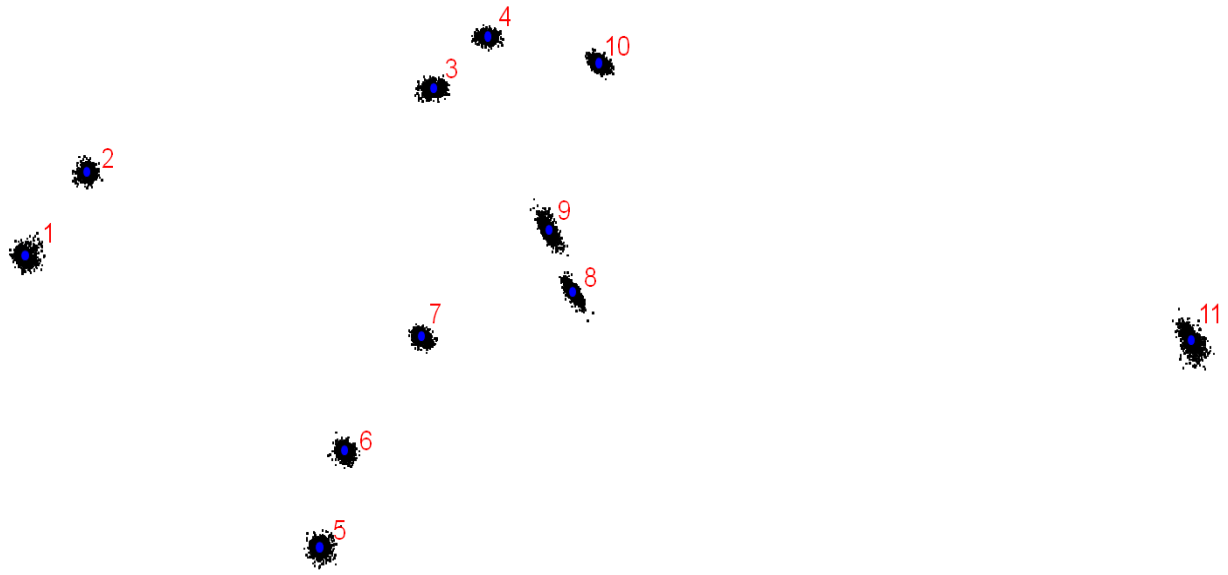


Figura 8. Resíduos de Procrustes dos 11 marcos anatômicos marcados nas junções das nervuras das asas de operárias. Pontos pretos representam os resíduos de Procrustes e pontos azuis representam a média.

Tabela 2. Contribuição relativa de cada marco anatômico

Marco anatômico	Variação %
1	1,377
2	1,879
3	13,055
4	15,498
5	3,908
6	11,897
7	6,098
8	15,944
9	26,963
10	3,369
11	0,012

As Análises de Componente Principal, a partir dos resíduos de Procrustes das coordenadas Cartesianas alinhadas dos 11 marcos anatômicos, geraram 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, as 11 primeiras atingiram autovalor igual ou superior a 1, explicando 92,23% da variabilidade de todo o conjunto de dados, sendo o PC1 (33,59%) e PC2 (12,78%) os dois principais eixos de maior variação dentro da amostra (Figura 9).

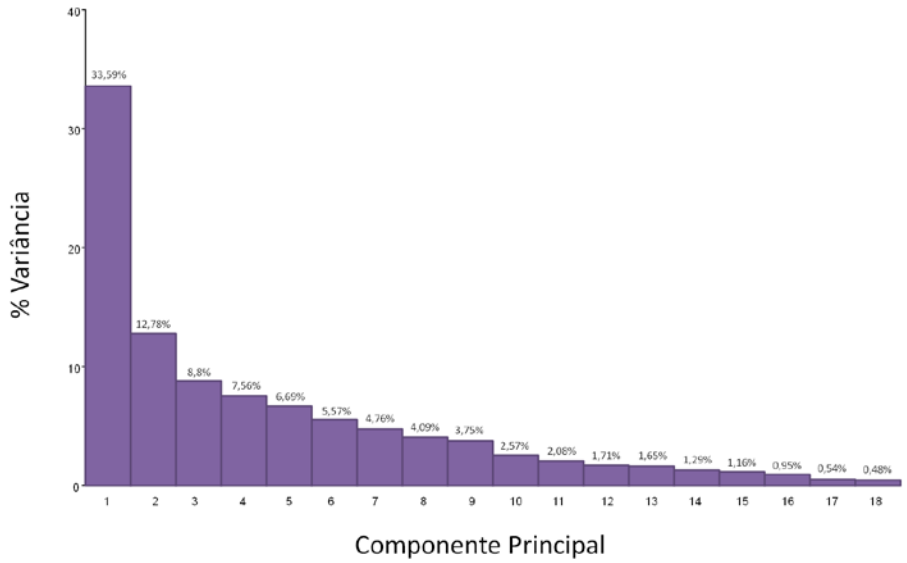


Figura 9. Representação gráfica da porcentagem da variância das 18 medidas de deformações relativas dos Componentes Principais**.**

No gráfico de dispersão, com os respectivos eixos que mais contribuíram para variação dos grupos na PCA (Figura 10), foi observado que nenhum dos grupos analisados apresentou grandes diferenças quando analisamos o eixo horizontal (PC1), sendo a menor diferença de forma encontrada entre Barreirinhas e Parnaíba, já que as projeções de ambas são semelhantes em tal eixo, e a maior variação da forma entre essas duas localidades com Jandaíra. Mossoró possui grande semelhança tanto com Barreirinhas quanto com Parnaíba, enquanto a população de Areia Branca encontra-se completamente sobreposta à de Jandaíra. Já no PC2, que corresponde ao eixo vertical do gráfico de dispersão (Figura 10), é possível observar que há diferenças entre Barreirinhas e Parnaíba, à medida que ambas estão mais afastadas. Areia Branca continua se sobrepondo à Jandaíra, Mossoró está completamente disposta dentro da distribuição de Parnaíba, e a maior distância pode ser verificada entre Barreirinhas e Fortaleza.

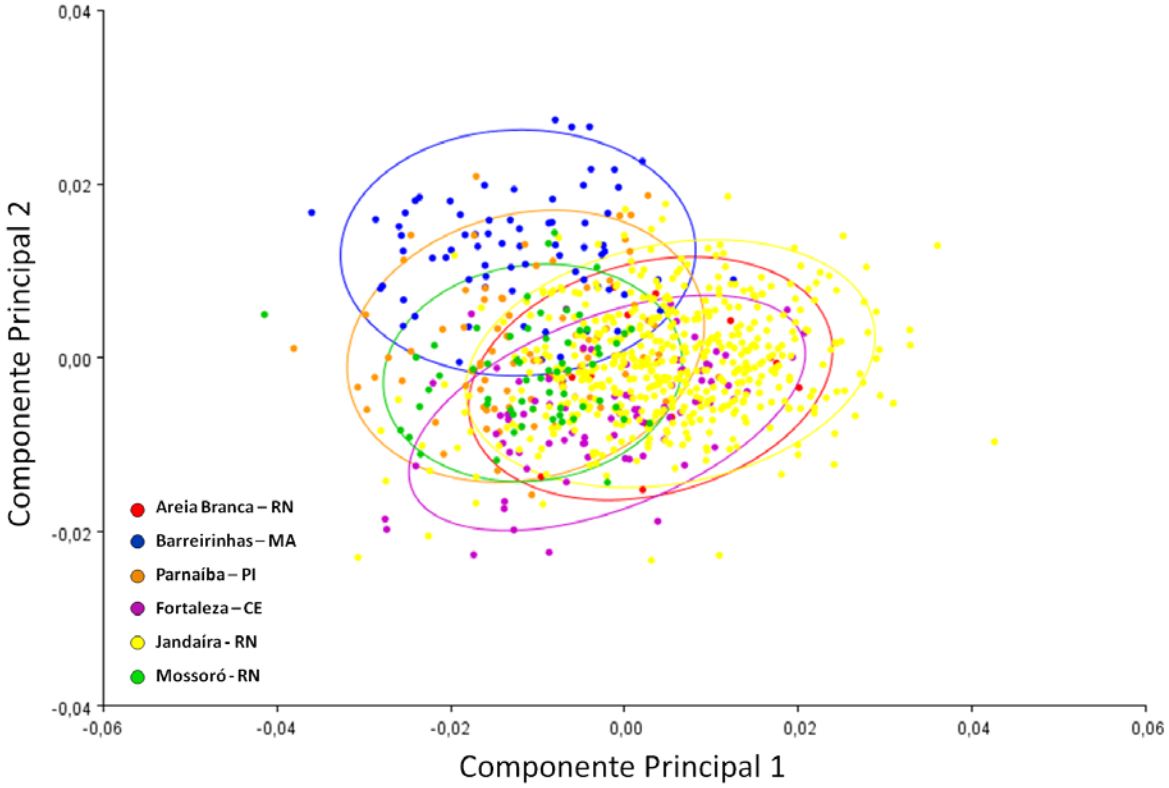


Figura 10. Representação gráfica da Análise de Componente Principal das populações de abelhas das cidades de Areia Branca – RN, Barreirinhas – MA, Parnaíba – PI, Fortaleza – CE, Jandaíra – RN e Mossoró – RN, obtida a partir das análises dos 11 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas.

De acordo com a Análise de Variáveis Canônicas, realizada a partir da matriz de covariância de todos os grupos, encontramos cinco eixos que maximizam a separação significativa dessas populações, relativamente a uma estimativa compartilhada e pressupondo que a matriz de covariância é a mesma entre todos os grupos. Dentre os cinco eixos, os quatro primeiros foram responsáveis por 99,37% de toda a variabilidade de todo o conjunto de dados. Somente os dois primeiros eixos CV1 e CV2 já explicam uma porcentagem bastante elevada, contribuindo, respectivamente, com 57,09 e 21,62% de toda a variabilidade encontrada (Tabela 3).

Tabela 3. Variação dos cinco eixos das Variáveis Canônicas.

	Autovalores	% Variância	% Acumulativa
1.	1,89620768	57,092	57,092
2.	0,71823268	21,625	78,718
3.	0,42255046	12,722	91,44
4.	0,26327909	7,927	99,367
5.	0,0210223	0,633	100

A mudança na forma que ocorre em CV1 é caracterizada por um sutil alongamento na célula radial, uma acentuada modificação da forma da primeira célula medial pelo deslocamento do marco anatômicos 9 em direção ao 8 e encurtamento da parte distal da asa, que é evidenciado pela diminuição do comprimento da célula marginal e segunda cubital (Figura 11). A maior modificação desse plano pode ser explicada pela variação dos marcos anatômicos 7 e 9 no eixo y. Já em CV2 (Figura 12) também ocorre a deformação da forma da célula medial pela aproximação do marco anatômico 3 em direção ao 4 e por uma pequena modificação na posição do marco anatômico 9 em direção ao 8, há um alongamento da parte proximal da segunda célula cubital e um encurtamento da célula marginal caracterizando uma leve diminuição da parte distal da asa. As variações dos marcos anatômicos 3 e 9 do eixo x são evidentes nesta variável canônica.

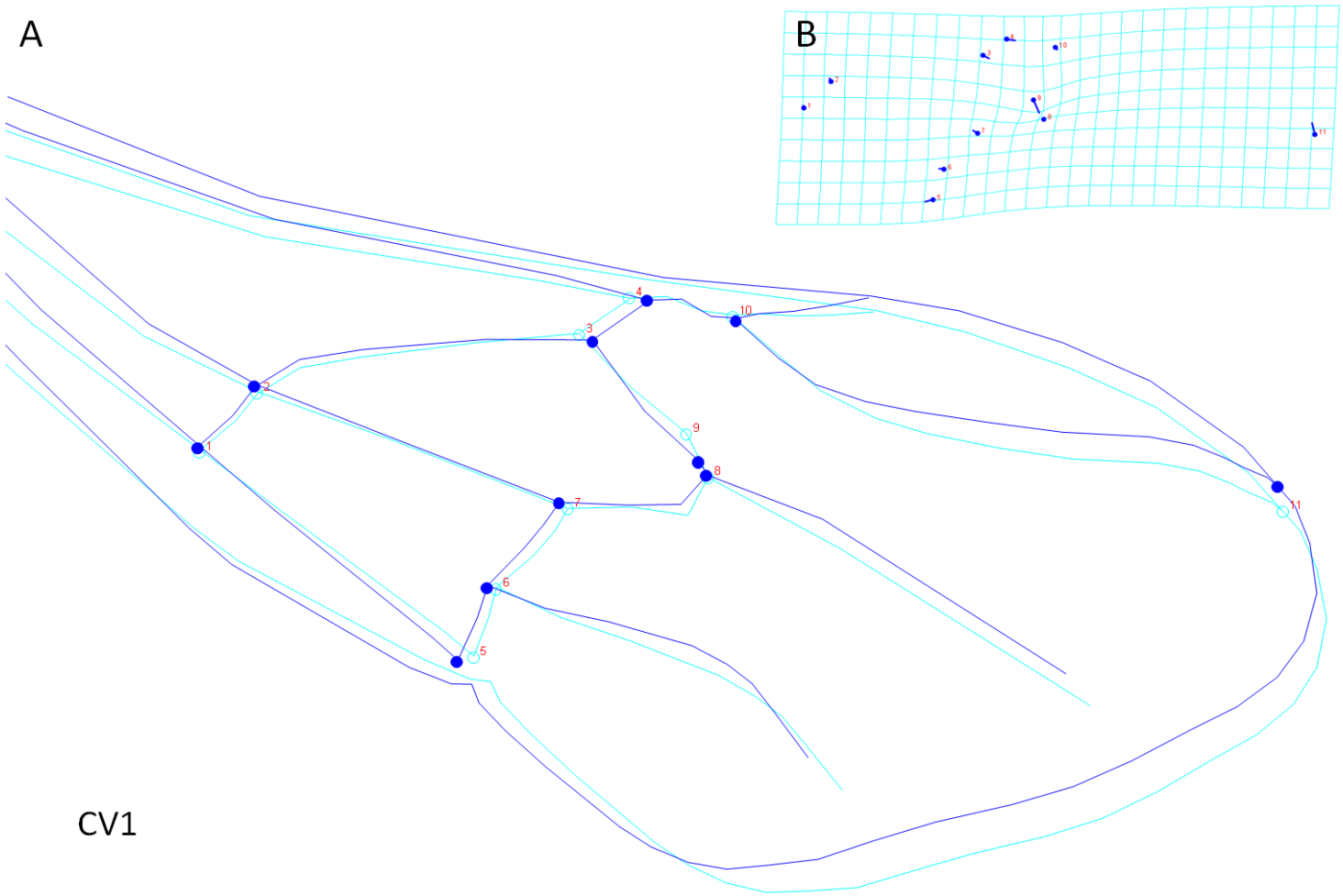


Figura 11. Modificação da forma média em direção a forma correspondente em CV1. **A)** Mudança de forma com a deformação de grade (*Thin-plate spline*). Cada linha começa na forma consenso, representado pelo ponto, o comprimento e a direção da reta indicam o movimento da forma inicial para a correspondente modificação. **B)** Modificação da forma mostrada a partir do esboço da estrutura biológica. Forma média em azul claro, forma correspondente a variação no primeiro eixo de variáveis canônicas em azul escuro. Os marcos anatômicos estão representados pelos pontos numerados.

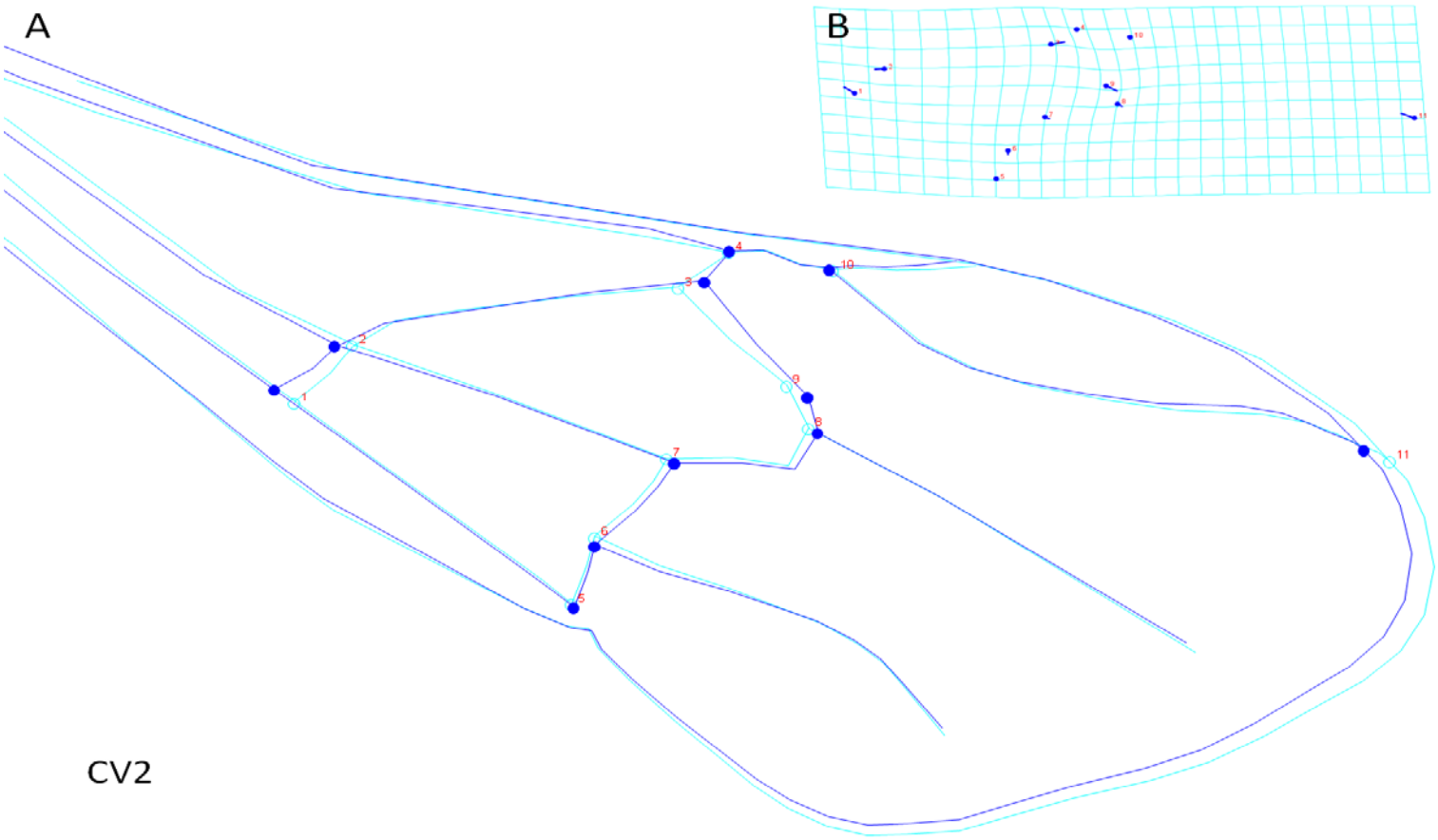


Figura 12. Modificação da forma média em direção a forma correspondente em CV2. **A)** Mudança de forma com a deformação de grade (*Thin-plate spline).* Cada linha começa na forma consenso, representado pelo ponto, o comprimento e a direção da reta indicam o movimento da forma inicial para a correspondente modificação. **B)** Modificação da forma mostrada a partir do esboço da estrutura biológica. Forma média em azul claro, forma correspondente a variação no segundo eixo de variáveis canônicas em azul escuro. Os marcos anatômicos estão representados pelos pontos numerados.

Observando-se a tabela das distâncias quadradas de Mahalanobis e distâncias de Procrustes entre as populações (Tabela 4) podemos identificar que a maior proximidade morfológica ocorre entre as populações de Areia Branca e Jandaíra, enquanto a maior distância pode ser encontrada entre Barreirinhas e Fortaleza. Assim como Barreirinhas, Parnaíba possui distâncias elevadas em relação a todas as outras localidades.

Tabela 4. Distâncias quadradas de Mahalanobis (metade inferior da tabela) e distâncias de Procrustes (metade superior da tabela) entre as populações estudadas obtidas através das Análises de variáveis Canônicas.

	Areia Branca	Barreirinhas	Fortaleza	Jandaíra	Mossoró	Parnaíba
Areia Branca		0,023	0,010	0,007	0,015	0,017
Barreirinhas	4,51		0,023	0,023	0,017	0,014
Fortaleza	2,13	5,24		0,013	0,013	0,015
Jandaíra	1,34	4,40	2,62		0,017	0,018
Mossoró	2,34	4,22	2,94	2,64		0,011
Parnaíba	3,01	3,32	3,61	3,10	3,34	

A partir das distâncias quadradas de Mahalanobis foi construído um dendograma de proximidade morfológica entre os grupos estudados (Figura 13) no qual podemos perceber que as populações de Barreirinhas e Parnaíba foram agrupadas em um ramo separado e mais distante das outras. O índice de correlação cofenética desse dendograma foi de 0,98, o qual é considerado altamente significante (Rohlf e Fisher, 1968) e nos fornece alta confiabilidade sobre as inferências geradas.

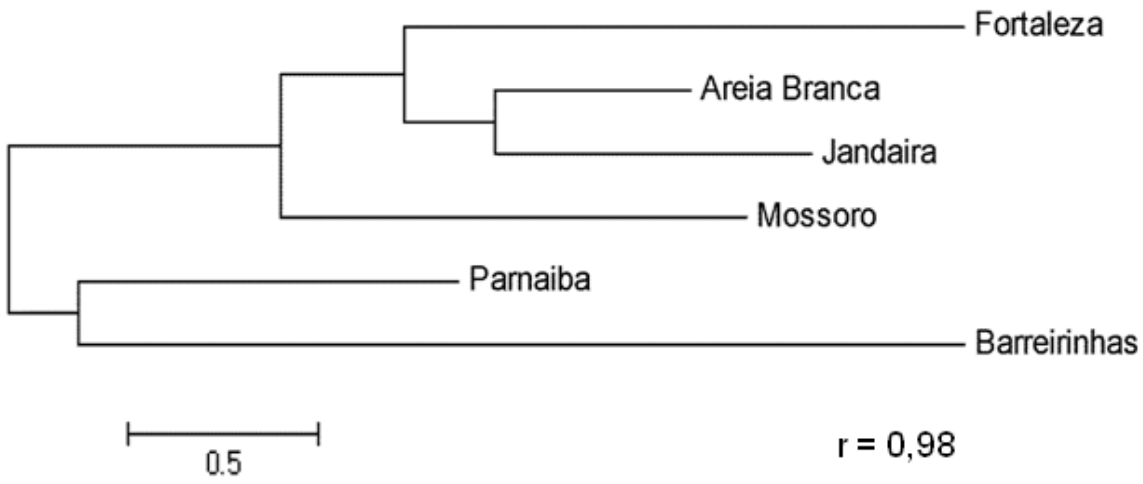


Figura 13. Dendograma de proximidade morfológica pelo método de *Neighbor Joining* entre as populações de *M. subnitida*. r = coeficiente de correlação cofenética.

Pelo fato dos estudos envolvendo morfometria geométrica em abelhas sem ferrão serem relativamente recentes, com o primeiro trabalho tendo sido publicado em 2007 (Mendes, Francoy *et al.*, 2007), existem poucos dados na literatura para a maioria das espécies. Dessa forma, os dados obtidos para as seis populações de *M. subnitida* amostradas neste trabalho foram comparados com outras cinco espécies do gênero *Melipona*, *M. fasciculata, M. fuliginosa, M. rufiventris, M. scutelaris* e *M. seminigra pernigra* (tabela 5), de modo a se obter um padrão de comparações. Foi observado que a distância entre Barreirinhas e Fortaleza (5,30) é da mesma ordem de magnitude que as distâncias encontradas entre outras espécies taxonomicamente bem estabelecidas, como é o caso entre *M. rufiventris* e *M. seminigra pernigra* (5,66).

Tabela 5. Distâncias quadradas de Mahalanobis obtidas através das Análises de Variáveis Canônicas comparando as populações de *M. subnitida* com grupo externos. M.fasc = *M. fasciculata*, M.ful = *M. fuliginosa*, M.ruf =*M. rufiventris*, M.scut = *M. scutelaris*, M.sem = *M. Seminigra.*

	Areia Branca	Barreirinhas	Fortaleza	Jandaíra	Mossoró	Parnaíba	M. fasc	M. ful	M. ruf	M. scut
Barreirinhas	4,53									
Fortaleza	2,13	5,30								
Jandaíra	1,33	4,47	2,65							
Mossoró	2,31	4,31	2,93	2,67						
Parnaíba	3,03	3,36	3,65	3,14	3,40					
M. fasc	10,47	12,30	9,79	10,64	10,57	11,57				
M. ful	11,03	11,67	10,63	11,28	10,81	11,17	11,08			
M. ruf	10,18	9,83	10,11	10,37	9,37	9,38	13,78	8,60		
M. scut	9,86	9,87	9,49	10,09	9,55	9,52	10,42	7,49	6,73	
M. sem	10,21	10,72	9,60	10,57	10,13	9,89	12,49	7,44	5,66	6,54

A distribuição característica dos pontos que melhor distingue a separação dos grupos de *M. subnitida* pode ser observada no gráfico de dispersão gerado a partir da CVA (Figura 14). Embora tenha sido discreta a variação dos grupos encontrada pela PCA, ela nos informa que a separação encontrada entre as populações pela CVA não é artificial. A estruturação, já revelada pela distância de Mahalanobis, também pode ser evidenciada aqui. Barreirinhas foi a localidade mais distante de todas as populações, possuindo sobreposição apenas com Parnaíba, enquanto as demais populações possuem pelo menos uma parte de seu conjunto de pontos em comum com todas as outras. Apesar de ser encontrada grande discriminação entre as populações de Barreirinhas e Fortaleza, podemos observar a ocorrência de um gradiente de variação morfológica entre elas, que é formado pelas outras populações.

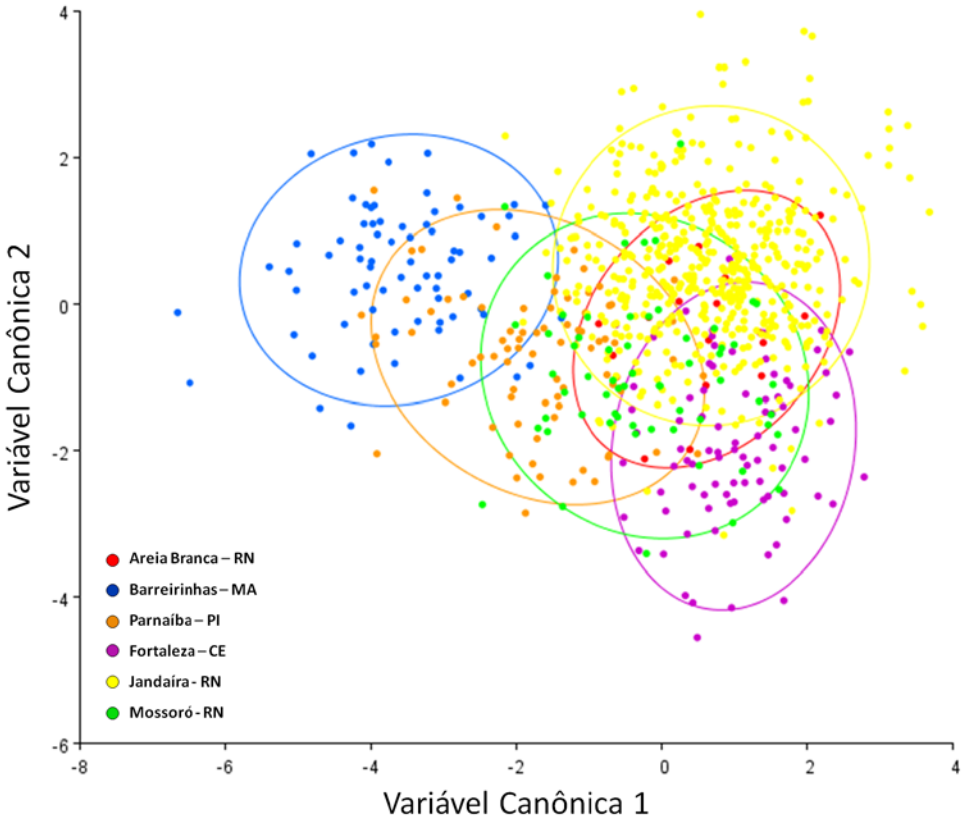


Figura 14. Representação gráfica da disposição relativa das populações de abelhas das cidades de Areia Branca – RN, Barreirinhas – MA, Parnaíba – PI, Fortaleza – CE, Jandaíra – RN e Mossoró – RN, obtida a partir das análises de variáveis canônicas dos 11 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas.

O teste de Mantel confirmou que as distâncias morfológicas estão correlacionadas com as distâncias geográficas entre as populações (r = 0,69), indicando haver uma distribuição gradual desse caráter no espaço geográfico. Em distâncias genéticas esse padrão pode ser gerado por isolamento por distância (Telles e Diniz-Filho, 2005), sendo essa uma forte hipótese se levarmos em conta a baixa capacidade de dispersão do grupo estudado. Tal evidência nos levaria a supor uma distribuição relativamente contínua de populações intermediárias ao longo da distribuição geográfica. Outra explicação plausível, e talvez mais provável, seria a existência de um fluxo gênico facilitado pelo homem através do transporte de colônias, com ocorrência mais provável entre as regiões mais próximas. Nessa mesma linha de raciocínio, a maior diferenciação da população de Barreirinhas poderia estar relacionada ao fato dessas abelhas terem sido redescobertas em tal localidade há poucos anos (Rêgo e Albuquerque, 2006), o que pode ser um indício de que essas populações ainda não tenham sofrido tanta intervenção humana.

No geral, a variação dentro do CVA se mostrou bastante discreta. No trabalho com populações de *M. beecheii,* Francoy e colaboradores (2011) puderam visualizar uma discriminação bem definida entre as abelhas do México, Guatemala, El Salvador e Costa Rica, identificando ecótipos localmente adaptado. Também foi possível identificar com clareza a ausência de fluxo gênico entre populações de *Plebeia remota* de localidades diferentes mantidas em um mesmo meliponário por aproximadamente 10 anos, sendo confirmada por outras técnicas (Francisco, Nunes-Silva *et al.*, 2008). Entretanto, vale lembrar que, no caso de *M. beecheii*, as distâncias geográficas entre as populações amostradas por Francoy e colaboradores (2011) eram muito superiores às distâncias entre as populações do presente trabalho e que no segundo caso, outros indícios morfológicos e comportamentais já indicavam certa ausência de fluxo gênico, sendo que uma das proposições finais do trabalho é a de que tais populações de *P. remota* sejam, na verdade, unidades taxonômicas diferentes (Francisco, Nunes-Silva *et al.*, 2008).

Quando comparamos os grupos de *M. subnitida* com as outras espécies do gênero *Melipona* já listadas acima (Figura 15) observamos que Barreirinhas e Parnaíba embora estejam aparentemente muito próximas às outras populações, ocupam somente a parte superior do

conjunto. No entanto todas as populações de *M. subnitida* ficaram agrupadas e bem distantes das outras espécies, correspondendo a relação filogenética de *Melipona* relatada por Silveira e colaboradores (2002) e Camargo e Pedro (2007). De acordo com estas visões, *M. subnitida* e *M. fasciculata,* que se encontram mais afastadas das demais, pertencem taxonomicamente ao subgênero *Melipona* e *Melikerria,* respectivamente, enquanto as outras espécies que se encontram mais proximamente relacionadas são pertencentes ao subgênero *Michmelia.*

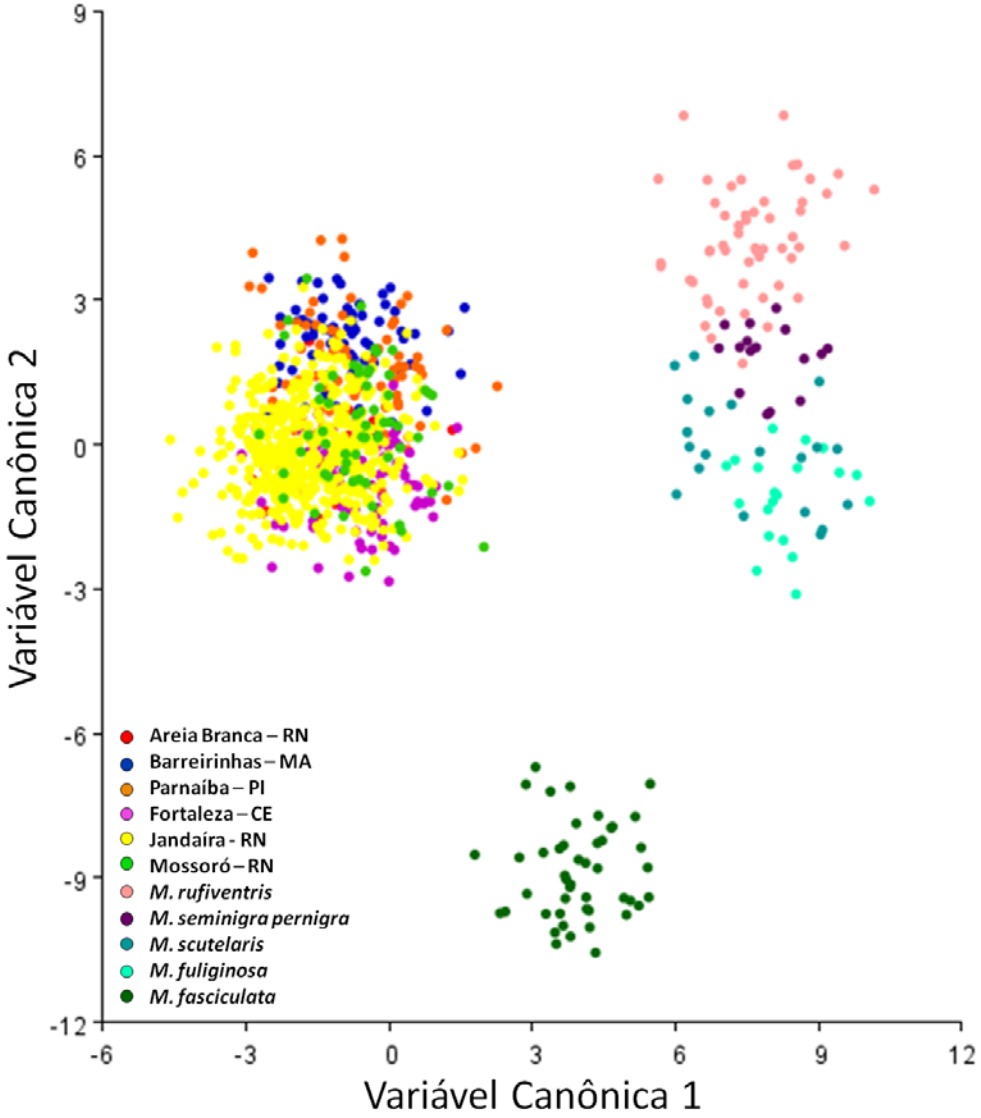


Figura 15. Representação gráfica da análise de variáveis canônicas comparando as populações de *M. subnitida* de Areia Branca – RN, Barreirinhas – MA, Parnaíba – PI, Fortaleza – CE, Jandaíra – RN e Mossoró – RN com amostras de *M. fasciculata, M. fuliginosa, M. rufiventris, M. scutelaris* e *M. seminigra pernigra.*

A partir das distâncias quadradas de Mahalanobis entre as populações de *M. subnitida* e as outras espécies utilizadas como grupo externo, foi construído um dendograma de proximidade morfológica com um coeficiente de correlação cofenética igual 0,96. Confirmando os resultados observados no gráfico (Figura 16), todos os grupos de *M. subnitida* se encontram em um ramo bem definido e separado das outras espécies de *Melipona,* que também foram agrupadas de acordo com a figura 15 e com as classificações taxonômicas encontradas na literatura (Silveira, Melo *et al.*, 2002; Camargo e Pedro, 2007).

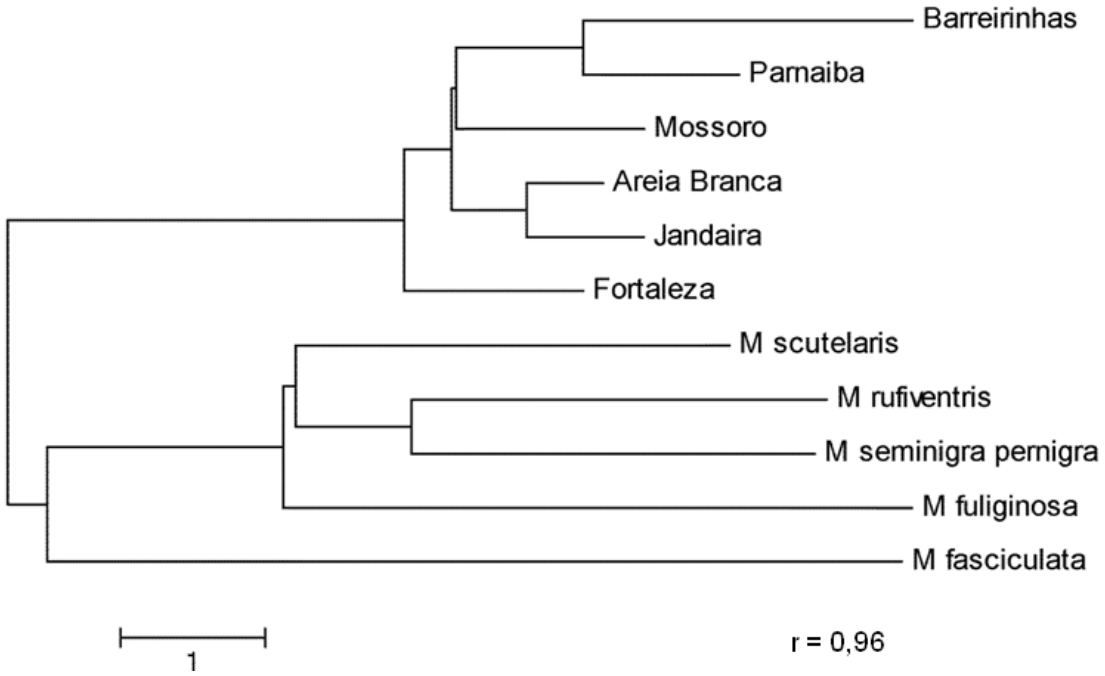


Figura 16. Dendograma de proximidade morfológica pelo método de *Neighbor Joining* entre as populações de *Melipona subnitida* (Areia Branca – RN, Barreirinhas – MA, Parnaíba – PI, Fortaleza – CE, Jandaíra – RN e Mossoró – RN) e as espécies utilizadas como grupo externo (*M. fasciculata, M. fuliginosa, M. rufiventris, M. scutelaris* e *M. seminigra pernigra)*. r = coeficiente de correlação cofenética.

Quando estas populações foram comparadas duas a duas, na Análise de Funções Discriminantes, observamos que as distâncias de Mahalanobis (Tabela 6) diferem sutilmente da encontrada pela Análise de Variáreis Canônicas (Tabela 4), pois apenas as matrizes de covariância entre os pares são incluídas no processo. Independente disso, a menor distância continuou sendo a encontrada entre as populações de Areia Branca e Jandaíra e a maior

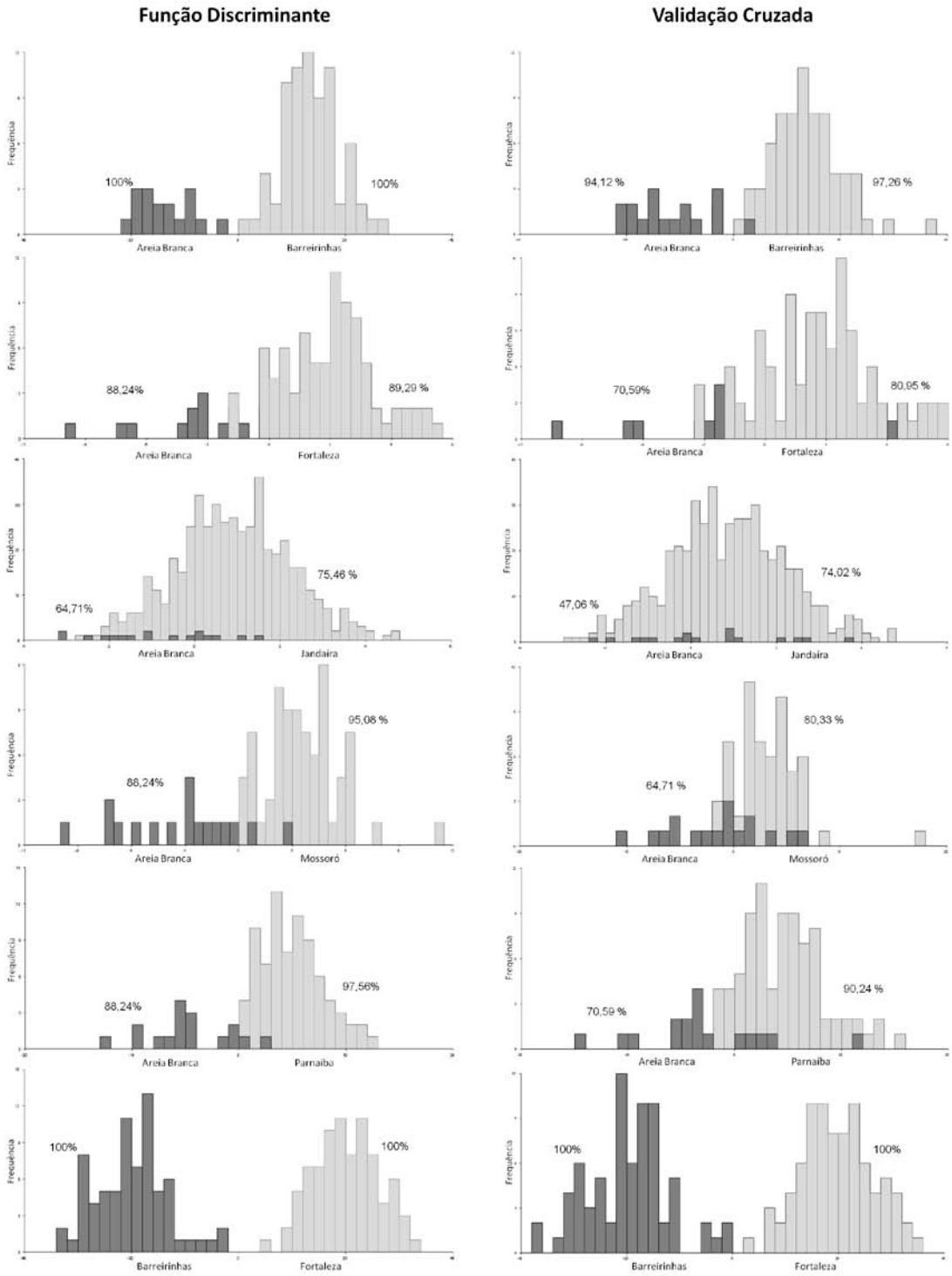
distância entre Barreirinhas e Fortaleza. Todas as distâncias entre as respectivas populações se mostraram altamente significativas (α <0,001) na separação dos grupos, exceto entre Areia Branca e Jandaíra, sendo que isso provavelmente deve estar relacionado ao baixo número amostral da população de Areia Branca (n = 4 colônias, totalizando 19 indivíduos). Tais resultados de não significância estatística são comumente encontrados quando a amostragem de determinado grupo é pequena em comparação com os outros grupos amostrados (Tiago Mauricio Francoy, comunicação pessoal).

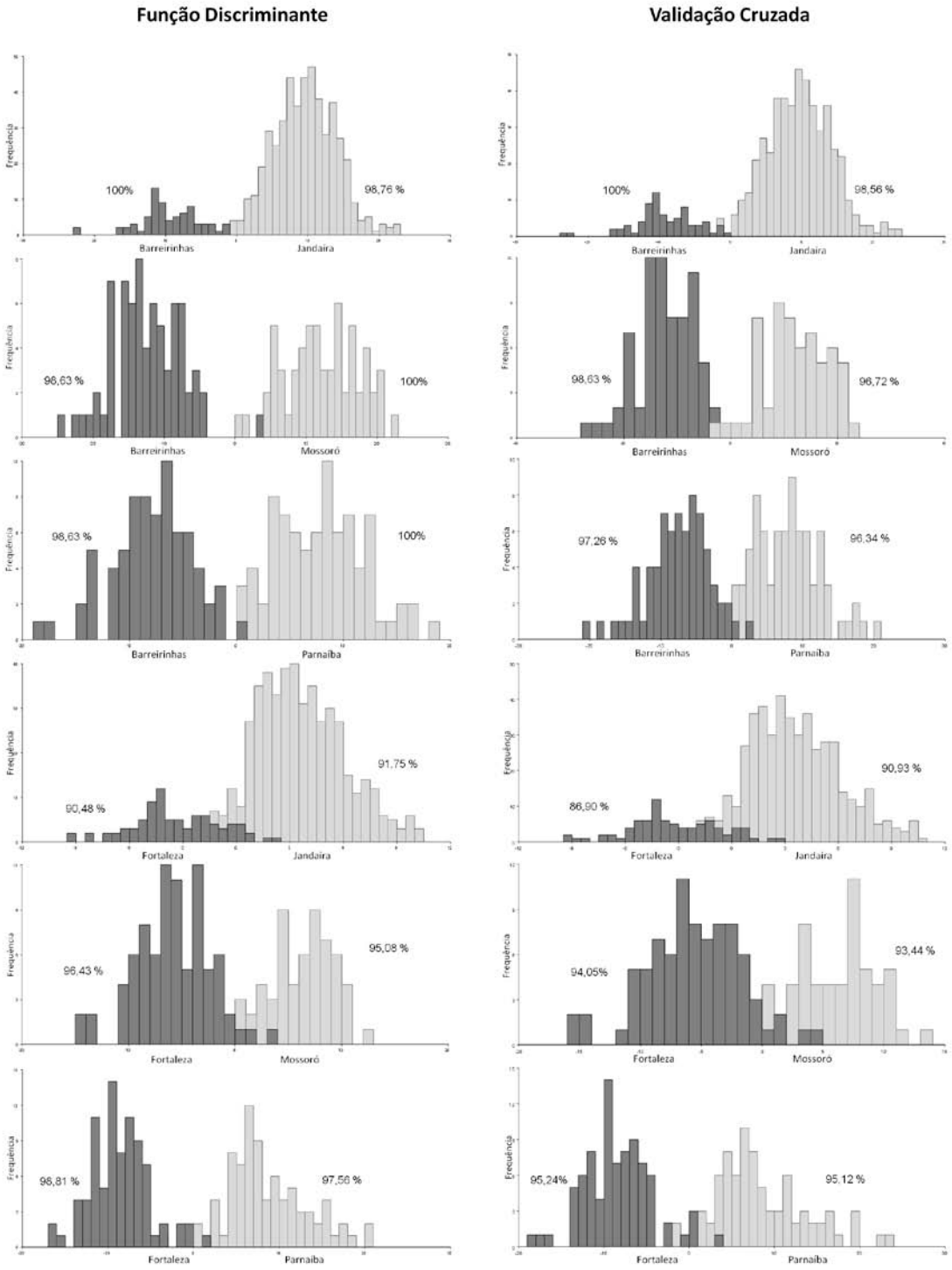
Tabela 6. Distâncias quadradas de Mahalanobis (metade inferior da tabela) e significâncias estatísticas (metade superior da tabela) entre as populações estudadas obtidas através das Análises de Função Discriminante.

	Areia Branca	Barreirinhas	Parnaíba	Fortaleza	Jandaíra	Mossoró
Areia Branca		<.0001	<.0001	<.0001	0,0608*	<.0001
Barreirinhas	5,20		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Parnaíba	3,11	3,97		<.0001	<.0001	<.0001
Fortaleza	2,41	6,33	4,14		<.0001	<.0001
Jandaíra	1,34	4,37	3,12	2,62		<.0001
Mossoró	2,57	4,98	3,57	3,41	2,649	

*os pares de populações nas quais a distância entre os centróides não foi estatisticamente significante (α = 0,05).

As funções discriminantes classificaram corretamente grande porcentagem dos indivíduos dentro de seus respectivos grupos (Figura 17). Barreirinhas foi a população mais distinta, possuindo 100% de classificação correta quando confrontada a maioria das outras, exceto quando a comparamos com Mossoró e Parnaíba, em que um de seus indivíduos foi classificado de forma errônea em ambos os casos. Dentre essas duas análises, o teste de validação cruzada apresentou os maiores erros de classificação quando confrontando Barreirinhas e Parnaíba, atingindo 97,26 e 96,34% de acerto, respectivamente. A comparação que obteve menor êxito na classificação foi entre Areia Branca e Jandaíra, apenas 64,70% dos indivíduos de Areia Branca e 75,46% dos indivíduos de Jandaíra foram classificados corretamente dentro de seus grupos. Esses valores foram ainda mais baixos no teste de validação cruzada, chegando a 47,06 e 74,02%, respectivamente. Em uma média geral dos dados, essa análise foi capaz de acertar 93,96% dos indivíduos dentro dos seus respectivos grupos, atingindo 88,89% de acerto dentro do teste de validação cruzada.


Função Discriminante
Validação Cruzada
Frequência
100%
100%
Areia Branca
Barreirinhas
94,12 %
97,26 %
88,24%
89,29 %
70,59%
80,95 %
Fortaleza
64,71%
75,46 %
47,06 %
74,02 %
Jandaíra
95,08 %
88,24%
80,33 %
64,71 %
Mossoró
97,56%
88,24%
90,24 %
70,59 %
Parnaíba
100%
100%
100%
100%


Função Discriminante
Validação Cruzada
Frequência
100%
98,76 %
Barreirinhas
Jandaira
100%
98,56 %
Barreirinhas
Jandaira
98,63 %
100%
Barreirinhas
Mossoró
98,63 %
96,72 %
Barreirinhas
Mossoró
98,63 %
100%
Barreirinhas
Parnaíba
97,26 %
96,34 %
Barreirinhas
Parnaíba
91,75 %
90,48 %
Fortaleza
Jandaira
90,93 %
86,90 %
Fortaleza
Jandaira
95,08 %
96,43 %
Fortaleza
Mossoró
93,44 %
94,05%
Fortaleza
Mossoró
98,81 %
97,56 %
Fortaleza
Parnaíba
95,24%
95,12 %
Fortaleza
Parnaíba

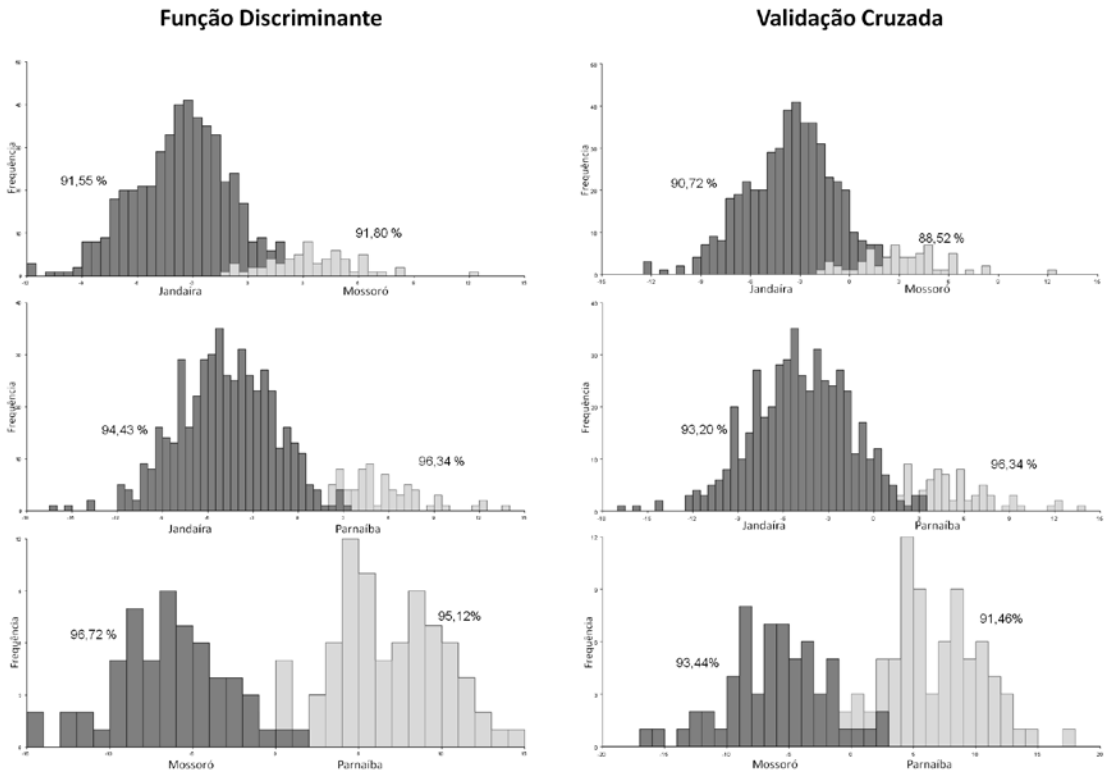


Figura 17. Discriminação par a par dos grupos estudados pela Análise de Função Discriminante e pela Validação Cruzada dos dados.

Embora o software usado nesse trabalho (MorphoJ) se baseie em parâmetros diferentes para os cálculos de discriminação em relação a outros trabalhos encontrados na literatura, a média encontrada no teste de validação cruzada é bem alta e indica a boa discriminação dos grupos de acordo com o local amostrado. Mendes e colaboradores (2007) encontraram um acerto de até 74% na discriminação de indivíduos de diferentes populações de *Nannotrigona testaceicornis* dentro de seus respectivos grupos de origem e Francoy e colaboradores (2011) atingiram 87,1% de acerto dentro dos grupos geográficos de *M. beecheii.*

Devido às características de baixa dispersão dessas espécies que se encontram em ambientes bem fragmentados e isolados geograficamente, os acasalamentos dentro das respectivas populações tendem a homogeneizá-las criando ecótipos localmente separados. Por ser sensível a pequenas variações, essa estruturação populacional pode ser identificada pelas análises de morfometria geométrica, tendo se mostrado extremamente eficiente na

discriminação de grupos e subgrupos, como populações (Francoy, Grassi *et al.*, 2011). Além disso, a técnica de morfometria geométrica já havia se revelado muito eficiente em casos de identificação de subpopulações dentro de uma mesma localidade (Mendes, Francoy *et al.*, 2007), na confirmação de que duas populações antes identificadas como espécies distintas são na verdade apenas variações geográficas (Gonçalves, 2010) e no rastreamento geográfico (Francoy, Grassi *et al.*, 2011).

4.2. Resultados moleculares

Foram analisadas 92 sequências de uma região do gene *COI,* compreendida entre os *primers* mtD6/mtD9 (Simon, Frati *et al.*, 1994). Depois de editadas as sequências, obtivemos fragmentos de 446 pb, nos quais 10 sítios variáveis foram detectados. A composição nucleotídica foi de A = 32,7%, C = 13,1%, G = 8,8%, T = 45,4%, evidenciando uma grande riqueza de bases A e T como esperado para o genoma mitocondrial de insetos (Crozier e Crozier, 1993; Simon, Frati *et al.*, 1994). O fragmento consenso isolado foi alinhado à sequência do genoma mitocondrial de *COI* da espécie *Melipona bicolor* (número de acesso NCBI GeneBank: NC_004529.1), correspondendo à posição nucleotídica de 283 a 728 pb (Figura 18). *M. bicolor* foi usada posteriormente como grupo externo.

```
M.bic  283  ATAAATAATATTAGATTTTGATTATTACCACCATCATTAATATTATTATTATTAAGAAAT  342
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
M.sub  1    ATAAATAATATTAGATTTTGATTATTACCACCATCATTAATTTTATTATTATTAAGAAAT  60

M.bic  343  ATATTTTTCCCAAATTCTGGAACAGGATGAACAGTTTATCCTCCATTATCAT-TATATTT  401
            ||||||| |||||||| || || |||||||| |||||||| |||||||||| | |||||
M.sub  61   TTATTTTTTCCAAATTCAGGTACTGGATGAACGGTTTATCCACCATTATCATCT-TATTT  119

M.bic  402  ATATCATTCATCTCCTTC-AGTTGATTTTACAATTTTTTCAATTCATATAACTGGAATTT  460
            ||||||||||||| || || | |||||||||| |||||||| ||||||||||| |||||||
M.sub  120  ATATCATTCATCCCCATCTA-TTGATTTTACTATTTTTTCTATTCATATAACAGGAATTT  178

M.bic  461  CATCAATTCTTGGATCATTAAATTTTATTGTAACAATTTTTATAATAAAAAATTTTTCAT  520
            |||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
M.sub  179  CATCAATTCTTGGATCTTTAAATTTTATTGTAACAATTTTTATAATAAAAAATTTTTCAT  238

M.bic  521  TAAATTATGATCAAATTAATTTATTTTCATGATCAATTTCTATTACTGTAATTTTATTAA  580
            |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||| ||||||||||||| ||||||
M.sub  239  TAAATTATGATCAAATTAATTTATTTTCTTGATCAATTTCAATTACTGTAATTCTATTAA  298

M.bic  581  TTTTATCATTACCTGTATTAGCAGGAGCAATTACTATATTATTATTTGATCGAAATTTTA  640
            ||||||||||||| |||||||||||||| ||||| |||||||||||||||||||||||||
M.sub  299  TTTTATCATTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACAATATTATTATTTGATCGAAATTTTA  358

M.bic  641  ATACATCATTTTTTGATCCAATAGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATCAACATCTATTTT  700
            |||| ||||| |||||||| |||||||| ||||||||||||||||||||||||| ||||||
M.sub  359  ATACTTCATTCTTTGATCCTATAGGAGGTGGAGATCCAATTTTATATCAACATTTATTTT  418

M.bic  701  GATTTTTTGGACATCCTGAAGTTTATAT  728
            |||||||||||||||| ||||||||||||
M.sub  419  GATTTTTTGGACATCCAGAAGTTTATAT  446
```

Figura 18. Alinhamento entre sequência nucleotídicas de *M. subnitida* e *M. bicolor* (NCBI). As diferenças estão destacadas em cinza e pela ausência de traço.

O número de indivíduos, de sítios polimórficos (S) e de haplótipos (h), bem como a diversidade haplotípica (Hd) e nucleotídica (π) e número médio de diferenças nucleotídicas (K) para cada população estão resumidos na tabela 7. Hd variou de 0,433 a 0,806 com uma média interpopulacional de Hd = 0,79, enquanto seu π variou de 0,00098 a 0,00337 com valor interpopulacional de π = 0,00543. No geral, o valor para a média interpopulacional de Hd foi relativamente alto quando comparados a outros trabalhos que utilizam DNAmt como marcador de variabilidade genética em meliponíneos (Brito e Arias, 2005; Francisco e Arias, 2009; Assis, 2010; Gonçalves, 2010), sendo encontrado um Hd maior (0,957) apenas no trabalho de Batalha-Filho (2008) com subespécies *M. quadrifasciata*. Isso é um indício de que, apesar de toda degradação que a Caatinga vem sofrendo recentemente, a variabilidade genética dessas abelhas ainda encontra-se relativamente alta. O π interpopulacional foi bem próximo ao valor encontrado por Batalha-Filho (2008) 0,00547 e que segundo o autor é baixo.

Tabela 7. Diversidade genética das populações de *M. subnitida* para os haplótipos do gene mitocondrial *COI.* (N) número de indivíduos; (S) número de sítios polimórficos; (h) número de haplótipos; (Hd) diversidade haplotípica; (π) diversidade nucleotídica; (k) número médio de diferenças.

	N	S	h	Hd:	π	K
Areia Branca	6	2	2	0,533	0,00239	1,067
Barreirinhas	7	1	2	0,571	0,00128	0,571
Fortaleza	10	2	3	0,511	0,00125	0,556
Jandaíra	49	7	5	0,433	0,00337	1,502
Mossoró	11	1	2	0,436	0,00098	0,436
Parnaíba	9	3	4	0,806	0,00249	1,111
Total	92	10	11	0,790	0,00543	2,421

Levando em consideração que a diversidade haplotípica está relacionada com o tamanho amostral, e temos um número de indivíduos sequenciados variável entre seis (Areia Branca) e 49 (Jandaíra), os valores da diversidade nucleotídica se tornam mais apropriados para comparação entre as populações. Assim sendo, Jandaíra foi caracterizada pelo maior π, pois foi a população com haplótipos que mais se divergiram entre si, enquanto os haplótipos de Mossoró (menor π) foram os mais semelhantes. A diversidade nucleotídica pode ser influenciada por erro amostral devido ao baixo número de ninhos coletados para maioria das localidades, portanto nossos resultados são apenas inferências que ainda precisam ser confirmadas com a análise de um maior número de colônias. A baixa variabilidade nucleotídica encontrada em todas as populações pode ser explicada, tanto por um pequeno número de indivíduos fundadores dessas populações durante a expansão da área de ocorrência, como também pela possível ocorrência de alterações ambientais em tempos remotos, com consequente redução no tamanho populacional (gargalo populacional).

Ao todo foram identificados 11 diferentes haplótipos, correspondentes a 10 sítios variáveis (Tabela 8). H4 foi o haplótipo mais frequente entre as populações, estando presente em Mossoró, Parnaíba, Fortaleza e Jandaíra, seguido do H5 compartilhado entre Parnaíba, Jandaíra e Areia Branca. O H1 é comum somente entre Parnaíba e Mossoró e o H7 entre Barreirinhas e Parnaíba. Haplótipos exclusivos foram encontrados nas populações de Jandaíra (H2, H3 e H6), Fortaleza (H8 e H10), Barreirinhas (H9) e Areia Branca (H11) (Tabela 9 e Figura 19).

Tabela 8. Haplótipos e seus respectivos sítios variáveis. Números verticais correspondem à posição em pb dos sítios polimórficos dentro do fragmento do gene *COI*.

Haplótipos	54	69	93	94	126	132	168	292	301	381
H1	A	T	G	G	T	C	A	T	T	A
H2	.	C	.	.	C	T	.	C	.	.
H3	.	C	A	.	C	T	.	C	C	.
H4	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.
H5	G	.	.	.	.	.	.	C	.	.
H6	.	C	.	A	C	T	.	C	.	.
H7	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.
H8	.	.	.	.	.	A	.	C	.	.
H9	.	.	.	.	.	.	G	C	.	G
H10	.	.	.	A	.	.	.	C	.	.
H11	.	.	A	.	.	.	.	C	.	.

Tabela 9. Frequência de distribuição (%) dos haplótipos nas populações de *M. subnitida* amostradas.

Haplótipo	Mossoró (11)	Barreirinhas (7)	Parnaíba (9)	Jandaíra (49)	Fortaleza (10)	Areia Branca (6)
H1	0,73		0,22			
H2				0,74		
H3				0,48		
H4	0,27		0,33	0,24	0,7	
H5			0,11	0,18		0,67
H6				0,24		
H7		0,43	0,33			
H8					0,1	
H9		0,57				
H10					0,2	
H11						0,33

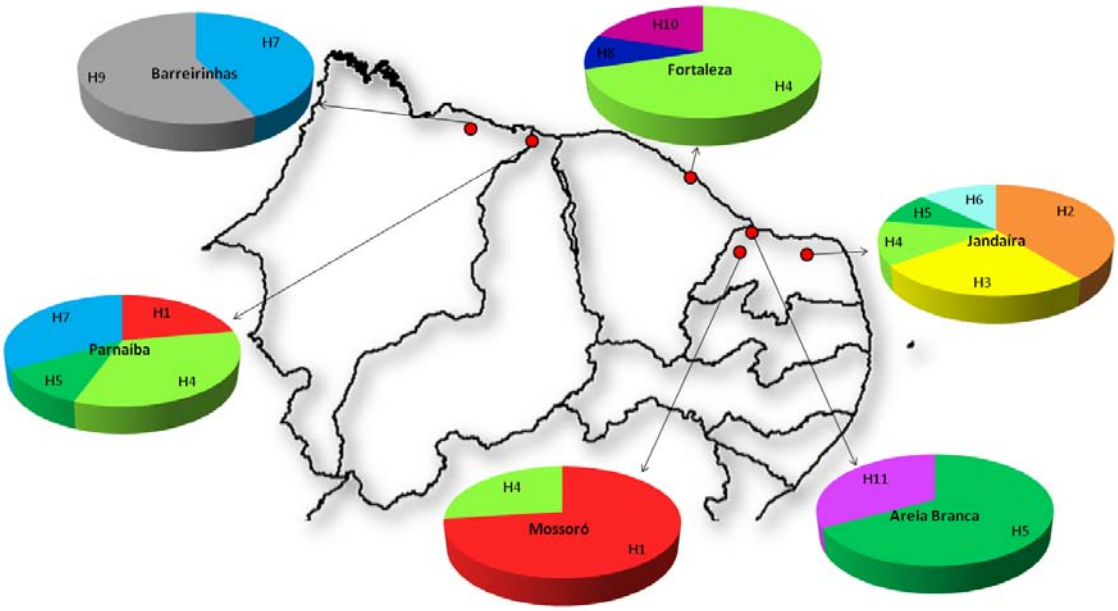


Figura 19. Representação esquemática da frequência de distribuição por localidade dos haplótipos nas populações de *M. subnitida* amostradas.

As inter-relações haplotípicas estão mais claramente representadas na rede de haplótipos (Figura 20) gerada a partir de todas as sequências encontradas para *COI.* Segundo as considerações de alguns autores é esperado que haplótipos ancestrais sejam melhores distribuídos geograficamente em relação aos haplótipos recentes, devido ao seu maior tempo de dispersão. Ainda, os haplótipos ancestrais devem ser encontrados no interior da rede, rodeado por multifurcações que representam as várias mutações que ocorreram em tempos diferentes e originaram os haplótipos descendentes; estes, por sua vez, devem ser encontrados nas extremidades (Templeton, Crandall *et al.*, 1992). Assim, podemos supor que o H4, que é comum a quatro das seis populações estudadas, seja o provável haplótipo ancestral a medida que todos os outros haplótipos estão relacionados à ele e está a somente um passo mutacional dos haplótipos H1, H5, H7, H8, H10 e H11 (Figura 20).

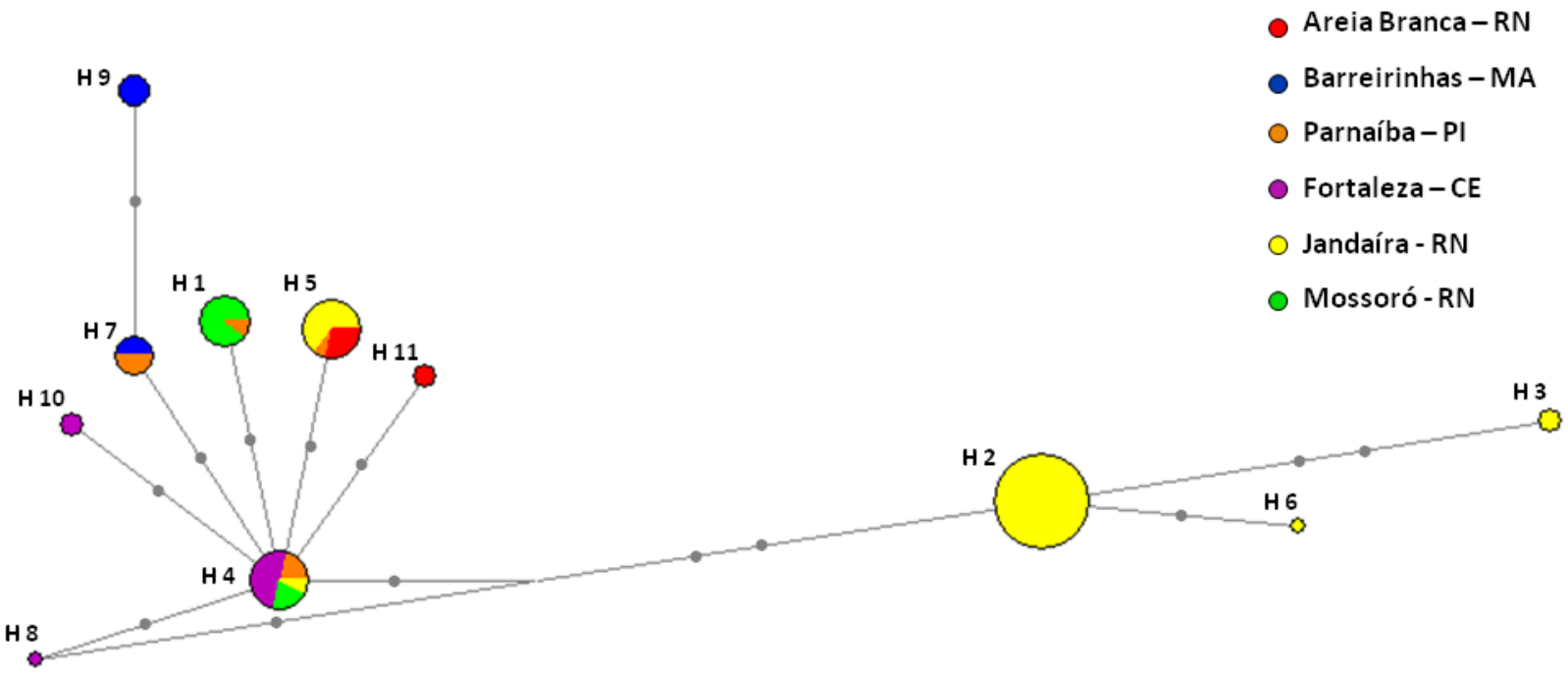


Figura 20. Rede de haplótipos para o gene *COI* da espécie *M. subnitida*. O tamanho das esferas representa o número de indivíduos e os pontos entre as esferas representam os sítios polimórficos.

O baixo π interpopulacional encontrado pode estar relacionado ao fato de que, embora existam 11 haplótipos, a grande maioria deles difere dos outros por um ou poucos passos mutacionais, sendo que a maior divergência entre eles corresponde a sete passos mutacionais entre os haplótipos H3 e H9 (Figura 20). Apesar da população de Jandaíra possuir a maior diversidade nucleotídica intrapopulacional e o maior número de haplótipos, dentre eles o provável haplótipo ancestral (H4), não é possível inferir com convicção que essa região tenha sido o centro de dispersão da espécie. Esse fato também pode estar vinculado à importância econômica da *M. subnitida* nessa região, já que o transporte deliberado de ninhos e discos de cria uma atividade constante dentre os meliponiculturos (Silveira, Melo *et al.*, 2002). A meliponicultura vem sendo desenvolvida há bastante tempo em diversas regiões do país (especialmente no Norte e Nordeste), havendo meliponicultores que possuem grande número de colônias de uma única espécie, como é o caso da abelha *M. subnitida* principalmente no Ceará e Rio Grande do Norte (Cámara, Sousa *et al.*, 2004).

De modo contrário, a presença de um haplótipo em comum entre Parnaíba e Barreirinhas (H7) e um haplótipo exclusivo de Barreirinhas (H9) descendente do haplótipo compartilhado poderia estar relacionada à redescoberta recente dessas abelhas no município de Barreirinhas (Rêgo e Albuquerque, 2006). Considerando a baixa diversidade haplotípica e que essa população ainda não tenha sofrido forte intervenção humana, uma hipótese plausível seria a colonização dessa área por poucas colônias, ou a ocorrência de um efeito gargalo devido a alterações ambientais. Assim o haplótipo H7, predominante na população fundadora, teria dado origem ao haplótipo H9.

A quantidade de indivíduos de Jandaíra com o haplótipo H2 se deve a uma amostragem grande de colônias dessa região (n = 49). Tal haplótipo, exclusivo de Jandaíra, parece ter dado origem aos outros dois haplótipos exclusivos dessa mesma localidade, H6 e H3. Esses três haplótipos foram evidentemente agrupados em um ramo separado e mais distante dos outros no dendograma de proximidade genética, gerado com base nas sequências dos haplótipos (Figura 21). O coeficiente de correlação cofenética do dendograma foi alto (r = 0,997), o que permite alta confiabilidade sobre as inferências geradas (Rohlf e Fisher, 1968).

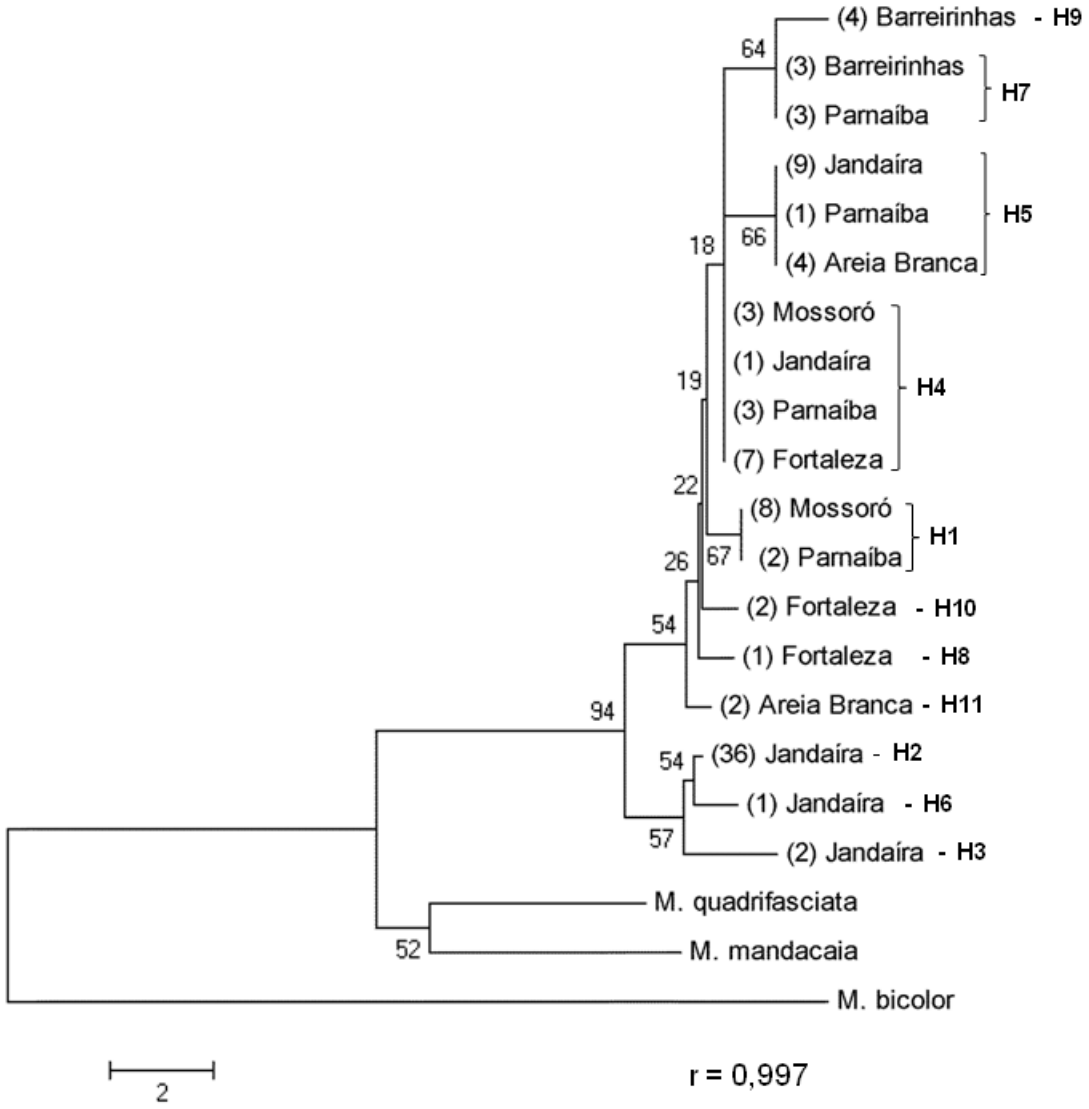


Figura 21. Dendograma de proximidade genética pelo método de *Neighbor Joining* entre as populações de *M. subnitida* e as espécies utilizadas como grupo externo. Número entre parênteses = número de indivíduo; r = coeficiente de correlação cofenética.

Apesar de Jandaíra ter alguns haplótipos exclusivos e mais distantes, ela também possui outros dois haplótipos (H4 e H5) que se encontram agrupados com os demais. Além do mais, os haplótipos mais distantes são divergentes em pelo menos três passos mutacionais, o que é considerado baixo em relação a outros trabalhos similares com abelhas sem ferrão. Uma divergência máxima de cinco passos mutacionais entre os haplótipos de duas espécies de *Frieseomelitta,* antes identificada como *F. varia* e *F. trichocerata*, em conjunto com outros resultados, foram capazes de identificar essas abelhas como sendo pertencentes a uma mesma

espécie (*F. varia)* e a divergência encontrada entre elas correspondente a variações geográficas (Gonçalves, 2010). A separação de duas subspécies *M. quadrifasciata (M. q. quadrifasciata* e *M. q. anthidioides*) foi demonstrada por pelo menos seis passos mutacionais (Batalha-Filho, Waldschmidt *et al.*, 2010) e o indício da existência de espécies crípticas foi evidenciado por uma separação de 17 passos mutacionais entre os haplótipos de *M. rufiventris* de áreas geográficas muito próximas (Pires, 2010).

Apesar dos passos mutacionais, não houve modificação na sequência proteica gerada para nenhum haplótipo, uma vez que todas as mutações encontradas foram mutações neutras. Já quando comparamos a sequência de aminoácidos entre *M*. *subnitida* contra todas as outras espécies usadas como grupo externo (*M. mandacaia, M. quadrifasciata e M. bicolor)*, pudemos observar variações na sequência proteica (Figura 22). Segundo Hebert e colaboradores (2003b), essas diferenças nas sequências de aminoácidos são capazes de identificar organismos como pertencentes a uma categoria taxonômica mais elevada.

```
M.subnitida      MNNISFWLLPPSLILLLLSNLFFPNSGTGWTVYPPLSSYLYHSSPSIDFTIFSIHMTGIS
M.mandacaia      MNNISFWLLPPSLILLLLSNLFFPSSGTGWTIYPPLSSYLYHSSPSVDFTIFSIHMTGIS
                 ************************.******:**************:*************

M.subnitida      SILGSLNFIVTIFMMKNFSLNYDQINLFSWSISITVILLILSLPVLAGAITMLLFDRNFN
M.mandacaia      SILGSLNFIVTIFMMKNFSLNYDQINLFSWSISITVILLILSLPVLAGAITMLLFDRNFN
                 ************************************************************

M.subnitida      TSFFDPMGGGDPILYQHLFWFFGHPEVY
M.mandacaia      TSFFDPMGGGDPILYQHLFWFFGHPEVY
                 ****************************


M.subnitida      MNNISFWLLPPSLILLLLSNLFFPNSGTGWTVYPPLSSYLYHSSPSIDFTIFSIHMTGIS
M.quadrifasciata MNNISFWLLPPSLILLLLSNLFFPNSGTGWTIYPPLSSYLYHSSPSIDFTIFSIHMTGIS
                 *******************************:****************************

M.subnitida      SILGSLNFIVTIFMMKNFSLNYDQINLFSWSISITVILLILSLPVLAGAITMLLFDRNFN
M.quadrifasciata SIIGSLNFIVTIFMMKNFSLNYDQINLFSWSISITVILLTLSLPVLAGAITMLLFDRNFN
                 **:************************************ *******************

M.subnitida      TSFFDPMGGGDPILYQHLFWFFGHPEVY
M.quadrifasciata TSFFDPMGGGDPILYQHLFWFFGHPEVY
                 ****************************


M.subnitida      MNNISFWLLPPSLILLLLSNLFFPNSGTGWTVYPPLSSYLYHSSPSIDFTIFSIHMTGIS
M.bicolor        MNNISFWLLPPSLMLLLLSNMFFPNSGTGWTVYPPLSLYLYHSSPSVDFTIFSIHMTGIS
                 *************:******:**************** ********:*************

M.subnitida      SILGSLNFIVTIFMMKNFSLNYDQINLFSWSISITVILLILSLPVLAGAITMLLFDRNFN
M.bicolor        SILGSLNFIVTIFMMKNFSLNYDQINLFSWSISITVILLILSLPVLAGAITMLLFDRNFN
                 ************************************************************

M.subnitida      TSFFDPMGGGDPILYQHLFWFFGHPEVY
M.bicolor        TSFFDPMGGGDPILYQHLFWFFGHPEVY
                 ****************************
```

Figura 22. Alinhamento par a par comparando sequências de aminoácidos de *M. subnitida* com *M. mandacaia, M. quadrifasciata* e *M. bicolor*. Em destaque aminoácidos que diferem entre as sequências. Asterisco = mesma identidade; dois pontos = substituições conservadas; um ponto = substituições semiconservativas; espaço = substituições não conservadas.

A distância-*p* (*d*) (*p=nd/nt*, onde *nd* é o número de diferenças nucleotídicas entre duas sequências e *nt* é o número de nucleotídeos total examinados) foi calculada usando o modelo de Kimura-dois-parâmetros (K2P) entre as sequências dos 11 haplótipos de *M. subnitida* e as sequências para o gene *COI* das espécies utilizadas como grupo externo (Tabela 10).

Tabela 10. Percentual de divergência nucleotídica, baseada no modelo K2P (metade inferior da tabela) e número de passos mutacionais (metade superior da tabela), calculada entre os pares de haplótipos e entre esses e as espécies utilizadas como grupo externo. Mq = *M. quadrifasciata,* Mm = *M. mandacaia*, Mb = *M. bicolor*.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	Mq	Mm	Mb
H1		4	6	1	2	5	2	2	3	2	2	11	12	29
H2	0,91%		2	3	4	1	4	3	5	4	4	13	14	29
H3	1,36%	0,45%		5	6	3	6	5	7	6	4	13	12	29
H4	0,22%	0,68%	1,13%		1	4	1	1	2	1	1	12	13	30
H5	0,45%	0,91%	1,36%	0,22%		5	2	2	3	2	2	13	14	31
H6	1,13%	0,22%	0,68%	0,91%	1,13%		5	4	6	3	5	12	13	30
H7	0,45%	0,91%	1,36%	0,22%	0,45%	1,13%		2	1	2	2	13	14	31
H8	0,45%	0,68%	1,13%	0,22%	0,45%	0,90%	0,45%		3	2	2	12	13	30
H9	0,68%	1,13%	1,59%	0,45%	0,68%	1,36%	0,22%	0,68%		3	3	14	15	32
H10	0,45%	0,91%	1,36%	0,22%	0,45%	0,68%	0,45%	0,45%	0,68%		2	11	12	31
H11	0,45%	0,91%	0,91%	0,22%	0,45%	1,13%	0,45%	0,45%	0,68%	0,45%		11	12	29
Mq	2,51%	2,98%	2,98%	2,74%	2,98%	2,74%	2,98%	2,74%	3,21%	2,51%	2,51%		9	30
Mm	2,74%	3,21%	2,74%	2,98%	3,21%	2,98%	3,21%	2,98%	3,45%	2,74%	2,74%	2,05%		27
Mb	6,80%	6,80%	6,80%	7,05%	7,29%	7,05%	7,29%	7,05%	7,54%	7,29%	6,80%	7,05%	6,32%	

A divergência intraespecífica variou de 0,22% a 1,59%, sendo que as maiores diferenças foram encontradas quando comparamos os haplótipos exclusivos de Jandaíra (H2, H3 e H6) com os demais. Já as divergências interespecíficas foram sempre superiores a 2%, atingindo seu valor máximo (7,54%) quando *M. bicolor* foi comparada com as outras espécies. Tais resultados corroboram com os valores encontrados por Hebert e colaboradores (2003b), nos quais a variação intraespecífica geralmente é menor que 1%, sendo que uma taxa modesta de apenas 2% pode significar uma história de isolamento reprodutivo de pelo menos um milhão de anos.

O limiar para o diagnóstico de espécie é 3%, com exceção de espécies proximamente relacionadas devido a uma origem recente, sendo a média de divergência entre indivíduos do mesmo gênero 6,8% (Hebert, Cywinska *et al.*, 2003b). Assim os baixos valores interespecíficos variando entre 2,51 e 3,45% entre *M. quadrifasciata, M. mandacaia* e *M. subnitida*, indicam uma separação recente entre essas espécies, sendo que essas fazem parte do mesmo subgênero *Melipona (Melipona)*. O valor de 2,05% encontrado na comparação entre *M. quadrifasciata* e *M. mandacaia,* evidencia mais uma vez a estreita relação entre essas duas espécies já relatada por Silveira e colaboradores (2002) e confirmada por Batalha-Filho (2008). Já as maiores divergências encontradas quando comparamos *M. bicolor* podem ser justificadas por uma maior distância evolutiva já que essa espécie é taxonomicamente identificada como um subgênero diferente das demais, *Melipona (Eomelipona)* (Camargo e Pedro, 2007).

Valores similares foram encontrados para espécies de *Frieseomelitta* (Gonçalves, 2010) em que espécies de *F. varia* e *F. doederleini*, obtiveram valores entre 6,3 a 7,3%, enquanto as divergências entre *F. varia* e *F. trichocerata* se mantiveram próximas de 2% sugerindo, junto a um cladograma que mistura os haplótipos de ambas as espécies, que estas não devem ser consideradas espécies distintas, mas sim uma variação geográfica. Valores de aproximadamente 3% sugeriram clara distinção entre espécies crípticas de *Bombus, B. lucorum, B. cryptarum* e *B. Magnus* (Bertsch, Schweer *et al.*, 2005).

A partir dos valores de *d* foi construído um dendograma com um coeficiente de correlação cofenética igual a 0,995 (Figura 23). Mais uma vez, foi possível notar que os haplótipos H2, H3 e H6, todos exclusivos de Jandaíra, estão agrupados em um ramo separado dos outros haplótipos com altos valores de *d*. Tanto a estruturação genealógica da rede de

haplótipo característica de expansão populacional (Figura 20), como os dendogramas (Figura 21 e 23), evidenciam certo isolamento reprodutivo da região de Jandaíra. Podemos ainda notar que em ambos os dendogramas, o grupo externo enraizou os dois agrupamentos de *M. subnitida* formados.

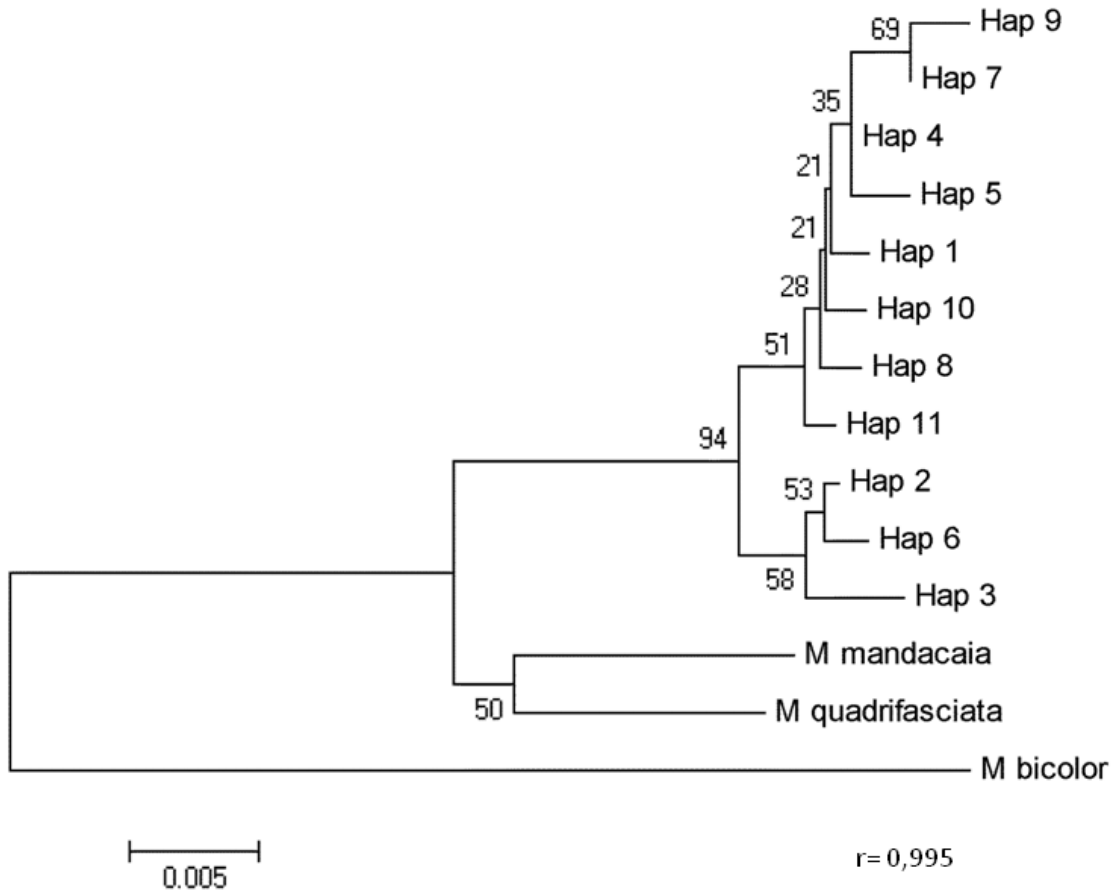


Figura 23. Dendograma de proximidade genética entre as populações de *M. subnitida* e as outras espécies de *Melipona* utilizadas neste trabalho. As análises foram realizadas segundo a metodologia de *Neighbor Joining* a partir da distância de K2P. r = coeficiente de correlação cofenética.

A fim de conhecer a estruturação genética, também foram calculados os valores de *Fst* entre os pares de populações (Tabela 11). Os dados mostraram estruturação genética populacional em todos os casos, onde o nível de diferenciação mais baixo encontrado entre Parnaíba e Fortaleza (0,14325) e o mais alto entre Barreirinhas e Mossoró (0,78692), sendo que todos os valores foram estatisticamente significantes ($\alpha < 0,05$). Essa estruturação é resultante da presença de haplótipos exclusivos, assim devido ao compartilhamento de dois haplótipos da

população de Jandaíra com outras populações, o maior distanciamento dessa região que foi encontrada por outros testes não se fez tão evidente nessa análise. Em um estudo com quatro populações de *P. remota* por RFLP-DNAmt, também foi encontrada forte estruturação genética entre elas e valores de *Fst* parecidos com nossos resultados, variando entre 0,1659 a 0,7266 (Francisco e Arias, 2009). O claro isolamento entre as populações foi reforçado pela ausência de fluxo gênico até mesmo quando ninhos de dois desses locais foram mantidos juntos num mesmo meliponário (Francisco, Nunes-Silva *et al.*, 2008).

Tabela 11. Valores de *Fst* calculados (metade inferior da tabela) e significâncias estatísticas (metade superior da tabela) entre os pares das populações de *M. subnitida* estudadas.

	Areia Branca	Barreirinhas	Fortaleza	Jandaíra	Mossoró	Parnaíba
Areia Branca		0,0005	0,0005	<0,00001	<0,00001	0,0083
Barreirinhas	0,68829		<0,00001	<0,00001	<0,00001	0,003
Fortaleza	0,40727	0,69955		<0,00001	0,0004	0,0056
Jandaira	0,58802	0,69258	0,57355		<0,00001	<0,00001
Mossoró	0,60765	0,78692	0,51906	0,64488		0,0106
Parnaiba	0,28135	0,45039	0,14325	0,57732	0,29235	

O alto índice de haplótipos exclusivos e a estruturação encontrada *(Fst)* entre as localidades estudadas evidenciam que todas as populações encontram-se em processo de diferenciação, com pouco ou nenhum fluxo gênico ocorrendo entre elas de forma natural. A baixa taxa de fluxo gênico pode ser um importante fator para a diferenciação de populações geograficamente distintas (Hedrick, 1999). Nessas abelhas, o fluxo gênico é limitado devido sua baixa capacidade de dispersão, que é restrita a pequenas distâncias pelo fato da colônia filha depender de alimento e de operárias da colônia mãe até o seu estabelecimento completo (Nogueira-Neto, 1954). Além disso, *M. subnitida* constrói seus ninhos em troncos ocos de árvores vivas, tendo preferência pela espécie *Commiphora leptophloeos* (Martins, Cortopassi-Laurino *et al.*, 2004) o que restringe ainda mais seu deslocamento, devido, principalmente, a fatores como o desmatamento e a intensificação da agricultura. Porém o tempo de isolamento

entre essas populações, provavelmente, é relativamente baixo, visto que os haplótipos diferem um do outro por poucos passos mutacionais.

Francisco e Arias (2009) relataram em seu trabalho com *P. remota* que o isolamento encontrado entre as populações pode ter sido ocasionado também por deslocamentos e fragmentação da vegetação, uma vez que a América do sul sofreu fortes modificações climáticas durante o Pleistoceno. As flutuações climáticas que ocorreram durante esse período e seus efeitos na fauna e flora têm sido amplamente aceitos como principal agente impulsor de respostas evolutivas (Haffer e Prance, 2002), inclusive em estudos moleculares, para explicar eventos de expansão e contração populacional no nordeste brasileiro em espécies associadas à vegetação xerófita nos períodos mais secos (Franco, 2009) e à vegetação mesófila nos períodos de pluviosidade máxima (Carnaval e Bates, 2007).

Os resultados referentes à análise de variância molecular (AMOVA) estão representados na tabela 12. Quando analisamos todas as populações amostradas como pertencentes a um único agrupamento populacional (Tabela 12-A), podemos observar que o maior percentual da diversidade haplotípica (61,9%) é encontrada entre tais populações. No entanto, uma alta variação também é encontrada dentro das próprias populações (38,1%) com um valor de covariância entre seus indivíduos (Φst) igual a 0,61898.

Tabela 12. Análise hierárquica de Variância Molecular (AMOVA) baseada nas sequências nucleotídicas de *COI* em *M. subnitida.*

Estruturação	Fonte de Variação	Variância	% do total	P	Φ
(A) único grupo	Interpopulacional	0,93597 Va	61,9	-	-
	Intrapopulacional	0,57614 Vb	38,1	0,00000	Φst 0,61898
(B) dois grupos	Intergrupos	0,77047 Va	45,04	0,00000	Φct 0,45042
	Interpopulacional	0,36395 Vb	21,28	0,00000	Φsc 0,38714
	Intrapopulacional	0,57614 Vc	33,68	0,18084+-0,00978	Φst 0,66319

Número de permutações =1.023; α =0,05.

Testes de Neutralidade (Tabela 13) foram realizados para avaliar se os polimorfismos observados nas sequências seguem o modelo de variação neutra. Tais testes seguem

parâmetros distintos, já que o teste D de Tajima baseia-se nas diferenças entre o número de sítios segregantes e de diferenças nucleotídicas, e o teste Fs de Fu é baseado na distribuição de frequência dos haplótipos em função de θ. Embora *M. subnitida* não tenha apresentado valores significativos no teste D de Tajima (Tajima, 1993), o teste Fs de Fu (Fu, 1997) apresentou resultado igual a -26,96879, estatisticamente significativo ($\alpha < 0,0001$), o que pode ser um indicativo de eventos demográficos de expansão populacional. O gráfico de *Mismatch Distribution* (Figura 24-A) apresentou uma curva bimodal, o que pode ser um indício de fragmentação populacional se levarmos em conta o resultado de Fs de Fu e a estrutura de sua rede de haplótipos que evidencia uma maior diferenciação da população de Jandaíra.

Tabela 13. Teste de neutralidade e *Mismatch distribution*, aplicados às sequências nucleotídicas de *COI.* **A)** Todas as populações pertencentes a um único grupo. **B)** Grupo formado por todas as populações exceto Jandaíra. θ1 = tamanho populacional antes da expansão; θ2 = tamanho populacional após a expansão; τ = tempo deste o evento de expansão populacional em unidades de tempo evolutivo; SSD = teste do desvio da soma dos quadrados (*Sum of squared deviation*).

Estruturação	Mismatch	D de Tajima*	Fs de Fu*
(A) único grupo	θ1 = 0.000 θ2 = 5,625 τ (IC 95%) = 3,8 (1,09 - 6,52) SSD = 0,03549 p SSD = 0,1212	0,60382 *p*-value = 0,77230	-26,96879 p-value = 0,00000
(B) Sem Jandaíra	θ1 = 0.000 θ2 = 99999,000 τ (IC 95%) = 1,56 (0,99 - 2,27) SSD = 0,01544013 p SSD = 0,06	-0,46467 p-value = 0,36790	-28,18325 p-value = 0,00000

*Número de simulações: 10.000

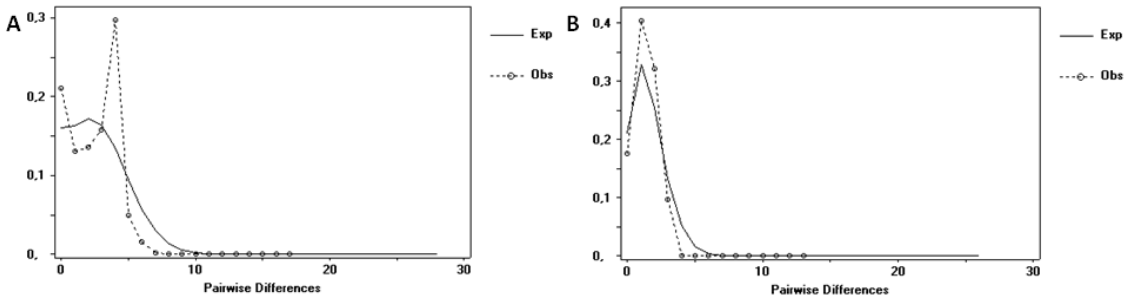


Figura 24. Representação gráfica das diferenças par a par das sequências (*Mismatch Distribution*) do gene mitocondrial *COI.* **A)** Gráfico para uma única população de *M. subnitida.* **B)** Gráfico sem a população de Jandaíra.

Devido a esses dados e os resultados de uma AMOVA com alta estruturação entre os grupos e com Φst significativo e separação estimada de Jandaíra pela árvore filogenética e pela rede de haplótipos, uma análise de AMOVA adicional foi realizada, subdividindo as populações em dois grupos, com a população de Jandaíra separada das demais populações (Tabela 12-B). Como esperado, o Φct, que mede a diferenciação entre os grupos, foi significativo, o que confirma que Jandaíra forma um grupo isolado das demais populações com grande percentual da divergência genética (45%) encontrada entre os dois grupos, e uma diversidade entre as populações dentro de um grupo de apenas 21,3%.

Os resultados para o teste de neutralidade dessa estruturação se apresentaram semelhantes à análise anterior com todas as populações, sendo o teste Fs de Fu (Fu, 1997) igual a -28,18325 e estatisticamente significativo ($\alpha<0,0001$), enquanto o teste D de Tajima (Tajima, 1993) não apresentou resultado significativo. Valores negativos de Fs de Fu indicam eventos demográficos de expansão populacional o que corrobora com resultado do *Mismatch Distribution* apresentado pelo gráfico com curva unimodal (Figura 24-B). A baixa diversidade nucleotídica (Tabela 7), os valores negativos das estatísticas dos testes de neutralidade (Tabela 13-B) e a distribuição unimodal (Figura 24-B), evidenciaram a ocorrência de gargalos populacionais seguidos de expansão demográfica recente; resultados semelhantes foram observados também por Batalha-Filho (2008).

Um estudo anterior, realizado em populações de *M. subnitida* de 14 localidades a partir do sequenciamento da região ITS1, também revelou alta divergência entre as populações analisadas (Cruz, Jorge *et al.*, 2006). No entanto, diferentemente dos nossos resultados, foi proposto que essas populações deveriam estar isoladas e evoluindo individualmente a um período relativamente longo a ponto de acumular uma diferenciação bem maior do que a encontrada para outros grupos de organismos (Cruz, Jorge *et al.*, 2006). Tais divergências entre os resultados devem estar relacionadas ao fato do ITS1 ser uma região não codificadora e, portanto, está sujeita a uma pressão seletiva diferenciada em relação aos genes codificadores, evoluindo mais rapidamente e acumulando maiores números de mutações.

Por *M. subnitida* possuir forte dependência com algumas plantas específicas que ocorrem na Caatinga, as flutuações populacionais podem ter sido semelhantes à encontrada

por Franco (2009) ao analisar a dispersão de algumas espécies cactofílicas de *Drosophila.* Em uma das espécies analisadas (*D. Borborema)* foi detectada uma história demográfica relativamente simples de expansão a partir de aproximadamente 70 mil anos atrás possivelmente relacionada à estabilidade do clima na Caatinga durante esse período, que continuou sendo predominantemente semi-árido mesmo durante os períodos quentes e úmidos (Franco, 2009). Tais resultados corroboraram com um estudo na região das dunas fósseis do Rio São Francisco, que concluiu que a vegetação da Caatinga sempre esteve presente nessa região, embora menos abundante nos períodos de maior umidade do Holoceno (De Oliveira, Barreto *et al.*, 1999).

Claramente a única população que está a mais tempo isolada é a população de Jandaíra; a data desta separação não foi estimada, uma vez que o gene utilizado neste trabalho não tem sua taxa mutacional calibrada para estimativas de uso do relógio molecular em abelhas. Além disso, estimativas gerais ou mesmo taxas determinadas para outros insetos poderiam gerar inferências errôneas. No entanto, podemos perceber que o tempo percorrido desde a separação foi suficiente para acumular mutações nos haplótipos exclusivos diferindo-os dos outros em pelo menos três passos, causando assim o distanciamento de Jandaíra das demais. Tal isolamento foi evidenciado pela rede de haplótipos (Figura 20) e pelo teste de *Mismatch distribuition* (Figura 24).

Nenhuma das estruturações apresentou correlação positiva entre as distâncias genéticas e geográficas entre suas populações, seja com todas as populações (r = 0,23) ou sem a população de Jandaíra (r = 0,33), o que pode estar relacionada a eventos antigos de expansão populacional e mudanças climáticas com fragmentação da distribuição geográfica. Outra explicação pode ser o transporte de colônias entre localidades, prática muito comum entre os meliponicultores.

Considerações finais

5. Considerações finais

Apesar da importância de uma apifauna adaptada as condições xerófitas da Caatinga, com grande potencial de polinização, produção de mel e pólen, e relevante papel no desenvolvimento do uso sustentável desse ecossistema, as abelhas *M. subnitida* que encontravam-se amplamente distribuídas em sua região atualmente estão ameaçadas. Estudos populacionais com essas abelhas ainda são muito escassos, ao mesmo tempo em que a avaliação da estrutura e a dinâmica populacional, tem se tornado de grande urgência para auxiliar na definição de estratégias de conservação e manejo, e assim proporcionar uma melhor e maior utilização, uma vez que ambientes em processo de desertificação são cada vez mais comuns nas paisagens do nosso planeta (Zanella e Martins, 2003).

Em nosso estudo, ambas as análises foram sensíveis o suficiente para inferir uma clara estruturação entre as populações. No entanto, nos resultados de morfometria a população mais isolada foi a de Barreirinhas, possuindo semelhança apenas com Parnaíba (região mais próxima geograficamente). Excetuando-se a população de Barreirinhas, todas as outras populações apresentaram similaridades entre si. O teste de Mantel demonstrou correlação positiva entre as distâncias morfológicas e geográficas, indicando haver uma distribuição gradual desse caráter no espaço geográfico. Nas análises moleculares a maior diferenciação evidenciada foi da população de Jandaíra, que aparentemente está isolada reprodutivamente das outras há um tempo maior. No geral, a divergência encontrada entre as populações é baixa, se mantendo menores que 2%, que segundo Hebert e colaboradores (2003b) é menor que o limiar para o diagnóstico de espécie. Além disso, a população de Jandaíra (mais afastada) também possui dois haplótipos compartilhados com outras populações. Todos esses dados nos indicam que, embora haja uma diferenciação da população de Jandaíra, não há dúvida de que seus indivíduos pertençam a *M. subnitida.* Como todas as populações estão sofrendo diferenciação e não foi verificada correlação positiva entre a estruturação genética e as distâncias geográficas, a hipótese de fluxo gênico ocorrendo de forma natural parece ser menos provável. Assim, a explicação que melhor apoia a união dos dados moleculares e

morfométricos, seria a existência de um fluxo gênico facilitado pelo homem, através do transporte de colônias.

A presença de um haplótipo exclusivo, descendente do haplótipo compartilhado somente entre Parnaíba e Barreirinhas coincide com dados morfométricos que mostram maiores proximidades entre essas populações e grande distanciamento de Barreirinhas em relação às demais. Tais resultados corroboram com a hipótese de que as abelhas de Barreirinhas ainda não sofreram tanta intervenção humana devido sua recente redescoberta (Rêgo e Albuquerque, 2006).

Embora visualmente ambas as análises tenham um padrão bem parecido (Figura 25), nenhuma correlação positiva foi encontrada entre as distâncias morfológicas e genéticas ($r = -0,03$). As duas metodologias usadas se mostraram muito eficientes para captar a pequena variação gerada pela característica de baixa dispersão encontrada em *M. subnitida,* que habita ambientes que atualmente estão bem fragmentados e isolados geograficamente. Esse padrão de estruturação é gerado pelos acasalamentos dentro das respectivas populações que tendem a homogeneizá-las, criando ecótipos localmente separados, adaptados aos diferentes subtipos de Caatinga existentes de acordo com a altitude, qualidade dos solos e precipitações pluviométricas. A diferença gerada entre os resultados das duas técnicas se deve provavelmente ao padrão de herança e dispersão desses marcadores. O DNA mitocondrial possui uma herança exclusivamente materna e sem recombinação, enquanto o padrão de venação das asas possui herança biparental e sofre grande influência ambiental. Devido à maior capacidade de dispersão dos machos em relação às rainhas de abelhas sem ferrão, a herança da forma da asa pode ser disseminada de modo mais rápido, o que leva a uma maior homogeneização dos padrões de venação de asa, como os resultados encontrados neste trabalho.

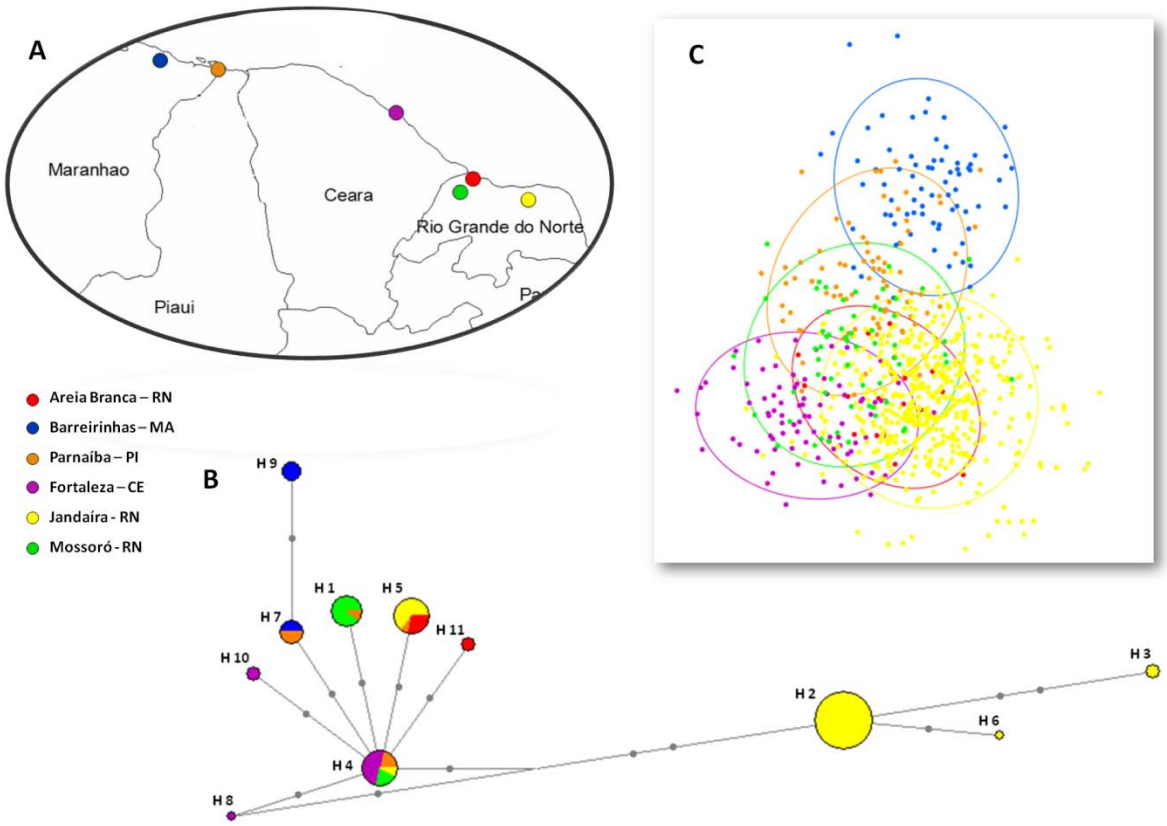


Figura 25. Identificação do mesmo padrão entre as técnicas. **A)** Mapa identificando as localidades amostradas. **B)** Rede de haplótipos. **C)** Gráfico de dispersão das análises morfométrica a partir do CVA rotacionado.

Este trabalho foi ainda o pioneiro no estudo de populações de *M. subnitida* utilizando marcadores moleculares em conjunto com marcadores morfológicos. Os resultados obtidos são de grande importância para a melhor compreensão da estrutura existente entre as populações. Apesar das limitações geradas pelo baixo número amostral de algumas populações, nossas inferências indicam que *M. subnitida* é uma espécie jovem, com grande diversidade de haplótipos, que, no entanto, variam somente por alguns poucos passos mutacionais. Além disso, os dados indicam ainda que recentemente sofreu um evento de expansão demográfica e que atualmente, a influência humana pode estar afetando o fluxo gênico natural destas abelhas. A alta variabilidade genética e a estruturação entre as populações encontradas no presente estudo reforçam a importância da preservação de cada uma destas populações.

Referências

Referências Bibliográficas

AIZEN, M. A.; HARDER, L. D. The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. **Current biology : CB,** v. 19, n. 11, p. 915-8, Jun 9 2009.

ALLEN-WARDELL, G. et al. The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. **Conservation Biology,** v. 12, n. 1, p. 8 - 17, 1998.

ALVES, D. A. et al. Successful maintenance of a stingless bee population despite a severe genetic bottleneck. **Conservation Genetics,** v. 12, n. 3, p. 647-658, 2010.

ANDRADE-LIMA, D. The caatingas dominium. **Revista Brasileira de Botânica,** v. 4, p. 149 - 153, 1981.

ARIAS, M. C. et al. Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. **Apidologie,** v. 37, n. 2, p. 259-274, 2006.

ASSIS, A. F. **Estudo populacional e molecular de *Nannotrigona testaceicornis* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) através do DNA mitocondrial**. 2010. 77 (*Magister Scientiae*). Pós-Graduação em Genética, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - Brasil.

AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography,** v. 36, n. 1, p. 3-15, 2009.

AVISE, J. C. et al. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics,** v. 18, n. 1, p. 489-522, 1987.

AYTEKIN, M. A. et al. Landmark based geometric morphometric analysis of wing shape in *Sibiricobombus* Vogt (Hymenoptera: Apidae: Bombus Latreille). **Annales de la Société Entomologique de France,** v. 43, n. 1, p. 95-102, 2007.

BARRETO, L. S.; TEIXEIRA, A. F. R. Manejo avançado e conservação de meliponíneos. XVI Congresso Brasileiro de Apicultura e II Congresso de Meliponicultura, 2006. Aracaju - Brasil.

BATALHA-FILHO, H. **Distribuição geográfica, filogeografia e história evolutiva da abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae)**. 2008. 56 (*Magister Scientiae*). Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - Brasil.

BATALHA-FILHO, H. et al. Phylogeography and historical demography of the neotropical stingless beeMelipona quadrifasciata(Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. **Apidologie,** v. 41, n. 5, p. 534-547, 2010.

BERTSCH, A. et al. Male labial gland secretions and mitochondrial DNA markers support species status of Bombus cryptarum and B. magnus (Hymenoptera, Apidae). **Insectes Sociaux,** v. 52, n. 1, p. 45-54, 2005.

BIESMEIJER, J. C. et al. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. **Science,** v. 313, n. 5785, p. 351-4, Jul 21 2006.

BISCHOFF, I.; SCHRÖDER, S.; MISOF, B. Differentiation and Range Expansion of North American Squash Bee,Peponapis Pruinosa(Apidae: Apiformes) Populations Assessed by Geometric Wing Morphometry. **Annals of the Entomological Society of America,** v. 102, n. 1, p. 60-69, 2009.

BOOKSTEIN, F. L. **Morphometric tools for landmark data**. Cambridge - USA: Cambridge University Press, 1991.

BRITO, R. M.; ARIAS, M. C. Mitochondrial DNA characterization of two *Partamona species* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by PCR+RFLP and sequencing. **Apidologie,** v. 36, n. 3, p. 431 - 438, 2005.

BROWN, M. J. F.; PAXTON, R. J. The conservation of bees: a global perspective. . **Apidologie,** v. 40, n. 3, p. 410 - 416, 2009.

BRUENING, P. H. **Abelha Jandaíra**. Mossoró - Brasil: Coleção Mossoroense, 1990. 181

BUCHMANN, S. L.; NABHAN, G. P. **The Forgotten Pollinators**. Washington - USA: Island Press, 1996.

CÁMARA, J. Q. et al. Estudos de meliponíneos, com ênfase a *Melípona subnitida* D. no município de Jandaíra, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra,** v. 4, n. 1, p. 20, 2004.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini, Lepeletier, 1836. In: MOURE, J. S.;URBAN, D.*, et al* (Ed.). **Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia, 2007. p.272 - 578.

CARNAVAL, A. C.; BATES, J. M. Amphibian DNA Shows Marked Genetic Structure and Tracks Pleistocene Climate Change in Northeastern Brazil. **Evolution,** v. 61, n. 12, p. 2942-2957, 2007.

CASTELLETTI, C. H. M. et al. Quanto ainda resta da Caatinga? Uma estimativa preliminar. In: LEAL, I. R.;TABARELLI, M.*, et al* (Ed.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife - Brasil: Editora Universitária, UFPE, 2003. cap. 18, p.719 - 734.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. La cria de abejas sin aguijon mas comunes em el Nordeste Brasilero. II Seminario Mexicano Sobre Abejas Sin Aguijón - ... una visión sobre su biología y cultivo, 2001. Mérida, Yucatan - México. p.40 - 43.

COX-FOSTER, D. L. et al. A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. **Science,** v. 318, n. 5848, p. 283-287, 2007.

CROZIER, R. H.; CROZIER, Y. C. The mitochondrial genome of the honeybee Apis mellifera: complete sequence and genome organization. **Genetics,** v. 133, n. 1, p. 97-117, Jan 1993.

CRUZ, D. D. O. et al. Intraspecific variation in the first internal transcribed spacer (ITS1) of the nuclear ribosomal DNA in Melipona subnitida (Hymenoptera, Apidae), an endemic stingless bee from northeastern Brazil. **Apidologie,** v. 37, n. 3, p. 376-386, 2006.

CRUZ, D. O. et al. Adaptação e comportamento de pastejo da abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) em ambiente protegido. **Acta Scientiarum,** v. 26, n. 3, p. 293 - 298, 2004.

DANFORTH, B. N. et al. The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 103, n. 41, p. 15118-23, Oct 10 2006.

DE OLIVEIRA, P. E.; BARRETO, A. M. F.; SUGUIO, K. Late Pleistocene/Holocene climatic and vegetational history of the Brazilian caatinga: the fossil dunes of the middle São Francisco River. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology,** v. 152, n. 3-4, p. 319-337, 1999.

DRUMMOND, A. J. et al. **Geneious** 2011.

DRYDEN, I. L.; MARDIA, K. V. **Statistical Shape Analysis**. Wiley, Chichester - UK: 1998. 347

EARDLEY, C.; GIKUNGU, M.; SCHWARZ, M. P. Bee conservation in sub-Saharan Africa and Madagascar: diversity, status and threats. **Apidologie,** v. 40, n. 3, p. 355 - 366, 2009.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources,** v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics,** v. 131, n. 2, p. 479-91, Jun 1992.

FERNANDES-SALOMÃO, T. M. et al. Mitochondrial and nuclear DNA characterization in the *Melipona* species (Hymenoptera, Meliponini) by RFLP analysis. **Hereditas,** v. 137, n. 3, p. 229 - 233, 2002.

FERNANDES, J. D.; MEDEIROS, A. J. D. Desertificação No Nordeste: Uma Aproximação Sobre O Fenômeno Do Rio Grande Norte. **Holos,** v. 3, n. 25, p. 147 - 161, 2009.

FERRAZ, R. E. et al. [Fungi microbiot of Melipona subnitida Ducke (Hymenoptera: Apidae)]. **Neotropical entomology,** v. 37, n. 3, p. 345-6, May-Jun 2008.

FOLEY, J. A. et al. Global consequences of land use. **Science,** v. 309, n. 5734, p. 570-4, Jul 22 2005.

FRANCISCO, F. D. O.; ARIAS, M. C. Inferences of evolutionary and ecological events that influenced the population structure ofPlebeia remota, a stingless bee from Brazil. **Apidologie,** v. 41, n. 2, p. 216-224, 2009.

FRANCISCO, F. O. et al. Morphometrical, biochemical and molecular tools for assessing biodiversity. An example in Plebeia remota (Holmberg, 1903) (Apidae, Meliponini). **Insectes Sociaux,** v. 55, n. 3, p. 231-237, 2008.

FRANCISCO, F. O.; SILVESTRE, D.; ARIAS, M. C. Mitochondrial DNA characterization of five species of Plebeia (Apidae: Meliponinae): RFLP and restriction maps. **Apidologie,** v. 32, p. 323 - 332, 2001.

FRANCO, F. F. **História evolutiva do "cluster" *Drosophila buzzatii* (grupo *D. repleta*): eventos históricos e diversificação de espécies no Brasil**. 2009. 184 (Doctor of Science). Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - Brasil.

FRANCOY, T. M. et al. Geometric morphometrics of the wing as a tool for assigning genetic lineages and geographic origin to Melipona beecheii (Hymenoptera: Meliponini). **Apidologie,** v. 42, n. 4, p. 499-507, 2011.

FRANCOY, T. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A Morfometria GeomÉtrica De Asas E a IdentificaÇÃo AutomÁtica De EspÉcies De Abelhas. **Oecologia Australis,** v. 14, n. 01, p. 317-321, 2010.

FRANCOY, T. M. et al. Identification of Africanized honey bees through wing morphometrics: two fast and efficient procedures. **Apidologie,** v. 39, n. 5, p. 488-494, 2008.

FREITAS, B. M. et al. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie,** v. 40, n. 3, p. 332-346, 2009.

FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics,** v. 147, n. 2, p. 915-25, Oct 1997.

GOOGLE INC. Google Earth (software), 2011. Disponível em: <http://earth.google.com>.Acesso em: Outubro 2011.

GONÇALVES, J. A. **Ocorrência e abundância de abelhas indígenas no Estado do Ceará (Brasil)**. Coleção Cearense de Agronomia. Fortaleza - Brasil**:** 1-13 p. 1973.

GONÇALVES, P. H. P. **Análise da variabilidade genética de uma pequena população de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de análise do DNA mitocondrial, microssatélites e morfometria geométrica das asas**. 2010. 148 (Magister Scientiae). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo - Brasil.

HAFFER, J.; PRANCE, G. T. Impulsos climáticos da evolução na Amazônia durante o Cenozóico: sobre a teoria dos Refúgios da diferenciação biótica. **Estudos Avançados** v. 16, n. 46, p. 175 - 206, 2002.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences,** v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003b.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences,** v. 270, n. Suppl_1, p. S96-S99, 2003a.

HEDRICK, P. W. **Genetics of Populations**. 2. Sudbury - Canadá: Jones and Bartlett Publishers, 1999.

JARAU, S. et al. Workers Make the Queens in Melipona Bees: Identification of Geraniol as a Caste Determining Compound from Labial Glands of Nurse Bees. **Journal of Chemical Ecology,** v. 36, n. 6, p. 565-569, 2010.

KALINOWSKI, S. T. How well do evolutionary trees describe genetic relationships among populations? **Heredity,** v. 102, n. 5, p. 506-513, 2009.

KEARNS, C. A.; INOUYE, D. W.; WASER, N. M. ENDANGERED MUTUALISMS: The Conservation of Plant-Pollinator Interactions. **Annual Review of Ecology and Systematics,** v. 29, p. 83 - 112, 1998.

KERR, W. E.; NIELSEN, R. A. Evidences that genetically determined melipona queens can become workers. **Genetics,** v. 54, n. 3, p. 859-66, Sep 1966.

KLEIN, A. M. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society,** v. 274, n. 1608, p. 303-13, Feb 7 2007.

KLINGENBERG, C. P. Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms. **Gene,** v. 287, n. 1-2, p. 3-10, Apr 3 2002.

KLINGENBERG, C. P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. **Molecular ecology resources,** v. 11, n. 2, p. 353-357, 2011.

KÖEPPEN, W. **Climatologia: con um estúdio de los climas de la Tierra**. México: Fondo de Cultura Economica, 1948.

KREMEN, C.; WILLIAMS, N. M.; THORP, R. W. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 99, n. 26, p. 16812-6, Dec 24 2002.

KUHLMANN, E. **A vegetação. Geografia do Brasil-Região Nordeste**. Rio de Janeiro - Brasil: IBGE**:** 85 - 110 p. 1977.

LACHENBRUCH, P. A. An almost unbiased method of obtaining confidence intervals for the probability of misclassification in discriminant analysis. **Biometrics,** v. 23, n. 4, p. 639-45, Dec 1967.

LEAL, I. R. et al. Changing the Course of Biodiversity Conservation in the Caatinga of Northeastern Brazil. **Conservation Biology,** v. 19, n. 3, p. 701-706, 2005.

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife - Brasil: 2003.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics,** v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.

LOPES, M. T. R. et al. Atividade de vôo de abelhas jandaíra (*Melípona subnitida* Ducke, 1910) instaladas em dois modelos de colméia. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, p. 20, 2007.

MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. Recursos Florais e Sistemas de Polinização e Sexuais em Caatinga. In: LEAL, I. R.;TABARELLI, M.*, et al* (Ed.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife - Brasil: Editora Universitária, UFPE, 2003. cap. 12, p.515 - 563.

MARINHO, I. V. et al. Espécies vegetais da Caatinga utilizadas pelas abelhas indígenas sem ferrão como fonte de recursos e local de nidificação. In: PARAÍBA, U. F. D., Anais I Congresso Brasileiro de Extensão Universitária, 2002.

MARTINS, C. F. Diversity of the Bee Fauna of the Brazilian Caatinga. In: KEVAN, P. e IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (Ed.). **Pollinating Bees - The Conservation Link Between Agriculture and Nature** Brasília: Ministry of Environment, 2002. cap. 2, p.131 - 134.

MARTINS, C. F. et al. Espécies arbóreas utilizadas para nidificação por abelhas sem ferrão na Caatinga (Seridó, PB; João Câmara, RN). **Biota Neotropica,** v. 4, n. 2, p. 1 - 8, 2004.

MENDES, M. F. M. et al. Intra-populational variability of *Nannotrigona testaceicornis* lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) using relative warp analysis variabilidade intra-populacional em *Nannotrigona* testaceicornis. **Bioscience Journal,** v. 23, n. 1, p. 147 - 152, 2007.

MENEZES, P. Criação racional da abelha jandaíra. In: BRUENING, H. (Ed.). **Abelha jandaíra**. 3. Natal - Brasil, 2006. p.121 - 135.

MICHENER, C. D. **The Bees of the World**. 1. Baltimore and London: The John Hopkins University Press, 2000.

MILLER, M. P. **Tools for population genetic analyses (TFPGA): A windows program for the anasylis of allozyme and molecular population genetic data** 1997.

MMA. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga. Brasília - Brasil, 2002. Disponível em: < http://www.mma.gov.br >. Acesso em: 2 July.

MORAES, D. A. A Morfometria Geométrica e a sua “Revolução na Morfometria”: localizando e visualizando mudanças na forma dos organismos. **Bioletim,** v. Ano III, n. 3, 2003.

MORITZ, C.; DOWLING, T. E.; BROWN, W. M. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics,** v. 18, n. 1, p. 269-292, 1987.

MOURE, J. S.; URBAN, D.; MELO, G. A. R. **Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region**. ENTOMOLOGIA, S. B. D. Curitiba**:** 1054 p. 2007.

MURRAY, T. E. et al. Cryptic species diversity in a widespread bumble bee complex revealed using mitochondrial DNA RFLPs. **Conservation Genetics,** v. 9, n. 3, p. 653-666, 2007.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics** New York - USA: Oxford University Press, 2000.

NEVES, E. L.; VIANA, B. F. 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 2002.

NOGUEIRA-NETO, P. **Notas bionômicas sobre Meliponineos III – Sôbre a enxameagem (Hym. Apoidea)**. Rio de Janeiro - Brasil, p.419 - 452. 1954

NOGUEIRA-NETO, P. **Novas Técnicas para criar Meliponíneos**. Revista Brasileira de Apicultura. 4**:** 4 p. 1994.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão** São Paulo - Brasil: Editora Parma Ltda Greco Fotolito 1997.

PARMESAN, C. et al. Poleward shifts in geographical ranges of butterfly species associated with regional warming. **Nature,** v. 399, n. 6736, p. 579-583, 1999.

PIRES, C. V. **Filogenia de espécies *Melipona* do complexo *Rufiventris*, com Base em sequências de DNA mitocondrial**. 2010. 52 (Magister Scientiae). Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - Brasil.

POLZIN, T. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. **Operations Research Letters,** v. 31, n. 1, p. 12-20, 2003.

PRADO, D. As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R.;TABARELLI, M.*, et al* (Ed.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife - Brasil: Editora Universitária, UFPE, 2003. cap. 1, p.3 - 73.

RÊGO, M.; ALBUQUERQUE, P. Redescoberta de Melipona subnitida Ducke (Hymenoptera: Apidae) nas Restingas do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Barreirinhas, MA. **Neotropical entomology,** v. 35, n. 3, p. 416-417, 2006.

RODRIGUES, L. A.; SANTOS, V. F. Morfometria geométrica – aplicações em paleobiologia de Dinossáurios. Ciências da Terra, UNL, 2003. Lisboa - Portugal. p.141 - 145.

ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology and Evolution,** v. 9, n. 3, p. 552-69, May 1992.

ROHLF, F. J. On applications of geometric morphometrics to studies of ontogeny and phylogeny. **Systematic biology,** v. 47, n. 1, p. 147-58; discussion 159-67, Mar 1998.

ROHLF, F. J. Shape statistics: Procrustes superimpositions and tangent spaces. **Journal of Classification,** v. 16, p. 197-223, 1999.

ROHLF, F. J. **tpsUtil**. New York - USA: Departament of Ecology and Evolution, State University of New York 2008a.

ROHLF, F. J. **tpsDig**. New York - USA: Departament of Ecology and Evolution, State University of New York 2008b.

ROHLF, F. J.; FISHER, D. L. Test for hierarchical structure in random data sets. **Systematic Zoology,** v. 17, n. 4, p. 407 - 412, 1968.

ROHLF, F. J.; SLICE, D. Extensions of the Procrustes Method for the Optimal Superimposition of Landmarks. **Systematic Zoology,** v. 39, n. 1, p. 40, 1990.

ROHLF, J. F.; MARCUS, L. F. A revolution morphometrics. **Trends in Ecology & Evolution,** v. 8, n. 4, p. 129-132, 1993.

SAMPAIO, E.; RODAL, M. J. **Fitofisionomias da caatinga**. Avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga AMBIENTE, M. D. M. Pretolina - Brasil: GT Botânica 2000.

SILVA, T. M. S. et al. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis,** v. 19, p. 507 - 511, 2006.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras : sistemática e identificação**. 1. Belo Horizonte - Brasil: 2002.

SILVEIRA, F. A. et al. Taxonomic constraints for the conservation and susteinable use of wild pollinators – the Brazilian wild bees. In: KEVAN, P. e IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (Ed.). **Pollinating Bees - The Conservation Link Between Agriculture and Nature** 2a Edição. Brasilia: Ministry of Environment 2006. cap. 1, p.41 - 50.

SIMON, C. et al. 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, n. 6, p. 651- 701, 1994.

STOUT, J. C.; MORALES, C. L. Ecological impacts of invasive alien species on bees. **Apidologie,** v. 40, p. 388 - 409, 2009.

TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. Áreas e ações priotitárias para a conservação da biodivesidade da Caatinga. In: LEAL, I. R.;TABARELLI, M*., et al* (Ed.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife - Brasil: Editoria Universitária UFPE, 2003. cap. 20, p.777 - 796.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics,** v. 123, n. 3, p. 585-95, Nov 1989.

TAJIMA, F. Simple methods for testing the molecular evolutionary clock hypothesis. **Genetics,** v. 135, n. 2, p. 599-607, Oct 1993.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution,** v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TELLES, M. P.; DINIZ-FILHO, J. A. Multiple Mantel tests and isolation-by-distance, taking into account long-term historical divergence. **Genetics and molecular research : GMR,** v. 4, n. 4, p. 742-8, 2005.

TEMPLETON, A. R.; CRANDALL, K. A.; SING, C. F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics,** v. 132, n. 2, p. 619-33, Oct 1992.

VILLEMANT, C.; SIMBOLOTTI, G.; KENIS, M. Discrimination of Eubazus (Hymenoptera, Braconidae) sibling species using geometric morphometrics analysis of wing venation. **Systematic Entomology,** v. 32, n. 4, p. 625-634, 2007.

WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **BioTechniques,** v. 10, n. 4, p. 506-13, Apr 1991.

WAUGH, J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology,** v. 29, n. 2, p. 188-97, Feb 2007.

WENSELEERS, T. et al. Intraspecific queen parasitism in a highly eusocial bee. **Biology Letters,** v. 7, n. 2, p. 173-176, 2010.

WILSON, E. O. The encyclopedia of life. **Trends in Ecology & Evolution,** v. 18, n. 2, p. 77 - 80, 2003.

ZANELLA, F. C. V. The bees of the Caatinga (Hymenoptera, Apoidea, Apiformes): a species list and comparative notes regarding their distribution. . **Apidologie,** v. 31, n. 5, p. 579 - 592, 2000.

ZANELLA, F. C. V.; MARTINS, C. F. Abelhas da caatinga: Biogeografia, ecologia e conservação. In: LEAL, I. R.;TABARELLI, M*., et al* (Ed.). **Ecologia e conservação da caatinga**. Recife - Brasil: Editora Universitária UFPE, 2003. p.75 - 134.

ZAYED, A. Bee genetics and conservation. . **Apidologie,** v. 40, n. 3, p. 237 - 262, 2009.

ZAYED, A.; PACKER, L. Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 102, n. 30, p. 10742-6, Jul 26 2005.